

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LIPOSSOMA COM O FILTRO SOLAR PMETOXICINAMATO DE  
OCTILA: PERMEAÇÃO CUTÂNEA, EFICÁCIA E SEGURANÇA**

**Aline de Carvalho Varjão Mota**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabete Pereira dos Santos**

**Rio de Janeiro**

**2013**

Aline de Carvalho Varjão Mota

**LIPOSSOMA COM O FILTRO SOLAR P-METOXICINAMATO DE OCTILA:  
PERMEAÇÃO CUTÂNEA, EFICÁCIA E SEGURANÇA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabete Pereira dos Santos**

**Rio de Janeiro**

**2013**

**M917I** Mota, Aline de Carvalho Varjão.

Lipossoma com o filtro solar p-metoxicinamato de octila: permeação cutânea, eficácia e segurança/ Aline de Carvalho Varjão Mota; orientador Elisabete Pereira dos Santos. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2013.

136p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Nanocosméticos. 2. Filtro solar. 3. Lipossoma. 4. Penetração cutânea.  
I. Santos, Elisabete Pereira dos. III. Título.

**CDD 615.42**

Aline de Carvalho Varjão Mota

LIPOSSOMA COM O FILTRO SOLAR P-METOXICINAMATO DE OCTILA:  
PERMEAÇÃO CUTÂNEA, EFICÁCIA E SEGURANÇA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Orientador:

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Elisabete Pereira dos Santos  
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Elias Estrela Marins  
Faculdade de Farmácia - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Carla Holandino Quaresma  
Faculdade de Farmácia - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Alane Beatriz Vermelho  
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Sheila Garcia  
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Dedico este trabalho à minha  
filha Lívia e ao meu marido  
Alberto, que me acompanharam  
pacientemente e com espírito de  
renúncia todo esse tempo.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, que me deu forças para seguir em frente e permitiu a realização deste trabalho.

Meu agradecimento a Prof<sup>a</sup> Elisabete Pereira dos Santos que aceitou a orientação deste trabalho e sempre esteve disponível em todos os momentos.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Rosa e Henrique que contribuíram fortemente para que eu seja a pessoa que sou hoje.

Agradeço muito à minha sogra Ana Maria, pela amizade valiosa e por estar ao meu lado em todas as dificuldades.

Agradeço ao Alberto e a Lívia pelo incentivo, pelo amor e compreensão, principalmente, nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos amigos da Farmácia Universitária que durante um longo tempo foram para mim como uma segunda família.

Agradeço especialmente à Zaida Freitas pela amizade, pelo incentivo e pela colaboração tão importante para a realização deste trabalho, principalmente o auxílio nos ensaios de tape stripping.

Aos meus amigos da pós-graduação, principalmente à Débora, Maria Cristina, Prof<sup>a</sup> Rita, Cléo, Arídio, Carol Pupe, Raquel e Emely pelos momentos de descontração, pelos sorrisos, pela amizade e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Agradeço ao Prof. José Carlos Saraiva Gonçalves pela ajuda na elaboração do projeto a ser encaminhado ao Comitê de ética em Pesquisa (CEP) HUCFF/UFRJ.

À Prof<sup>a</sup> Gisela Maria Dellamora Ortiz pela valiosa colaboração nos experimentos com a lipase.

À Prof<sup>a</sup> Sheila Garcia por disponibilizar o titulador automático.

Ao Prof. Ralph Santos-Oliveira pela preciosa colaboração com os ensaios de biodistribuição.

Ao pessoal da Fiocruz, Octávio, Ronald e Vanessa pela importante contribuição nos ensaios de Het-Cam.

À empresa Allergisa pela realização dos testes de FPS in vivo.

Agradeço ao Prof. Eduardo Ricci por sua solicitude em todos os momentos em que precisamos de sua ajuda.

Agradeço à banca de acompanhamento formada pelas queridas Professoras Carla Holandino e Rita de Cássia Estrela por suas sugestões e colaborações que enriqueceram muito o meu trabalho.

Agradeço à minha amiga Luana pela ajuda preciosa com o tratamento estatístico dos dados obtidos nessa pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Regina Elias Mansur, do IMA-UFRJ, por ceder o Zetasizer para realização de grande dos experimentos de tamanho e potencial zeta.

Agradeço aos meus amigos do INPI pela força, pelo incentivo e pelos momentos de descontração.

Agradeço às Professoras Gisela Maria Dellamora Ortiz e Ana Luisa Palhares de Miranda coordenadoras do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio e compreensão durante a execução desse trabalho.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos valiosos ensinamentos recebidos durante as aulas.

"A força não provém da  
capacidade física e sim de  
uma vontade indomável."

***Mahatma Gandhi***



## RESUMO

MOTA, Aline de Carvalho Varjão. Lipossoma com p-metoxicinamato de octila: permeação cutânea, eficácia e segurança. Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

A fotoproteção é a principal recomendação para evitar os danos à pele provocados pela radiação solar. O desenvolvimento de formulações com filtros solares nanoestruturados é de grande interesse para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos devido aos benefícios potenciais. Este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar o nanossistema lipossoma/p-metoxicinamato de octila (MCO) para obter uma formulação de filtro solar com maior segurança e eficácia, mantendo o MCO por mais tempo no estrato córneo (EC). O nanossistema lipossoma/MCO obtido foi testado como substrato para a hidrólise enzimática com lipase de *Rhizomucor miehei* e foi também realizado ensaio de biodistribuição com lipossomas marcados com tecnécio-99m. O lipossoma/MCO foi então incorporado numa formulação em gel. Com esta formulação foram realizados os ensaios de irritação ocular (HET-CAM), fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo*, perfil de liberação *in vitro*, biometria cutânea e tape stripping. Os resultados indicam, que o lipossoma/MCO não é hidrolisado pela lipase de *Rhizomucor miehei*. No ensaio de biodistribuição, o lipossoma/MCO marcado com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) foi depositado principalmente na pele, enquanto que para o MCO o principal órgão de deposição foi o fígado, o que mostra que o lipossoma teve uma maior afinidade pela pele quando comparado ao MCO livre. A formulação lipossoma/MCO foi classificada como não irritante no teste HET-CAM de irritação ocular mostrando boa histocompatibilidade. A formulação contendo lipossoma/MCO mostrou um maior FPS *in vivo*, apesar de não apresentar uma maior resistência à água. A inclusão em lipossomas foi capaz de retardar a liberação do MCO a partir da formulação, pois o lipossoma/MCO apresentou menor fluxo ( $3,9 \pm 0,33 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) quando comparado com a formulação convencional ( $6,3 \pm 1,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ). Os ensaios de biometria cutânea revelaram que as diferenças de pH e hidratação da superfície cutânea dos voluntários avaliados não influenciaram a captação do MCO pelo EC. O método de *tape*

*stripping* mostrou que houve aumento da captação do MCO pelo EC após a aplicação da formulação com lipossoma/MCO mostrando um valor de  $22,64 \pm 7,55 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de MCO, maior do que o valor encontrado para a formulação com MCO livre ( $14,57 \pm 2,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Estes resultados indicam que os lipossomas mostraram-se excelentes transportadores para MCO proporcionando uma maior segurança e eficácia de formulações contendo este filtro solar.

**Palavras-chave:** nanocosméticos, filtro solar, lipossoma, penetração cutânea.

## ABSTRACT

MOTA, Aline de Carvalho Varjão. Octyl methoxycinnamate liposome: skin permeation, efficacy and safety. Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

Solar radiation causes many damages to human skin and photoprotection is the main way to prevent these harmful effects. The development of sunscreen formulations containing nanosystems is of great interest in the pharmaceutical and cosmetic industries because of the many potential benefits. This study aimed to develop and evaluate a liposome/octyl methoxycinnamate (OMC) nanosystem to obtain a sunscreen formulation with improved safety and efficacy by keeping OMC for longer on the stratum corneum (SC). Liposome/OMC nanostructure obtained was tested for enzymatic hydrolysis with lipase from *Rhizomucor miehei* and biodistribution with liposome labeled with technetium-99m. The liposome/OMC was then incorporated in a gel formulation and tested for ocular irritability (HET-CAM), *in vitro* and *in vivo* solar protection factor (SPF), *in vitro* release profile, skin biometrics, and *in vivo* tape stripping method. The liposome/OMC nanosystem was not hydrolyzed by lipase from *Rhizomucor miehei*. In the biodistribution assay, liposome/OMC labeled with technetium-99m had mainly deposited in the skin, while for OMC the main organ was the liver, showing that liposome had higher affinity for the skin than OMC. The liposome/OMC formulation was classified as non-irritating in the HET-CAM test of ocular irritation showing good histocompatibility. The formulation containing liposome/OMC showed a higher *in vivo* SPF, although it did not present increased water resistance. The inclusion in liposome was able to slow down the OMC release from the formulation presenting lower steady-state flux ( $3.9 \pm 0.33 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) when compared to the conventional formulation ( $6.3 \pm 1.21 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ). The stripping method showed an increased SC uptake of OMC giving an amount of  $22.64 \pm 7.55 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  of OMC, higher than the amount found for the conventional formulation ( $14.57 \pm 2.30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). These results indicate that liposomes are

superior carriers for OMC providing greater safety and efficacy to sunscreen formulations.

**Keywords:** nanocosmetics, sunscreen, liposome, cutaneous penetration.

## Lista de Figuras

Figura 1:	Ilustração esquemática do espectro eletromagnético	25
Figura 2:	Penetração da radiação UVA e UVB na pele	29
Figura 3:	Estrutura da pele	31
Figura 4:	Representação diagramática do transporte de fármacos através do estrato córneo.	34
Figura 5:	Esquema de aplicação da primeira lei de Fick	36
Figura 6:	Representação gráfica do lag-time ( <i>t<sub>lag</sub></i> )	37
Figura 7:	Fórmula estrutural genérica da maioria dos filtros solares orgânicos	40
Figura 8:	Alteração de nível energético dos elétrons em filtros solares orgânicos quando ativados pela radiação UV	40
Figura 9:	Fórmula Estrutural do <i>p</i> -metoxicinamato de octila	42
Figura 10:	Estrutura Esquemática do lipossoma	44
Figura 11:	Esquema do efeito reservatório do lipossoma	46
Figura 12:	Representação esquemática da classificação dos lipossomas segundo o tamanho e número de lamelas	47
Figura 13:	Esquema da metodologia de preparação do lipossoma	56
Figura 14:	Reação de hidrólise enzimática do MCO e da fosfoatidilcolina	61
Figura 15:	Etapas do ensaio de irritabilidade ocular HET-CAM	65
Figura 16:	Área demarcada nas costas dos voluntários para os ensaios de FPS <i>in vivo</i>	69
Figura 17:	Unidade combinada Sebumeter - pHmeter – Corneometer	72
Figura 18:	Esquema da metodologia <i>tape stripping</i> empregada	74
Figura 19:	Espectro de absorção no UV (entre 200 e 450 nm) do filtro solar MCO	78
Figura 20:	Curva padrão de absorbância versus concentração de MCO ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtida por espectrometria de ultravioleta em dois dias.	79
Figura 21:	Fotomicrografia de Lipossomas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, (A) lipossoma vazio, aumento de 44000x, (B) lipossoma/MCO, aumento de 56000x.	80
Figura 22:	Distribuição de tamanho das vesículas do lipossoma vazio (A) e do lipossoma/MCO (B) logo após o preparo e lipossoma vazio (C) e lipossoma/MCO (D) após 3 meses.	82

Figura 23:	Diagramas de potencial zeta do lipossoma vazio (A) e do lipossoma/MCO (B)	83
Figura 24:	Curva padrão de absorvância versus concentração de P ( $\mu\text{g/mL}$ ) por espectroscopia de ultravioleta.	85
Figura 25:	Biodistribuição do nanossistema lipossoma/MCO marcado com tecnécio-99-m em comparação com o lipossoma vazio e o filtro solar MCO	88
Figura 26:	Quantidade de MCO total cedida por área encontrada para as formulações contendo MCO livre (●) e Lipossoma/MCO (■), os tempo estatisticamente diferentes foram marcados com asterisco.	94
Figura 27:	Penetração do MCO no extrato córneo a partir das formulações MCO livre (■) lipossoma/MCO (●) empregando-se o <i>tape stripping</i> .	99
Figura 28:	Percentual de recuperação do MCO das fitas adesivas	100
Figura 29:	Influência do pH cutâneo na captação do MCO pelo EC	101
Figura 30:	Influência da hidratação da superfície cutânea na captação do MCO pelo EC	102

## Lista de Tabelas

Tabela 1:	Componentes do lipossoma/MCO	56
Tabela 2:	Composição das formulações com MCO livre e com lipossoma/MCO	63
Tabela 3:	Graduação numérica (1, 3, 5, 7 e 9) dos fenômenos irritantes determinados em função do tempo decorrido (segundos) para a sua ocorrência.	65
Tabela 4:	Média da graduação dos fenômenos irritantes e a classificação final do grau de irritação das formulações avaliadas	66
Tabela 5:	Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda	67
Tabela 6:	Nível de oleosidade encontrado em diversas partes do corpo	73
Tabela 7:	Valores médios de tamanho e índice de polidispersividade dos lipossomas	81
Tabela 8:	Valores médios de potencial zeta e desvio padrão dos lipossomas	83
Tabela 9:	Valores de rendimento de inclusão do MCO em lipossoma	84
Tabela 10:	Biodistribuição do nanossistema lipossoma/MCO marcado com tecnécio-99-m em comparação com o lipossoma vazio e o filtro solar MCO	87
Tabela 11:	Grau dos fenômenos irritantes obtidos por HET-CAM e a classificação final do grau de irritação das formulações	89
Tabela 12:	Resultado do FPS <i>in vitro</i> das formulações MCO a 8% e lipossoma/MCO	90
Tabela 13:	Resultado do FPS <i>in vivo</i> (média $\pm$ D.P.) das formulações MCO livre e lipossoma/MCO.	90
Tabela 14:	Fluxo $\pm$ erro padrão da média das formulações contendo MCO livre e Lipossoma/MCO.	92
Tabela 15:	Quantidade total de MCO cedida e quantidade cedida por área $\pm$ erro padrão da média (EPM) das formulações MCO livre e Lipossoma/MCO.	93
Tabela 16:	Biometria cutânea onde BD = braço direito e BE = braço esquerdo. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.	95
Tabela 17:	Recuperação do MCO em fitas individuais com agitador magnético	97
Tabela 18:	Recuperação do MCO em fitas conjuntas com agitador	97

magnético

Tabela 19: Recuperação do MCO em fitas conjuntas com agitação em 98  
vórtex

Tabela 20: Penetração do MCO no estrato córneo de 10 voluntários 98  
sadios média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.).



## Lista de Equações

Equação 1:	Primeira Lei de Fick	35
Equação 2:	Segunda Lei de Fick	38
Equação 3:	Cálculo do FPS segundo Mansur	67
Equação 4:	Cálculo do FPS <i>in vivo</i>	68

## Lista de Abreviaturas e Siglas

$\mu\text{Ci}$	Microcourri
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Micrograma por centímetro quadrado
$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$	Micrograma por centímetro quadrado por hora
$\mu\text{L}$	Microlitro
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnécio 99 metaestável
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	hidroxibutiltolueno
CAM	Membrana córion-alantóide
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COLIPA	Comitee de la Liason des Associations Europeans de l'Industries de la Parfumerie, de Produits Cosmetiques et de Toilette (Comitê das Associações Européias das Industrias de Perfumaria, Cosméticos e produtos de Higiene).
Da	Dalton
DME	Dose mínima eritematosa
EC	Estrato córneo
FPS	Fator de proteção solar
GOV	Vesículas oligolamelares gigante (giant oligolamellar vesicles)
GUV	Vesículas unilamelares gigantes (giant unilamellar vesicles)
HET-CAM	Teste em Membrana córion-alantóide de Ovos Embrionados de Galinha
IP	Índice de Polidispersividade
IV	Infravermelho
$J_{ss}$	Fluxo no estado estacionário
KeV	Kiloeletrovolt
LOV	Vesículas oligolamelares grandes (large oligolamellar vesicles)
LUV	Vesículas unilamelares grandes (large unilamellar vesicles)
M	Molar

MBq	Megabequerrel
MCO	<i>p</i> -metoxicinamato de octila
MLV	Vesículas multilamelares (multilamellar vesicles)
MVL	Vesículas multivesiculares (multivesicular liposomes)
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzóico
PZ	Potencial Zeta
qsp	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
SOV	Vesículas oligolamelares pequenas (small oligolamellar vesicles)
SUV	Vesículas unilamelares pequenas (small unilamellar vesicles)
TRIS	Trishidrometilaminometano
UA	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
UVC	Radiação ultravioleta C
$\lambda$	Comprimento de onda
$\alpha$	Nível de significância

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Radiação Solar	25
2.1.1 Radiação Ultravioleta	26
2.1.2 Efeitos Benéficos da Radiação Ultravioleta	27
2.1.3 Efeitos Nocivos da Radiação Ultravioleta	27
2.2 Pele Humana	30
2.2.1 Aspectos Teóricos sobre Mecanismos de Penetração cutânea	35
2.3 Filtros Solares	38
2.3.1 Filtros Inorgânicos	38
2.3.2 Filtros Orgânicos	39
2.3.3 <i>p</i> -Metoxicinamato de Octila	41
2.4 Lipossomas	43
3 OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo Geral	51
3.2 Objetivos Específicos	51
4 MATERIAIS	52
4.1 Matérias-primas, solventes e reagentes	52
4.2 Equipamentos e Acessórios	53
5 METODOLOGIAS	55
5.1 Desenvolvimento do Nanossistema Lipossoma/MCO	55
5.2 Caracterização do Nanossistema Lipossoma/MCO	57

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão	57
5.2.2 Tamanho e Índice de Polidispersividade	57
5.2.3 Potencial Zeta	58
5.2.4 Rendimento de Inclusão do MCO no Lipossoma	58
5.2.5 Dosagem de Fósforo	58
5.3 Hidrólise Enzimática	60
5.4 Biodistribuição do Lipossoma/MCO marcado com tecnécio-99-m	61
5.5 Desenvolvimento das Formulações com MCO	62
5.6 Teste em Membrana Córion-Alontóide de Ovos Embrionados de Galinha (HET-CAM)	64
5.7 Determinação do Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i>	66
5.8 Determinação do Fator de Proteção Solar <i>in vivo</i>	67
5.9 Perfil de Liberação <i>in vitro</i> das formulações Desenvolvidas	69
5.10 Biometria Cutânea e <i>Tape Stripping</i> – Avaliação da Penetração do MCO em Voluntários	70
5.10.1 Seleção e Avaliação dos Voluntários	71
5.10.2 Preparo dos Voluntários para os Ensaios	71
5.10.3 Biometria Cutânea	72
5.10.4 <i>Tape Stripping</i>	74
5.11 Quantificação do MCO presente nas fitas adesivas por CLAE	76
5.12 Análise Estatística	77
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
6.1 Caracterização Físico-Química do Filtro Solar MCO	78
6.1.1 Determinação dos parâmetros de absorção na região do UV do filtro solar MCO	78
6.2 Caracterização do nanossistema lipossoma/MCO	79
6.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão	79
6.2.2 Tamanho e Índice de Polidispersividade	80
6.2.3 Determinação do Potencial Zeta	82
6.2.4 Rendimento de Inclusão	83

6.2.5 Dosagem de Fósforo	84
6.3 Avaliação do lipossoma/MCO como substrato para lipase microbiana	85
6.4 Biodistribuição do lipossoma/MCO marcado com tecnécio-99-m	86
6.5 Doseamento das Formulações com MCO	88
6.6 Segurança das formulações – HET-CAM	88
6.7 Determinação do Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i>	89
6.8 Determinação do Fator de Proteção Solar <i>in vivo</i>	90
6.9 Perfil de liberação <i>in vitro</i>	91
6.10 Biometria Cutânea	94
6.11 <i>Tape Stripping</i>	96
6.11.1 Determinação da metodologia de extração do MCO em fitas conjuntas	96
6.11.2 Penetração do MCO no extrato córneo – <i>Tape Stripping</i>	98
7 CONCLUSÕES	103
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	104
ANEXO	115

## 1 INTRODUÇÃO

A fotoproteção é a principal medida a ser tomada para a prevenção dos danos causados pela radiação solar: eritema, envelhecimento e câncer de pele. O câncer de pele, do tipo não-melanoma, é o tipo de tumor de maior incidência no Brasil. A estimativa para 2012, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) foi de 68 novos casos de câncer de pele do tipo não melanoma e 4 novos casos de câncer de pele do tipo melanoma para cada 100 mil habitantes. Essa alta incidência deve-se principalmente ao fato do Brasil ser um país de clima predominantemente tropical, já que está localizado geograficamente entre os trópicos. O principal fator de risco para o surgimento do câncer de pele do tipo não melanoma é a exposição excessiva a radiação solar. Outros fatores de risco são a sensibilidade da pele ao sol, doenças imunossupressoras e exposição ocupacional (<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/>).

Devido a essa alta incidência do câncer de pele no Brasil, a Sociedade Brasileira de Dermatologia recomenda diversas medidas para prevenir esta doença, tais como: evitar a exposição solar nos horários entre 10 e 14 horas, uso de chapéus, camisetas, barracas e de formulações antissolares com FPS 15 ou superior que devem ser repassados na pele a cada duas horas (<http://www.sbd.org.br/campanha/cancer/cuidado.aspx>).

Formulações antissolares são produtos cosméticos que contém filtros solares, substâncias capazes de absorver, refletir ou dispersar a radiação UV proveniente dos raios solares. Para obter formulações antissolares mais fotoestáveis, com elevado FPS e com ampla abrangência do espectro de radiação UV são utilizados três ou mais filtros solares que são, em geral, substâncias lipofílicas, para aplicação em grande área do corpo. Portanto, a absorção sistêmica é um fator a ser considerado (GONZALEZ *et al.*, 2002; GAMER *et al.*, 2006; SCHULZ *et al.*, 2002; GONZÁLEZ *et al.*, 2008; GILABERTE & GONZÁLEZ, 2010).

Foi observado na literatura que diversos filtros solares tais como oxibenzona, benzofenona, octilmetoxicnamato presentes em formulações convencionais foram absorvidos após a aplicação na pele sendo encontrados

em camadas mais profundas do estrato córneo, na urina, no plasma e no leite materno (HAYDEN, 1997; SARVEIYA, 2004; GONZALEZ *et al.*, 2002; JANJUA, 2008). Além disso, diversos estudos demonstraram propriedades estrogênicas do filtro solar anti UVB p-metoxicinamato de octila (MCO) tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (SCHUNPF *et al.*, 2001; IMUI *et al.*, 2003; KLAMMER *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de formulações contendo sistemas nanoparticulados é de grande interesse na área farmacêutica e cosmética, pois por meio desses sistemas podem-se modificar as propriedades dos materiais alcançando diversos benefícios, tais como: modificação do perfil de liberação; modulação dos fatores de proteção solar e melhora na estabilidade dos filtros; bem como aumento da estabilidade físico-química de ativos em geral e redução de efeitos colaterais e reações adversas (GILLET, 2011; JAIN & JAIN, 2010; JIMÉNEZ *et al.*, 2004; PERUGINE *et al.*, 2002; SCALIA, 2002; YENER, 2003; DETONI, *et al.*, 2011).

A nanotecnologia é uma área de pesquisa e desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar uma vez que se baseia nos mais diversificados tipos de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais) usados para as mais variadas finalidades. Tais sistemas são estruturados em escala nanométrica, ou seja, sistemas com diâmetro entre 1 e 1000 nm (DURAN *et al.*, 2006). Quando a nanotecnologia é empregada para a produção de cosméticos obtêm-se os denominados nanocosméticos, que são cosméticos contendo sistemas nanoestruturados que tem por objetivo modificar o efeito dos ativos (ZANETTI-RAMOS, 2008; JAIN & JAIN, 2010). O fator crucial na avaliação dos riscos associados às nanoestruturas é a sua possível captura por meio da permeação transdérmica, mucosa ou folicular. Desta forma, torna-se necessário conhecer a permeação cutânea, a metabolização enzimática e a biodistribuição desses sistemas nanoestruturados a fim de melhor avaliar a segurança de uso destes produtos (FRONZA *et al.*, 2007; NOHYNEK, 2010).

O presente trabalho visa desenvolver e avaliar um nanocosmético contendo o filtro solar MCO lipossomado objetivando elevar a eficácia



fotoprotetora da formulação e aumentar a sua segurança mantendo o MCO por mais tempo no seu sítio de ação: o estrato córneo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Radiação Solar

A radiação solar abrange todo o espectro eletromagnético, incluindo energia cósmica de alta e baixa energia; raios gama; raios ultravioletas (UV) de alta e baixa energia; luz visível; radiação infravermelha (IV); microondas, e finalmente ondas de rádio (FIGURA 1). Radiação com comprimento de onda de alta energia ( $\lambda < 10$  nm) desloca os elétrons das moléculas para formar íons, e são consideradas radiações ionizantes. Radiação UV, visível e IV com baixo comprimento de onda não possuem a energia requerida para esse processo, e são classificadas como radiação não ionizante (KIRCHOFF, 1995; SHAATH *et al.*, 2005).

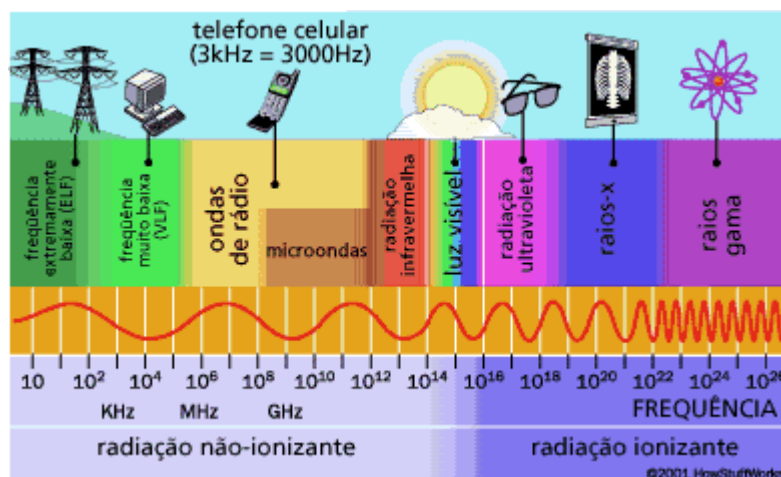


FIGURA 1: Ilustração esquemática do espectro eletromagnético.

<http://refensdafisica.tumblr.com/post/19975814934/espectro-eletromagnetico>. Acessado em 25/01/2012.

Os comprimentos de onda das radiações que alcançam à superfície terrestre estão compreendidos entre 290-2000 nm. A radiação ultravioleta corresponde a 5% do total de radiação solar que atinge a superfície terrestre e é responsável por ocasionar danos à pele (SANTOS, 1986; VIGLIOGLIA, 1989; IARC, 1992; RAMOS, 1995).

### 2.1.1 Radiação Ultravioleta

A radiação ultravioleta é a região do espectro eletromagnético compreendida entre 100 e 400 nm, sendo dividida, segundo sua faixa de comprimento de onda, em três regiões distintas: UVA ( $\lambda = 320-400$  nm), UVB ( $\lambda = 290-320$  nm) e UVC ( $\lambda = 100-290$  nm). A radiação UVA ainda pode ser subdividida em UV-A1 ( $\lambda = 340-400$  nm) e UV-A2 ( $\lambda = 320-340$  nm) (SHAATH *et al.*, 2005).

Existem vários fatores que podem influenciar os níveis de radiação ultravioleta que chegam à superfície terrestre (IARC, 1992):

*Horário do dia:* A quantidade de radiação recebida varia com os ângulos de incidência com que esta radiação chega à superfície terrestre. No horário de 6:30 às 17:30h, maior incidência dos raios UVA e das 9:30 às 15:00 h, incidência dos raios UVB.

*Clima:* Há uma grande variação na quantidade de raios UV que chegam à superfície terrestre, nas regiões de clima temperado. Esta variação é muito menor que nas regiões próximas ao Equador.

*Latitude:* A incidência anual de raios UV diminui quanto maior a distância do Equador.

*Altitude:* Os níveis de radiação UV são muito menores em regiões abaixo do nível do mar. Observa-se que um aumento de 300 m de altitude aumenta em cerca de 4% a intensidade da luz solar.

*Presença de nuvens:* A presença de nuvens reduz os raios UV que chegam à superfície terrestre. Em dias nublados, recebe-se aproximadamente 10% a menos da radiação UVB do que em dias ensolarados (RAMOS, 1995).

Aproximadamente 30-40% da radiação UV é absorvida pelas camadas mais externas da atmosfera terrestre através da camada de ozônio. As moléculas de oxigênio, sob a ação constante dos raios UV do sol, quebram e depois se recombinam formando o ozônio, sendo assim, o papel da camada de ozônio é absorver o excesso de radiação UV. Isto evita doenças como feridas na pele, câncer e até mutações. Existem, porém diversas substâncias lançadas na atmosfera que reagem com o oxigênio do ar diminuindo a

formação do ozônio, dentre elas os clorofluorcarbonos (CFCs). O cloro resultante da decomposição dos CFCs pela radiação UV ataca as moléculas de oxigênio impedindo a formação do ozônio. Este fenômeno de diminuição da camada de ozônio foi constatado pela primeira vez em 1982. Portanto, as radiações UVC e UVB de baixo comprimento de onda são bloqueadas, e uma quantidade mínima da radiação UVA é filtrada (SHAATH *et al.*, 2005; <www.cptec.inpe.br/glossario> acessado em 18/01/2012).

A depleção da camada de ozônio tem um impacto direto sobre o aumento da exposição da radiação UV na superfície terrestre. Estima-se que 1% da diminuição da camada de ozônio ocasione um aumento de 1 a 2% dos casos de câncer de pele (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

### **2.1.2 Efeitos Benéficos da Radiação Ultravioleta**

A exposição à luz solar, dependendo da intensidade, frequência e características individuais, pode resultar em efeitos benéficos ao ser humano: sensação de bem estar físico e mental, estímulo à circulação sanguínea periférica, elevação na capacidade de formação da hemoglobina, prevenção e cura do raquitismo, melhora no tratamento da psoríase e de certas infecções cutâneas e estímulo à produção de melanina, com conseqüente bronzeamento. Entretanto, a radiação solar também pode causar danos ao organismo, caso não se tome os devidos cuidados com o tempo de exposição ao sol (VELASCO DE PAOLA & RIBEIRO, 1998; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005; GILABERTE, 2010).

### **2.1.3 Efeitos Nocivos da Radiação Ultravioleta**

A radiação UVA predomina sobre os raios UVB na superfície terrestre e penetra profundamente na derme (FIGURA 2). Os efeitos em curto prazo desencadeados pela exposição solar, na faixa da radiação UVA (315 a 400 nm) são: pigmentação imediata da pele, que é provocada pelo aumento da atividade da tirosinase e pela fotooxidação da melanina existente, mudanças

na distribuição dos melanócitos na epiderme e eritema que pode ser induzido por ambas as radiações UVA e UVB. A resposta à radiação UVA é variável para cada indivíduo (SHAATH *et al.*, 2005; SCHUELLER & ROMANOWSKI, 2000; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005, GILDABERTE, 2010).

A exposição solar crônica, ou seja, a exposição prolongada e excessiva na faixa da radiação UVA resulta no fotoenvelhecimento, que ocorre quando elementos-chaves de suporte da pele são danificados por esta radiação. Trata-se de um processo cumulativo que contribui para a formação de rugas, flacidez e outros sinais de envelhecimento precoce e como consequência mais grave, pode-se citar a indução ao câncer de pele, dependendo da tonalidade da pele, tempo e intensidade de exposição (VELASCO DE PAOLA & RIBEIRO, 1998; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

A radiação UVA também pode causar danos no ADN por processos oxidativos através da geração de espécies reativas de oxigênio. Estas espécies reativas induzem o aumento da síntese de melanina, ocasionando o bronzeamento da pele. Além disto, pode causar peroxidação das membranas lipídicas das células gerando inflamação cutânea. Esta oxidação de lipídios e proteínas pode afetar no reparo do ADN. Deste modo, a radiação UVA danifica o ADN pela quebra dos filamentos e pela oxidação dos ácidos nucleicos (SHAATH *et al.*, 2005; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

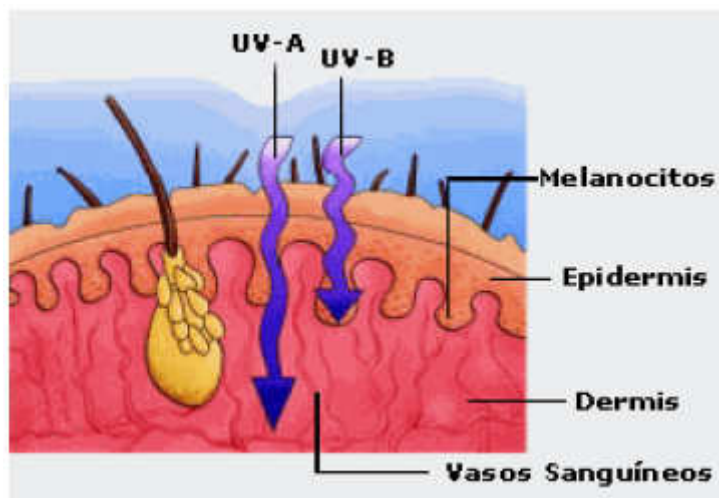


FIGURA 2: Penetração da radiação UVA e UVB na pele. Disponível em <http://sofavoritosdanet.blogspot.com.br/2012/02/protetor-solar.html> Acessado em 20/01/2012

A radiação UVB é predominante na superfície terrestre no período entre 10 e 14 horas. Ela afeta principalmente a camada epidérmica da pele (FIGURA 2), onde causa eritema (queimadura solar), que aparece de 3 a 4 horas após a exposição e se intensifica de 12 a 24 horas. É acompanhado por edemas, dores, prurido, pela formação de bolhas e espessamento da epiderme e da derme (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

A exposição excessiva frente à radiação UVB pode causar fotoenvelhecimento, imunossupressão, fotocarcinogênese, pois as bases do ADN e das proteínas são capazes de absorver a radiação UVB. Quando os ácidos nucléicos absorvem esta radiação são formados fotoprodutos como dímeros de pirimidina. Esses fotoprodutos podem ser mutagênicos ou citotóxicos se não forem reparados (VELASCO DE PAOLA & RIBEIRO, 1998; OSTERWALDER, LUTHER & HERZOG, 2000; GILDABERTE, 2010).

Os raios UVC são portadores de elevada energia, característica que os torna extremamente lesivos aos seres vivos. São absorvidos pelas camadas mais elevadas da atmosfera e a camada de ozônio presente na estratosfera impede que atinjam a superfície terrestre. Esta propriedade justifica a

preocupação com a destruição desta camada (VELASCO DE PAOLA & RIBEIRO, 1998).

## **2.2 Pele Humana**

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 15% do peso corporal. A pele humana é composta principalmente de duas partes: a epiderme e a derme. A epiderme é constituída por tecido epitelial de revestimento e a derme por tecido conjuntivo (fibras colágenas e elásticas envoltas por substância fundamental (gel composto principalmente por mucopolissacarídeos ácidos); vasos sanguíneos e linfáticos; nervos e terminações nervosas, além dos folículos pilosíbulos e glândulas sudoríparas) (FIGURA 3). A epiderme apresenta como principais funções a proteção e o equilíbrio hidroeletrolítico e a derme possui funções de termorregulação, percepção e proteção (AZULAY & AZULAY, 1999; DANGELO & FANTINI, 2005; RIBEIRO, 2006).

A epiderme é a camada mais externa da pele e sua espessura varia de acordo com a região do corpo. O tecido epitelial é estratificado, avascular e possui uma estrutura multilamelar (AZULAY & AZULAY, 1999; ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000). A epiderme é subdividida de fora para dentro em: estrato córneo (EC), estrato granuloso, estrato espinhoso e por último o estrato basal.

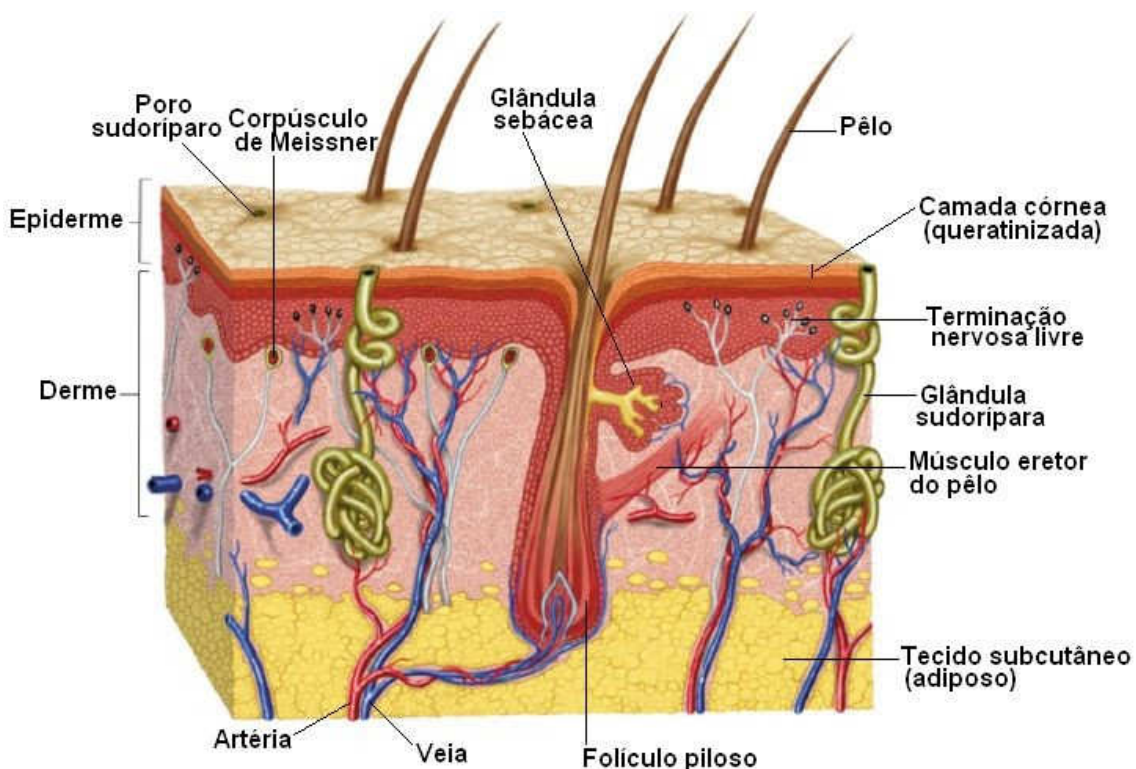


FIGURA 3: Estrutura da pele.

Disponível em: <http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>.

Acessado em 12/08/2013

Em movimento ascendente de proliferação do estrato basal, as células se alteram de forma ordenada, metabolicamente ativas e se dividem em células densas, funcionalmente mortas e queratinizadas: os corneócitos. Estas células são envolvidas por uma camada lipídica multilamelar que forma o espaço extracelular e constitui a camada mais externa da epiderme: o estrato córneo (EC) (DANGELO & FANTINI, 2005).

Na epiderme, encontra-se o sistema melanocítico formado pelos melanócitos que são células produtoras da melanina e localizam-se na camada basal. A melanina é o pigmento que confere a coloração da pele. É capaz de refletir e absorver a radiação visível e UV e dissipá-la preferencialmente na forma de calor, protegendo a pele dos danos provocados por essa radiação (KULLANIJAYA & LIM, 2005).



O ácido urocânico, também localizado na epiderme, tem absorção máxima no UV em 277 nm possuindo um importante papel na proteção do tecido cutâneo contra a radiação solar (KULLANIJAYA & LIM, 2005).

O estrato basal ou camada germinativa é composto por células jovens, colunares e justapostas responsáveis pela renovação das células da epiderme. As células do estrato espinhoso apresentam projeções citoplasmáticas, os desmossomas, que ancoram as células umas às outras. Nas camadas mais externas do estrato espinhoso, as células começam a se tornar mais parecidas com as células do estrato granuloso. A camada granulosa é constituída por células que possuem grânulos de querato-hialina em seu citoplasma e são precursores da queratina do EC (ZATZ, 1993; AZULAY & AZULAY, 1999; MENON, 2002).

A camada córnea ou o EC é a camada mais externa da pele, sendo formada por cerca de 18 a 21 camadas de células “mortas”, queratinizadas, alongadas, chamadas de corneócitos. Os corneócitos, ricos em queratina, são produtos finais da diferenciação dos queratinócitos produzidos na epiderme viável (MENON, 2002).

O espaço entre os corneócitos é preenchido por lipídios. Dessa maneira é possível observar na barreira da pele dois componentes: o componente hidrofílico, a queratina, e o componente hidrofóbico, os lipídios. Portanto, o EC pode ser descrito como uma “parede de tijolos”. Os corneócitos repletos de queratina podem ser simbolizados como “tijolos”, enquanto que o meio extracelular lipídico podem ser simbolizados como “cimento” (MOSER, 2001; BOUWSTRA, 2002; MENON, 2002).

Os lipídios encontrados no EC estão organizados em camada dupla, formando estruturas arredondadas. Essa barreira de lipídios é composta de 40-49% de ceramidas; 20-25% de colesterol; 10% de sulfato de colessterila; 0,7% de éster de colessterila; 0,1% de fosfolipídeos; 2,6% de triacilgliceróis e cerca de 25% de ácidos graxos livres. Os lipídios são responsáveis pela função de barreira à perda de água e entrada de substâncias no EC. A quantidade de lipídios varia de 3 a 46% nas diferentes áreas do corpo (MOSER, 2001; BOUWSTRA, 2002).

O EC é a principal barreira para a difusão de substâncias através da pele. É responsável também pela reflexão de 5 a 10 % da radiação UV proveniente do sol (MENON, 2002; LÉPORI, 2002; BOUWSTRA, 2002).

Embora seja composto de células “mortas”, o EC é um local de considerável atividade metabólica. Entretanto, ao contrário de outros tecidos, seu metabolismo é extracelular e deve-se principalmente as enzimas excretadas pelos corpos de Odland situados no citoplasma dos queratinócitos. Essas enzimas são, geralmente, hidrolases, dentre elas estão as glicosidases, lipases, fosfolipases, estearases, sulfatases e proteases. Elas agem principalmente na junção entre o estrato granuloso e o estrato córneo sendo responsáveis pela composição lipídica do “cimento” extracelular do EC e pela degradação de substâncias exógenas que penetram na epiderme (FORESTIER, 1992).

A permeação de substâncias na pele pode ocorrer por difusão passiva através da penetração transcelular, intercelular e transanexal por meio dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e dispositivo pilossebáceo (FIGURA 4). Entretanto, a penetração dos ativos pelos apêndices não é significativa, uma vez que estas estruturas representam uma pequena fração da área superficial da pele (apenas 1%) (SUHONEN, 1999; BARRY, 2001; HADGRAFT, 2001).

A via transcelular requer múltipla partição dos ativos entre os corneócitos e os lipídios intercelulares, o que dificulta a permeação por esta via (MIGRATORI, 2000). Na via intercelular, a molécula passa através dos domínios lipídicos, situados entre os corneócitos. Este transporte envolve uma interação do soluto com os componentes lipídicos do espaço intercelular. É considerada a principal via para a permeação da maioria dos fármacos (SUHONEN, 1999). Entretanto, para ambas as vias, a estrutura do EC controla a difusão dos permeantes, pois se comporta como uma membrana artificial semi-permeável.

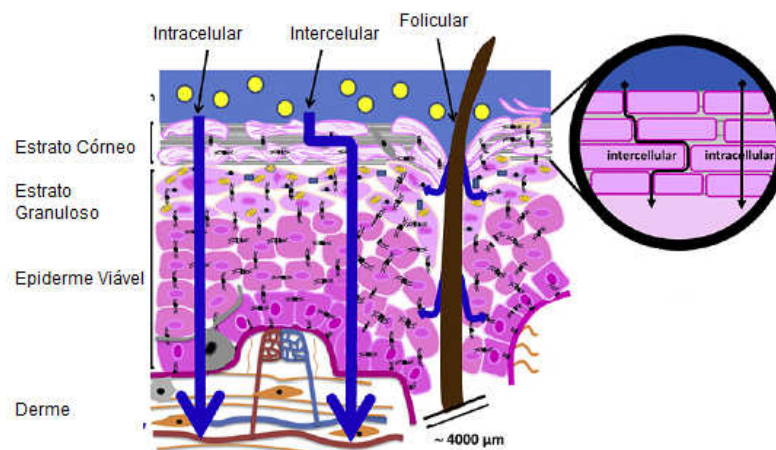


FIGURA 4: Representação diagramática do transporte de fármacos através do estrato córneo. Adaptado de BOLZINGER *et al*, 2012.

De acordo com BLANCO *et al.*, (2003), as substâncias administradas pela via tópica ou transdérmica deveriam possuir propriedades físico-químicas específicas para possibilitar sua penetração na pele, tais como: elevada hidrofiliabilidade, lipossolubilidade e peso molecular inferiores a 500 Da. Desta forma, o ativo destinado à proteção solar deve ter peso molecular superior, pois será mais difícil sua permeação. Caso contrário, elas podem passar pelos domínios lipídicos entre os corneócitos e difundir-se através das diferentes camadas da epiderme (MARTINI & SEILLER, 2006). É importante ainda que os filtros solares apresentem uma adequada lipofiliabilidade, propriedade essencial para que estas moléculas fiquem aderidas nos domínios lipídicos do EC (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001). Devido aos fatores supracitados, torna-se necessária a realização de ensaios para avaliar a penetração/permeação cutânea destas moléculas.

Outro fator que deve ser considerado é a natureza dos componentes da formulação, pois estes podem promover modificações nas propriedades do EC, alterando sua resistência natural, retendo ou liberando a substância ativa para a pele. Dentre estes pode-se citar: água; tensoativos; ácidos graxos; álcoois, álcoois graxos e glicóis; uréia e outros (LEONARDI & CAMPOS, 1997; WILLIAMS & BARRY, 2004); assim como, sistemas nanoestruturados como

lipossomas e ciclodextrinas (LEONARDI & CHORILLI, 2006; LOFTSSON & MASSON, 2001).

Os fatores biológicos como o estado da pele, a presença de alguma patologia, a idade da pele, o fluxo sanguíneo, o metabolismo, a região da aplicação, o grau de hidratação e o modo de aplicação da formulação também podem alterar a permeabilidade da pele (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; AULTON, 2005).

### 2.2.1 Aspectos Teóricos sobre Mecanismos de Penetração Cutânea

A penetração cutânea de ativos na pele ocorre através da difusão passiva, e tem como etapa limitante à camada com maior resistência à difusão, o EC. No processo de difusão passiva, as moléculas se movem de uma região do sistema mais concentrada para outra região menos concentrada sem que haja gasto de energia. Este processo ocorre de maneira aleatória e depende de um gradiente de concentração (HADGRAFT, 2001; NETZ, GONZALEZ & ORTEGA, 2002).

O processo de difusão de ativos através do EC pode ser explicado através de três etapas:

- 1) O ativo difunde-se de dentro da formulação para a superfície do EC;
- 2) Ocorre a passagem do ativo para o interior do EC, controlada pelo coeficiente de partição;
- 3) O ativo difunde-se através do EC.

O processo de transporte de ativos na/atraves da pele pode ser descrito pela primeira Lei de Fick (EQUAÇÃO 1). A hipótese básica é que a taxa de transferência da substância difundida por unidade de área de uma seção é proporcional ao gradiente de concentração medido perpendicularmente a esta seção (AULTON, 2005).

EQUAÇÃO 1: Primeira Lei de Fick.

$$J_{ss} = \frac{D \cdot K_p \cdot (C_1 - C_2)}{h}$$

Portanto, a primeira lei de difusão de Fick é empregada para descrever o fluxo ( $J$ ) que se estabelece no estado estacionário (ss) por área em termos: da partição do permeante entre a formulação aplicada e a pele ( $K_p$ ); do seu coeficiente de difusão ( $D$ ); da diferença de concentração do permeante através da pele ( $C_1 - C_2$ ) e do comprimento difusional ( $h$ ) em função do tempo, obedecendo à condição *sink* (MOSER, 2001; HADGRAFT, 2001). Esta lei pode ser exemplificada através da Figura 5.

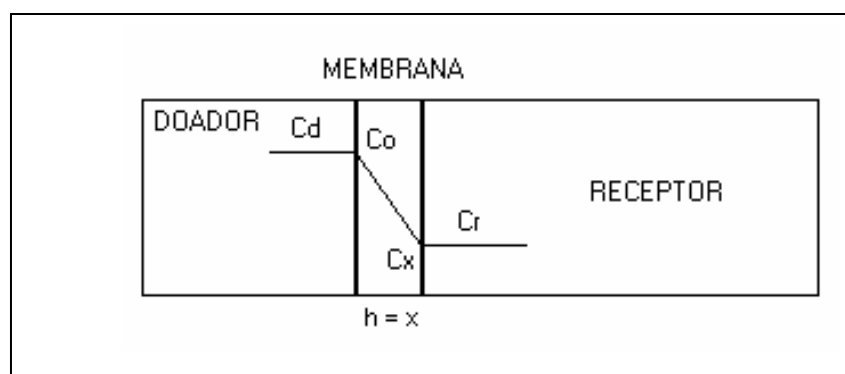


FIGURA 5: Esquema de aplicação da primeira lei de Fick.

De acordo com ROUGIER *et al.*, (1990), o EC pode ser assumido como uma membrana homogênea (espessura  $h$ ) e a concentração do permeante ( $C_o$ ) dentro da primeira camada da membrana ( $x = 0$ ) depende da sua concentração na formulação ( $C_d$ ) e do coeficiente de partição ( $K_p$ ) entre a membrana e a formulação.

Para todos os valores de tempo, a concentração do permeante dentro da última camada da membrana ( $x = h$ ) obedece à condição *sink* (logo  $C_x \ll C_o$  e também  $C_r \ll C_d$ ), assim, assumindo instantâneo transporte estacionário, isto é, fluxo imediato e constante no tempo.

Desta forma, a primeira lei de Fick é aplicável somente para membranas consideradas homogêneas, isto é, naquelas em que a condição *sink* ou a variação no coeficiente de permeabilidade ao longo de sua espessura e o fluxo de passagem da substância é constante desde o início. Porém, isso não é

observado para uma membrana heterogênea como a pele, ou mais especificamente para o EC (AULTON, 2005; MOSER, 2001).

A segunda lei de Fick leva em consideração as variações que uma membrana heterogênea e complexa como a pele oferece. Portanto, a segunda lei é aplicada para saber como varia a concentração do fármaco no interior da membrana em função do tempo (SINGH & SINGH, 1993). A mudança na quantidade cumulativa do fármaco (Q) que passa através da membrana por unidade de área como função do tempo é representada na FIGURA 6.

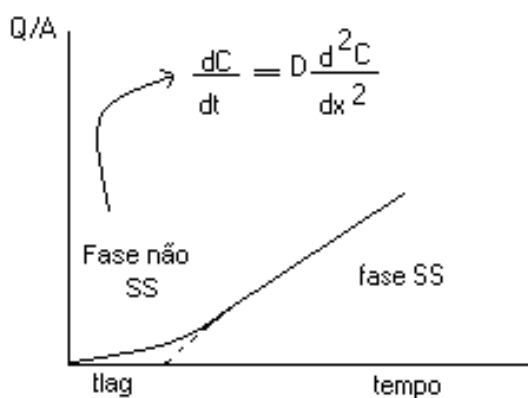


FIGURA 6: Representação gráfica do lag-time (*tlag*). Adaptado de Freitas (2005).

Quando a linha do SS é extrapolada até o eixo x (tempo), o intercepto corresponde ao *tlag* (ROUGIER *et al.*, 1990), que é definido como o tempo em que o gradiente de concentração do fármaco se estabiliza no interior da membrana.

Assumindo que a concentração do fármaco no compartimento doador é constante, que a condição *sink* é perfeita, que não há degradação ou ligação do permeante na membrana e que o equilíbrio na interface é instantâneo, o desdobramento matemático da 2ª lei de Fick, resultará, no tempo infinito, na expressão abaixo (equação do SS):

$$Q/A = K_p D C_d / h (t - t_{lag} / 6D)$$

Quando  $Q = 0$  (extrapolação da linha SS), o intercepto no eixo X corresponde ao *tlag* (FIGURA 6). A equação acima resultará em:

EQUAÇÃO 2: Segunda Lei de Fick.

$$t_{lag} = h^2/6D$$

De modo que, pode-se estimar o coeficiente de difusão (D), conhecendo-se a espessura da membrana (h).

### 2.3 Filtros Solares

Durante os últimos 40 anos, um grande número de diferentes moléculas foi introduzido no mercado mundial para atuarem como filtros solares: ácido tânico (1925); salicilato de benzila (1931); derivados do ácido para-aminobenzóico (PABA) e derivados de 2-fenilimidazóis (1942); ácido antranílico (1950); vários cinamatos (1954); e benzofenonas (1965) (URBACH, 2001).

Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) disponibiliza a listagem das substâncias químicas orgânicas e inorgânicas que podem ser utilizadas como filtros solares (ANVISA, 2006).

Na última década, os produtos cosméticos contendo filtros solares têm sido utilizados como uma proteção contra o fotoenvelhecimento, fotoalergias, câncer de pele e danos causados por radicais livres. As preparações anti-solares mais modernas utilizam uma combinação de diversos filtros orgânicos e inorgânicos, para garantir proteção frente à radiação ultravioleta (NOHYNEK & SCHAEFER, 2001; DAMIANI *et al.*, 2006).

#### 2.3.1 Filtros Inorgânicos

Os filtros solares inorgânicos, dióxido de titânio e óxido de zinco, refletem e dispersam a radiação ultravioleta e visível. Porém, dependendo do tamanho da partícula, também podem absorver a radiação ultravioleta. Estes filtros são muito fotoestáveis, e devido as suas propriedades de espalhamento de luz, apresentam menor variabilidade no seu efeito fotoprotetor quando comparados aos filtros orgânicos. Além disso, não apresentam propriedades

irritantes nem sensibilizantes à pele humana (SHAATH, 1997; LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007).

De uma maneira geral, os filtros inorgânicos são considerados mais seguros. De acordo com Lautenschlager, Wolf & Pittelkow (2007), não foram encontradas evidências da penetração do dióxido de titânio e do óxido de zinco em estudos *in vitro* empregando sistema bicompartimental de difusão vertical e pele animal (pele suína). Assim como, nos estudos de retenção *in vitro*, através da técnica de *tape stripping* utilizando pele suína, não foi demonstrada a penetração dos filtros inorgânicos através do EC (SCHULZ *et al.*, 2002), indicando que estes filtros não têm a capacidade de permear a pele e, conseqüentemente, não causam efeitos adversos.

Os filtros inorgânicos são cosmeticamente inaceitáveis devido a sua opacidade e oclusividade, pois proporcionam uma película branco-leitosa sobre a pele. Recentemente, foram desenvolvidos filtros solares inorgânicos micronizados e encapsulados de alta qualidade. Com a redução do tamanho das partículas para 10-50 nm ocorre a diminuição do espalhamento da luz visível, levando ao desenvolvimento de um produto cosmético esteticamente aceitável (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007; LAUTENSCHLAGER, WOLF & PITTELKOW, 2007).

As preparações antissolares que contêm somente filtros inorgânicos são geralmente recomendadas para crianças. Isto ocorre devido à baixa penetração e subsequente degradação destas substâncias no corpo, além da ausência de relatos de casos de fotoalergia e de fototoxicidade *in vivo* (LAUTENSCHLAGER, WOLF & PITTELKOW, 2007).

### **2.3.2 Filtros Orgânicos**

A maioria dos filtros orgânicos são compostos aromáticos, dissubstituídos, que apresentam um grupamento carbonila, de 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 carbonila (FIGURA 7).



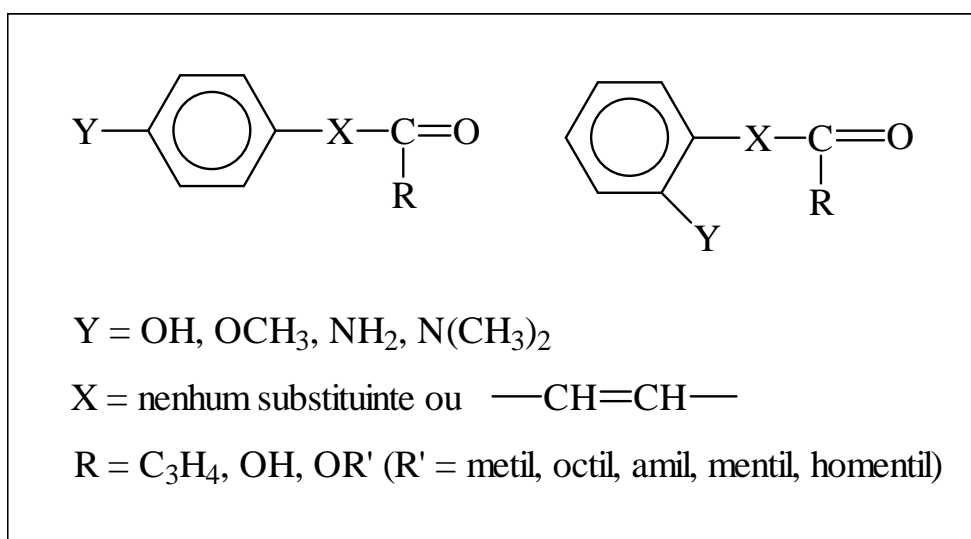


FIGURA 7: Fórmula estrutural genérica da maioria dos filtros solares orgânicos  
 Adaptado de SHAATH, 1997.

Ao absorverem a radiação ultravioleta (FIGURA 8), os elétrons situados no orbital  $\pi$  HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) são excitados para o orbital  $\pi^*$  LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia) e ao retornarem para o estado inicial, o excesso de energia é liberado em forma de calor. As transições eletrônicas que estão envolvidas durante a absorção da luz ultravioleta ocorrem entre a diferença de energia HOMO-LUMO (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007).

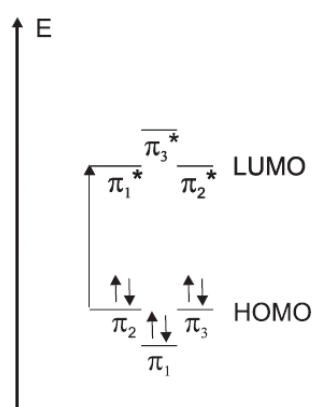


FIGURA 8: Alteração de nível energético dos elétrons em filtros solares orgânicos quando ativados pela radiação UV

Sendo assim, substâncias que apresentam a configuração citada anteriormente absorvem a radiação ultravioleta de menor comprimento de onda, ou seja, comprimento de onda que transporta alta energia, e liberam esta energia na forma de uma radiação de elevado comprimento de onda, ou seja, baixa energia. A energia absorvida da radiação ultravioleta corresponde à energia requerida para causar uma excitação fotoquímica na molécula do filtro solar.

Os filtros solares orgânicos são classificados em filtros solares UVA e UVB dependendo do tipo de radiação a qual eles conferem proteção (SHAATH, 1997):

- Filtros solares UVA absorvem radiação entre 320 a 360 nm, exemplo: benzofenonas e antranilatos.
- Filtros solares UVB absorvem radiação entre 290 e 320 nm, exemplo: PABA, salicilatos e cinamatos.

Formulações antisolares contendo filtros solares anti UVB já são utilizadas com frequência por décadas, enquanto que, aquelas com filtros solares anti UVA e de amplo espectro foram desenvolvidas mais recentemente (LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007).

### **2.3.3 *p*-Metoxicinamato de Octila**

O *p*-metoxicinamato de octila ou *p*-metoxicinamato de 2-etil-hexila ou octilmetoxicinamato (MCO) (FIGURA 8) é um filtro solar químico derivado da classe dos cinamatos que absorve na faixa do UVB, apresentando absorção máxima em 310nm.

Na estrutura molecular dos cinamatos há uma insaturação extra conjugada com o anel aromático e o grupamento carbonila que permite a maior distribuição eletrônica. A energia capaz de gerar essa transição eletrônica corresponde ao comprimento de onda nas proximidades de 305 nm. A presença do grupamento 2-etilhexil no carbono 8 da molécula do MCO (FIGURA 9) diminui sua solubilidade em água aumentando a substantividade das formulações fotoprotetoras que o contêm (SHAATH, 1997).

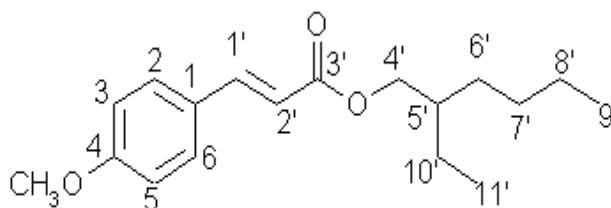


FIGURA 9: Fórmula Estrutural do *p*-metoxicinamato de octila

O MCO foi desenvolvido na década de 50 e, atualmente, é empregado na maioria das preparações antissolares. De acordo com Summers *et al.*, (2005), dentre 105 produtos fotoprotetores analisados 88,2% continham MCO. Seu uso é permitido no Brasil (ANVISA, 2006) na concentração máxima de 10% em formulações de uso cosmético. Foram relatados na literatura poucos casos de reações de fotoalergia e fotosensibilização induzidas por esta molécula (PATTANAARGSON, 2004).

O MCO é um líquido oleoso, transparente, levemente amarelado, inodoro, insolúvel em água, solúvel em etanol e óleo mineral. Seu peso molecular é 290,4 e o ponto de ebulição está na faixa de 185-195°C (THE MERK INDEX, 2001; MARTINDALE, 1999).

O principal problema relacionado ao uso do MCO é a sua capacidade de sofrer fotoisomerização. Isto por que o produto originado da fotodecomposição do MCO é o isômero *cis*-MCO que tem uma reduzida absorvidade no UV quando comparado com o *trans*-MCO (SUMMERS, 2005). Nos estudos de HUONG (2007), foi verificado que uma taxa de isomerização de 20% do MCO acarretou a diminuição de aproximadamente 10% do FPS da formulação e, para uma taxa de isomerização de 60% do MCO, a queda no FPS pode variar entre 29% e 38%.

Segundo Schlumpf *et al* (2004) o MCO foi capaz de estimular a proliferação *in vitro* de células MCF-7 (células sensíveis ao estrogênio) e apresentar atividade estrogênica no teste uterotrófico com ratas *Long-Evans* jovens. Em relação a ações hormonais, este filtro apresentou atividade antiandrogênica nas concentrações de 1,0 nM até 10,0 nM, quando testados

em receptores de células MDA-kb2 de carcinoma de mama humana (MA *et al.*, 2003). Outro estudo demonstrou o aumento da produção de vitelogenina, um marcador clássico de atividade estrogênica, em peixes Medaka machos (INUI *et al.*, 2003).

## 2.4 Lipossomas

Bargham e colaboradores (1963) foram os primeiros a descrever o comportamento de fosfolípidios quando colocados em solução aquosa formando vesículas dotadas de bicamadas semelhantes à membrana celular a partir da agregação espontânea das moléculas dos fosfolípidios (BARGHAM *et al.*, 1963).

Os lipossomas podem ser definidos como associações coloidais de fosfolípidios que se organizam espontaneamente em estruturas fechadas como vesículas esféricas, nas quais o veículo aquoso é totalmente cercado pela membrana composta de moléculas lipídicas (FIGURA 10). As vesículas possuem uma ou mais bicamadas lipídicas que aprisionam compartimentos aquosos (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; GÓMEZ-HENZ & FERNANDEZ-ROMERO, 2006; SANTOS & CASTANHO, 2002).

Os lipossomas podem ser preparados a partir de moléculas de fosfolípidios que podem ser extraídas e purificadas de fontes naturais ou de síntese química e podem conter outros constituintes na bicamada como o colesterol e os polímeros hidrofílicos (LIAM & HO, 2001; SANTOS & CASTANHO, 2002).

Inicialmente, os lipossomas tiveram um grande interesse como carreadores de fármacos para a administração intravenosa, uma vez que os lipossomas podem fundir-se com a membrana plasmática das células do sítio alvo. Entretanto, a meia vida dessas substâncias foi encurtada devido aos mecanismos de defesa do sistema mononuclear fagocitário retirando os lipossomas rapidamente da circulação (GLAVAS-DODOV *et al.*, 2002).

Nos últimos anos os lipossomas passaram a assumir um papel importante nas áreas da dermatologia e cosmetologia. Os lipossomas têm sido

amplamente utilizados como veículo em formulações cosméticas, em razão da sua estrutura que proporciona a encapsulação de substâncias ativas hidrofílicas e lipofílicas. Os ativos lipofílicos podem ser incorporados na bicamada lipídica, e os ativos hidrofílicos são solubilizados no interior do espaço aquoso (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; MEHNERT & MADER, 2001; SANTOS & CASTANHO, 2002). Além disto, sua estrutura em bicamada fosfolipídica, semelhante à estrutura das membranas celulares, os tornam capazes de interagir com as células do organismo (RAMÓN *et al.*, 2005).

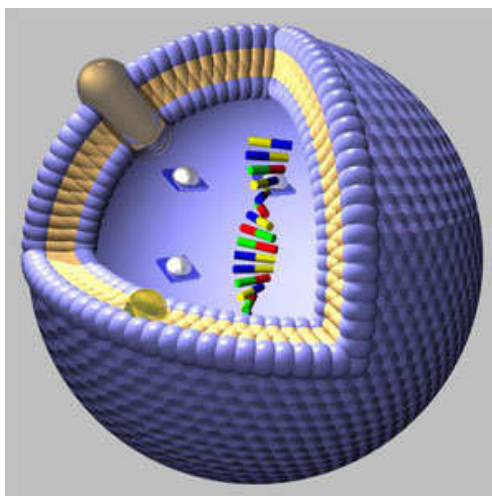


FIGURA 10: Estrutura Esquemática do lipossoma. Disponível em <<http://quimicaparatodosuevora.blogspot.com.br/2011/01/lipossomas-e-as-suas-aplicacoes-na.html>>

Sendo assim, as principais vantagens para a utilização dos lipossomas são: baixa toxicidade do sistema vesicular, diminuição de efeitos adversos de fármacos, o aumento da eficácia terapêutica, que consiste na redução das concentrações dos ativos nas formulações lipossomais para a obtenção do mesmo efeito terapêutico e biodegradabilidade. A biodegradabilidade e a baixa toxicidade dos lipossomas são conferidas pelos fosfolipídios que os constituem, garantindo uma grande similaridade com as membranas celulares (SUZUKI & SAKON, 1990; NEW, 1997).

Estas vesículas foram desenvolvidas para melhorar a biodistribuição de fármacos em locais específicos do corpo humano. Portanto, passaram a ser

reconhecidos como transportadores de compostos biologicamente ativos, tendo a capacidade de potencializar e/ou modificar a atividade dos compostos com os quais eles estão associados. Este efeito é dependente da composição química e da estrutura fosfolipídica (GÓMEZ-HENZ & FERNANDEZ-ROMERO, 2006).

A transferência ou troca de lipídios tem um efeito especial na aplicação cosmética, já que os lipossomas podem alterar as propriedades cutâneas através do fornecimento de fosfolipídios, ceramidas e colesterol e outros componentes para pele. Segundo Imbert *et al.*, (1994), os lipossomas aumentam as concentrações do princípio ativo tanto na epiderme como na derme, e reduzem a absorção sistêmica (BETZ *et al.*, 1995).

O caráter mimético do lipossoma em relação a estruturas lipídicas do EC sugere que os fosfolipídios deste sistema ligam-se superficialmente a camada lipídica do EC, recobrando a pele com um filme lipídico. A forte afinidade da camada lipídica pelos lipossomas leva a ruptura de algumas vesículas, e, posteriormente, os fosfolipídios não ligados à bicamada lipídica podem penetrar nas camadas mais profundas da pele, podendo desorganizar a estrutura de bicamada do EC, diminuindo a função de barreira (ELSAYED *et al.*, 2007).

A analogia estrutural do EC com o lipossoma permite que o tecido cutâneo retenha este sistema nanoestruturado, promovendo um “efeito reservatório”, com liberação sustentada do ativo, proporcionando ação prolongada, melhorando a atividade do ativo no sítio alvo (VAN DER BERGH *et al.*, 1999; BETZ *et al.*, 2005).

A FIGURA 11 traz a comparação entre uma formulação de uso tópico convencional e outra contendo lipossoma. Na formulação com lipossoma pode-se observar maior concentração deste sistema na epiderme e conseqüentemente maior concentração de ativos, e menor absorção sistêmica, o que é desejável em uma formulação tópica (PUGLIA *et al.*, 2004; ELSAYED *et al.*, 2007).

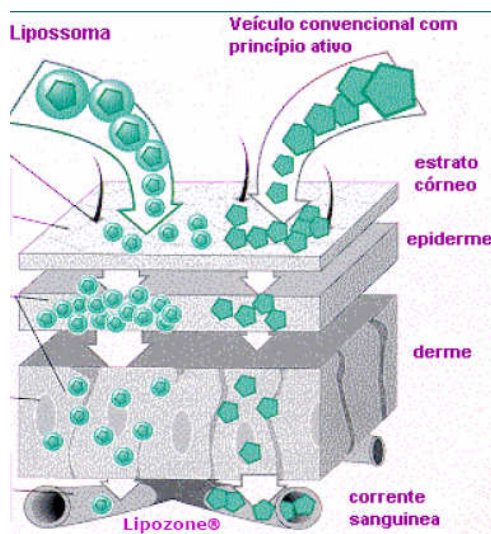


FIGURA 11: Esquema do efeito reservatório do lipossoma. Adaptado do Catálogo Lipo Chemicals INC. and Biozone Laboratories INC.

A forma e o tamanho dos lipossomas dependem do método de preparação, da composição dos lipídios, da força iônica do meio e do pH. Portanto, os lipossomas podem ser classificados com base na sua composição, tamanho e número das bicamadas lipídicas (NEW, 1997; ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; SANTOS & CASTANHO, 2002).

Dentre os diferentes fosfolipídios que podem fazer parte na formação das bicamadas vesiculares lipossomais pode-se citar: fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina hidrogenada, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-diolenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), diestearoil fosfatidil etanolamina (DSPE) (MELO *et al*, 2003). Entretanto, as moléculas de fosfatidilcolina (PC) são as mais utilizadas por possuírem carga neutra e inércia química. A PC obtida de fontes naturais é constituída por uma mistura de fosfatidilcolinas, cada uma com cadeias de tamanhos diferentes e com vários graus de insaturação (NEW, 1997). No mercado existe uma variedade de fosfolipídios sintéticos que podem ser utilizados nas preparações lipossomais (VEMURI & RHODES, 1995; GÓMEZ-HENS & FERNÁNDEZ-ROMERO, 2005).

O colesterol e os agentes indutores de carga facilitam a interação das bicamadas no processo de formação das vesículas, estabilizam os lipossomas evitando o processo de fusão e coalêscencia das vesículas e o esvaziamento do material incorporado. Portanto, o uso de colesterol aumenta a estabilidade e a resistência das vesículas pela diminuição da fluidez da membrana lipossomal. Embora o colesterol não seja essencial para a formação dos lipossomas, ele traz outros benefícios, como o aumento da retenção de substâncias hidrossolúveis e resistência a biodegradação *in vivo*. Na literatura é descrita a faixa de 30-50% como uma quantidade ótima de colesterol em relação à massa da membrana do lipossoma (YAROSH, 2001; LIAN & HO, 2001; ELSAYED *et al.*, 2007).

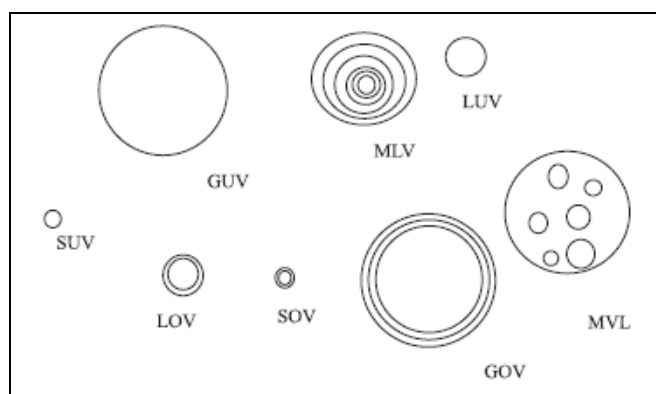


FIGURA 12: Representação esquemática da classificação dos lipossomas segundo o tamanho e número de lamelas (SANTOS & CASTANHO, 2002).

A FIGURA 12 mostra que o tamanho dos lipossomas pode variar de vesículas muito pequenas (0,025  $\mu\text{m}$ ) até vesículas grandes (3500 nm) (SHARMA & SHARMA, 1997; SANTOS E CASTANHO, 2002). Estes sistemas nanoestruturados podem possuir membranas simples ou múltiplas bicamadas, ou múltiplas lamelas. Baseado nesses dois parâmetros, tamanho e número de lamelas, os lipossomas podem ser classificados em várias categorias: vesículas multilamelares grandes (MLV) são formadas por múltiplas bicamadas, seu diâmetro varia de 400 a 3500 nm, apresentam grande capacidade de encapsulação de ativos lipofílicos. Tem como principal



vantagem o fácil preparo com um mínimo de equipamentos e são mais estáveis durante longo período de armazenamento; vesículas unilamelares pequenas (SUV) são formadas por uma bicamada única, seu diâmetro varia de 25 a 50 nm. A principal vantagem é a população relativamente homogênea. Porém, são consideradas termodinamicamente instáveis, susceptíveis a agregação e fusão. Existem também as vesículas unilamelares grandes (LUV), formadas por uma bicamada única com elevada razão entre volume aquoso e taxa lipídica com diâmetro que varia de 200 a 1000 nm. Sua vantagem é alta capacidade de encapsulamento de ativos hidrofílicos (SHARMA & SHARMA, 1997).

A natureza e as características dos lipossomas são condicionadas pelo seu método de preparo. As MLVs geralmente são obtidas através do método de hidratação do filme lipídico (SANTOS & CASTANHO, 2002; ELSAYED *et al.*, 2007). As LUVs podem ser obtidas por diversos métodos como: injeção de solvente (éter ou etanol), fusão induzida por cálcio e técnicas de evaporação em fase reversa (VEMURI & RHODES, 1995). As SUVs podem ser preparadas a partir das MLVs ou por técnicas comumente empregadas como sonicação das LUVs, extrusão, injeção de solvente ou por um método alternativo através da injeção de etanol (SHARMA & SHARMA, 1997). Além dessas vesículas, deve-se também levar em consideração as vesículas unilamelares gigantes ou GUV, com dimensões superiores a 1µm, podendo chegar a dezenas de µm, tamanho comparado a uma célula eucariota. A literatura define ainda uma classe de vesículas unilamelares médias ou MUV (médium-sized unilamellar vesicles), com diâmetros compreendidos entre os SUV e os LUV. Também podemos encontrar os lipossomas multivesiculares ou MLV (multivesicular liposomes) e as vesículas oligolamelares (oligolamellar vesicles) que, como as unilamelares, podem ser subdivididas em pequenas (SOV), grandes (LOV) e gigantes (GOV), conforme esquematizado na FIGURA 12 (SANTOS & CASTANHO, 2002).

Algumas limitações são encontradas durante o processo de fabricação e desenvolvimento dos lipossomas, como a falta de reprodutibilidade do tamanho das vesículas, alto custo dos processos de produção, a instabilidade e a baixa encapsulação dos ativos. A instabilidade física e química é um fator muito

importante a ser considerado. A instabilidade física está relacionada com a fusão e com o crescimento dos lipossomas formando vesículas maiores, processo conhecido como coalescência. Este processo pode levar ao rompimento das vesículas e ao extravasamento do material encapsulado (MEHNERT & MADER, 2001; EDWARDS & BAEUMNER, 2006).

A instabilidade química está relacionada com a oxidação ou hidrólise dos lipídios utilizados na formação dos lipossomas. Na hidrólise, ocorre a formação da lisofosfatidilcolina. Estes processos químicos resultam em mudanças na permeabilidade da bicamada, podendo ser minimizados pela adição de antioxidantes como  $\alpha$ -tocoferol ou BHT ou através da armazenagem dos lipossomas sob uma atmosfera de nitrogênio (HARRIGAN, MADDEN & CULLIS, 1990; EDWARDS & BAEUMNER, 2006).

A caracterização detalhada das estruturas dos lipossomas, incluindo distribuição de tamanho, número de bicamadas e volume de encapsulação é importante, pois, estes parâmetros fornecem informações sobre diferenças na estrutura causada por mudanças no método de preparo e na composição lipídica (RUOZI *et al.*, 2005).

A lamelaridade dos lipossomas pode ser avaliada através de RMN<sup>31</sup>P, microscopia eletrônica, técnicas baseadas nas mudanças de sinais visíveis e através da fluorescência de lipídios marcados com reagentes específicos também podem ser empregadas (EDWARDS & BAEUMNER, 2006). A determinação do tamanho médio dos lipossomas pode ser avaliada através do espalhamento dinâmico de luz laser (DLS), espectroscopia de correlação de fótons (ECF), por diferentes tipos de microscopia como: microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de varredura (MEV), técnica de criofratura e a microscopia de força atômica (RUOZI *et al.*, 2005).

O conteúdo de fosfolipídios dos lipossomas pode ser determinado através do ensaio de BARTLETT, por métodos enzimáticos, por técnicas cromatográficas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG). Os métodos utilizados para a determinação da eficiência de encapsulação dependem da natureza do material encapsulado; entretanto, podem ser empregados: espectrofotometria, fluorescência, métodos

enzimáticos, técnicas eletroquímicas e cromatográficas (EDWARDS & BAEUMNER, 2006).

Diversos estudos apontam que a penetração dos lipossomas intactos na pele depende das propriedades físico-químicas dos fosfolipídios. Em geral, os lipossomas não penetram no estrato córneo saudável ocorrendo penetração apenas na pele lesionada. Apesar de não penetrarem o estrato córneo os componentes dos lipossomas podem interagir como moléculas dispersas com o lipídios da pele, podendo haver efeito promotor de penetração dependendo da composição dos lipossomas. (SCHALLER & KORTING, 1996; JUNGINGER, 1992; MANCONI, 2011). Entretanto, alguns estudos mostram que o efeito do tamanho das vesículas e da lamelaridade na deposição de fármacos foi mínima sugerindo que a penetração das vesículas intactas não ocorre. Vários estudos compararam lipossomas a loções, cremes e promotores de penetração sendo observado que, os lipossomas agem como excelente reservatório (BOUWSTRA, 2002).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um nanocosmético contendo o sistema nanoestruturado lipossoma/MCO objetivando o aumento da eficácia fotoprotetora, da segurança e da capacidade de reter este filtro solar no estrato córneo formando um reservatório.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar o sistema nanoestruturado lipossoma/MCO;
- Avaliar o sistema nanoestruturado como substrato para a lipase bacteriana;
- Avaliar a biodistribuição *in vivo* do sistema nanoestruturado lipossoma/MCO marcado com tecnécio-99-m em ratos;
- Preparar as formulações em gel uma contendo o lipossoma/MCO (nanocosmético) e outra convencional contendo o MCO livre;
- Realizar teste de segurança das formulações empregando-se o teste em membrana corion-alantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM);
- Determinar os valores de FPS *in vivo* e *in vitro* das formulações com MCO livre e com lipossoma/MCO;
- Comparar o perfil de liberação do MCO do nanocosmético com a formulação com MCO livre;
- Verificar a integridade da pele como barreira nos voluntários, empregando-se a biometria cutânea com determinação de pH, teor lipídico e hidratação;  
Estudar a captação do MCO presente no nanocosmético desenvolvido empregando-se a técnica *tape stripping* em voluntários sadios.

## 4 MATERIAIS

### 4.1 Matérias-primas, solventes e reagentes

- Ácido ascórbico, Riedel-de-Haën, Alemanha
- Água destilada
- Aristoflex<sup>®</sup> (copolímero de ácido sulfônico acriloldimetiltaurato e vinilpirrolidona), Pharma Nostra, Brasil
- Cloreto de sódio, Vetec, Brasil
- Cloreto estanoso, Sigma-Aldrich, Estados Unidos
- Clorofórmio HPLC/UV, Tedia, Estados Unidos
- Colesterol, Sigma-Aldrich, Estados Unidos
- Etanol 96<sup>o</sup>GL, Rezende, Brasil
- Etanol Absoluto HPLC/UV, Tedia, Estados Unidos
- Fosfatidilcolina, Lipoid<sup>®</sup> S 100, Gerbras, Alemanha
- Fosfato de potássio monobásico, Vetec, Brasil
- Fosfato de sódio dibásico, Vetec, Brasil
- Hexano P.A. Vetec, Brasil
- Lipozyme de *Rhizomucor miehei*, Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil
- Metanol HPLC/UV, Tedia, Estados Unidos
- Metilparabeno, Fagron, Brasil
- Molibdato de amônio, Vetec, Brasil
- Padrão de Fósforo 20 $\mu$ g P/ml Sigma-Aldrich, St Louis, Estados Unidos
- Peróxido de hidrogênio, Vetec, Brasil
- p-Metoxicinamato de octila, Merck KGaA, Alemanha
- Polissorbato 80, Viafarma, Brasil
- Trishidrometilaminometano (TRIS), Vetec
- Vitamina E (alfa-tocoferol), Pharmanostra, Brasil

## 4.2 Equipamentos e Acessórios

- Balança Semi-analítica Digital – PE 3600, Mettler; Estados Unidos
- Balança Eletrônica – BG2000, Gehaka;
- Balança Analítica Eletrônica – FA2104N, Bioprecisa;
- Banho de água Bunchi modelo B-480; Alemanha
- Banho de ultra-som Thornton modelo T14; Estados Unidos
- Banho de Ultrassom – T14, Thorton; Estados Unidos
- Contador Gamma Packard-Cobra II; PerkinElmer Packard, Estados Unidos
- Cotonetes<sup>®</sup>. Johnsons & Johnsons; Brasil
- Cronômetro – YP2151, Technos;
- Espectrofotômetro UV-VIS, V630, Jasco; Japão
- Fita adesiva Transpore<sup>®</sup> 3M; Brasil
- Grade de cobre de 300 mesh, Sigma-Aldrich; Estados Unidos
- Membrana de acetato de celulose 27 mm de diâmetro, 43 mm de espessura e 0,2 $\mu$ m de diâmetro de poro, Sigma-Aldrich; Estados Unidos
- Membrana Filtrante 0,45  $\mu$ m Millipore; Estados Unidos
- Membrana de policarbonato Nuclepore<sup>®</sup> 0,4  $\mu$ m, Whatman Co., Alemanha
- Microscópio Eletrônico de Transmissão Morgani 268 da FEI (Hillsboro, OR, Estados Unidos) com tensão de 80 kV acoplado a sistema de captura câmara digital Megaview G2, Olympus, Tóquio, Japão;
- Papel Whatman nº 1, Maidstone, Reino Unido
- Pipeta automática para semi-sólidos, Transferpettor Digital 200 – 1000  $\mu$ L, Brand; Estados Unidos
- Pipetas automáticas 200, 1000 e 5000  $\mu$ L, Gilson; França
- Rotaevaporador Büchi modelo R-114; Alemanha
- Sistema filtrante Millipore 142 mm filter holder; Estados Unidos
- Sistema HPLC Gilson Bomba modelo 321, Detector UV-Vis modelo 152, regulador de temperatura modelo 831, injetor manual Rheodyne

Shimadzu modelo 7725i (Estados Unidos), coluna cromatográfica Kromasil 100 C18 de 5  $\mu$  e 250 x 4,6 mm (Estados Unidos), acoplado a um microcomputador com o software Unipoint 3.0, Gilson (Gilson, Reino Unido);

- Titulador Automático Titrando 905 da Metrohm acoplado ao software Tiamo 2.3, Suíça;
- Homogeneizador Ultra Turrax T50 IKA, Labstore; Estados Unidos
- Unidade Combinada de Biometria Cutânea: Corneometer CM 820 PC, Sebumeter SM 810 PC, e Skin pH-Meter, Courage Khazaka; Alemanha
- Zetasizer<sup>®</sup> Nano Z; Malvern Instruments, Reino Unido.

## 5 METODOLOGIAS

### 5.1 Desenvolvimento do nanossistema Lipossoma/MCO

Os lipossomas foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico (FATTAL, 1993; VEMURI, 1995) no qual os componentes da fase lipídica, composta de fosfatidilcolina, colesterol, vitamina E, e MCO (TABELA 1) foram pesados em balança analítica e transferidos para balão de fundo redondo de 1 litro. Em seguida, adicionou-se 20 mL de clorofórmio para solubilizar e misturar os componentes da fase lipídica. Esta mistura foi evaporada sob pressão, reduzida em rotaevaporador e banho-maria a 50° C, com agitação lenta e inclinação adequada do balão, durante duas horas. O filme fosfolipídico formado no fundo do balão ficou em repouso por vinte e quatro horas em refrigerador. Se após as 24 h ainda houvesse presença do solvente, o balão seria novamente submetido ao rotaevaporador por mais duas horas para garantir sua total remoção. Após a evaporação completa do solvente, 100mL de uma solução tampão de Trishidrometilaminometano (TRIS) pH 6,8 (fase aquosa), foi adicionada para hidratar o filme fosfolipídico formado no fundo do balão volumétrico sob agitação em vórtex por 15 minutos. Após a agitação, o balão foi deixado em repouso por 96 horas sob refrigeração (SANTOS, 2007). A amostra foi então homogeneizada no Ultra Turraz a 10000 rpm durante 1 minuto. Depois disso, a preparação lipossomal foi normalizada por extrusão empregando-se um suporte para filtro (Millipore®) com membrana filtrante (Nuclepore®) de policarbonato de 0,4 µm sob pressão de gás nitrogênio para forçar a passagem do material através da membrana (FIGURA 13). A suspensão lipossomal obtida foi, então, caracterizada (GARCIA, 1998; MONTEIRO, 2008).



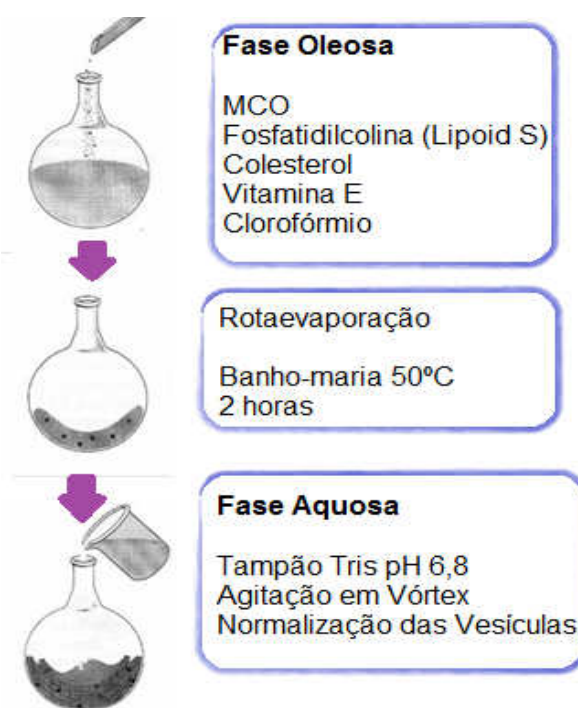


FIGURA 13: Esquema da metodologia de preparação dos lipossomas

TABELA 1: Componentes do lipossoma/MCO

COMPONENTE	QUANTIDADE (g)
<b>Fase Lipídica</b>	
Lipoid S 100 (96,6%)	21,7
Colesterol	3,1
MCO	7,2
Vitamina E	0,1
<b>Fase Aquosa</b>	
TRIS	0,242
Metilparabeno	0,1
Solução de HCl 3M	Até pH 6,8
Água destilada	Qsp 100 mL

## **5.2 Caracterização do nanossistema Lipossoma/MCO**

### **5.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão**

A visualização dos lipossomas anteriormente preparados foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão (Morgani 268, FEI) com tensão de 80 kV e sistema de captura em câmara digital (Megaview G2, Olympus). Após o preparo e a normalização, 200  $\mu$ L da suspensão contendo os lipossomas foram diluídos em balão volumétrico de 25 mL utilizando uma solução de etanol a 25%. Esta diluição deve ser realizada no momento da determinação, pois o etanol tende a romper as vesículas com o passar do tempo. Após a homogeneização, foi retirado o volume de 5  $\mu$ L desta solução, com auxílio da pipeta automática, e adicionado sobre a grade de cobre de 300 mesh da Sigma, juntamente com 5  $\mu$ L de uma solução saturada de acetato de uranila, usado como contrastante. O material foi deixado em dessecador durante 30 minutos para a secagem. As grades foram observadas no microscópio eletrônico em seguida (HENRIQUES, 2005).

### **5.2.2 Tamanho e Índice de Polidispersividade**

O diâmetro Médio (DM) e o Índice de polidispersividade (IP) dos lipossomas vazio e contendo MCO foram determinados em equipamento de espalhamento de luz a laser (Zetasizer<sup>®</sup> Nano Z; Malvern Instruments). As amostras de lipossoma foram diluídas em água purificada na proporção aproximada de 1:80 e analisadas em uma cubeta de plástico de 1 cm de caminho óptico, à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata (SOARES, 2009; VEMURI, 1995). As medidas foram realizadas logo após o preparo e após 3 meses de armazenamento em refrigerador. Os dados obtidos foram integrados com auxílio do software Zetasizer 6.32.

### 5.2.3 Potencial Zeta

O potencial zeta (PZ) das amostras de lipossoma vazio e contendo MCO foi determinado com a medição da mobilidade eletroforética das amostras em um analisador de potencial zeta (Zetasizer<sup>®</sup> Nano Z; Malvern Instruments). O potencial hidrogeniônico (pH) das soluções aquosas de lipossoma foi previamente medido em potenciômetro. Para essa análise, as suspensões de lipossoma foram diluídas em água purificada na proporção aproximada de 1:80. A amostra foi então acondicionada em célula eletroforética até que fique completamente preenchida. Todas as amostras foram analisadas com seis leituras, de onde foram calculados a média e o desvio padrão. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (SOARES, 2009; VEMURI, 1995). Os dados obtidos foram integrados com auxílio do software Zetasizer 6.32.

### 5.2.4 Rendimento de Incorporação do MCO no Lipossoma

A determinação da quantidade de MCO incorporado no nanossistema Lipossoma/MCO foi realizada por espectrofotometria de UV (Jasco V 630), os valores de absorbância foram determinados no  $\lambda$  máx (310 nm) característico deste filtro solar. Inicialmente, 50 mg de lipossoma foram pesados em balão volumétrico para o preparo das amostras; posteriormente, foi realizada uma diluição das amostras em etanol objetivando obter concentrações próximas a do ponto central da curva padrão (em torno de 6 $\mu$ g/mL).

Esta determinação foi realizada em triplicata, utilizando o etanol como branco. A concentração do MCO encapsulado foi determinada através da equação da reta da curva padrão do filtro solar, calculando-se, então, o percentual de MCO incorporado nos lipossomas (MONTEIRO, 2008).

### 5.2.5 Dosagem de Fósforo

O método utilizado para a dosagem de fósforo foi o método de Bartlett (BARTLETT, 1959). É um método indireto e colorimétrico utilizado para dosar a

quantidade de fosfolipídios nos lipossomas e nas lecitinas comerciais, através da determinação da concentração de fósforo na amostra.

O ensaio foi realizado em uma placa de aquecimento para tubos de ensaio, utilizou-se 2 tubos para o branco, 3 tubos para a amostra analisada (triplicata) e 4 tubos contendo um volume crescente de uma solução padrão de fósforo 0,65 mM (50, 100, 150 e 200  $\mu$ L). Este mesmo procedimento foi utilizado para a determinação do teor da matéria-prima Lipoid S 100<sup>®</sup> e para a determinação do rendimento da preparação dos lipossomas.

As amostras em triplicata foram diluídas em etanol, baseando-se na massa inicial de fosfolipídio presente, para obter soluções finais com concentração de aproximadamente 1 $\mu$ g de fósforo/mL (Lipoid 100%) e soluções finais com a concentração de 2,1 $\mu$ g de fósforo/mL (lipossomas). Foram pipetados 1,0 mL de cada solução diluída para cada tubo de ensaio. Em dois tubos foram pipetados 1,0 mL de etanol que serviram de branco e quatro tubos continham volumes crescentes de solução padrão de fósforo para a construção da curva padrão (FIGURA 14).

Em seguida, foram adicionados 400  $\mu$ L de uma solução de ácido sulfúrico a 10 % em todos os tubos de ensaio, com a temperatura variando de 180 a 195°C durante trinta minutos. Os tubos foram resfriados. Nesta etapa as amostras contendo o fosfolipídio sofreram uma hidrólise ácida, transformando os fosfolipídeos em fosfato inorgânico.

Na segunda etapa, foram adicionados a todos os tubos de ensaio, 100  $\mu$ L de solução de peróxido de hidrogênio a 10% v/v. Os tubos foram aquecidos novamente com a temperatura variando de 180°C a 195°C, durante trinta minutos. Em seguida, os tubos foram novamente resfriados.

A terceira etapa foi realizada adicionando 4,6 mL da solução de molibdato de amônio em todos os tubos. E a última etapa consistiu na adição de 500  $\mu$ L de solução de ácido ascórbico a 10 % p/v. Os tubos foram aquecidos a 90°C em placa de aquecimento, durante 20 minutos. Na etapa final o fosfato inorgânico formado anteriormente reage com o molibdato de amônio formando o ácido fosfomolibdico. Este por sua vez forma um complexo azul, na presença de ácido ascórbico como agente redutor.

A intensidade da cor azul é diretamente proporcional à quantidade de fósforo presente e pode ser medida espectrofotometricamente. As absorvâncias das amostras, branco e do padrão de fósforo foram determinadas em  $\lambda$  de 800 nm. Dessa forma, foi determinada a concentração de fósforo e, conseqüentemente, o conteúdo de fosfolípido, através da equação da reta da curva padrão de concentração de fósforo versus absorvância.

Portanto, o objetivo desta análise foi determinar o teor real de fosfatidilcolina na matéria prima Lipoid 100% comparando-o com o teor declarado pelo fabricante. E, para a suspensão lipossomal, o objetivo foi verificar o rendimento da preparação comparando a quantidade determinada de fosfatidilcolina com a massa adicionada (BARTLETT, 1959).

### **5.3 Hidrólise Enzimática**

Estes ensaios foram realizados com três substratos (MCO, lipossomas vazios e lipossoma/MCO) para estabelecer comparação. A lipase é uma enzima capaz de catalisar reações de hidrólise de ligações éster nos lipídios liberando ácidos graxos, conforme esquema da FIGURA 13. Estes ácidos liberados foram titulados com solução NaOH 0,025N permitindo a quantificação do substrato hidrolisado e da velocidade de hidrólise dos substratos. Para a análise do MCO, foi utilizado um meio reacional bifásico composto de 20 mL de MCO em hexano (2 mg/mL) e 25 mL de tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 8,0. Para os lipossomas, foram utilizados 45 mL da solução de lipossomas em tampão TRIS-HCl (2 mg de lipossoma/mL). Foi realizada uma pré-titulação nas misturas reacionais com NaOH 0,025 N até pH 8. As reações foram então iniciadas pela adição de 5 mL de lipase (1:40.000 em tampão TRIS). Um valor de pH de 8,5 foi mantido constante por adição de NaOH 0,025 N usando um titulador automático (Titrand 905, Metrohm, Suíça). As velocidades de hidrólise dos substratos foram obtidas e comparadas.

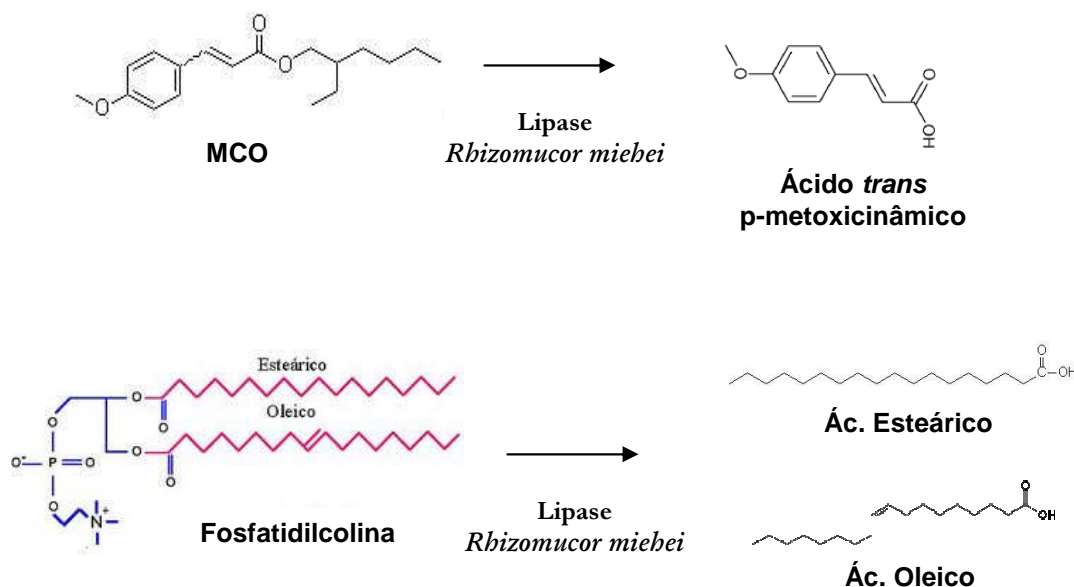


FIGURA 14: Reação de hidrólise enzimática do MCO e da fosfoatidilcolina

#### 5.4 Biodistribuição dos Lipossomas Marcados com Tecnécio-99-m

O principal objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento biológico do lipossoma/MCO e as possíveis implicações no metabolismo deste nanossistema. A marcação com tecnécio-99-m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) visa complexar o pertecnetato aos materiais lipídicos presentes nas amostras ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ). Sendo assim, o lipossoma/MCO foi marcado radioativamente com  $^{99m}\text{Tc}$  e aplicado sobre a pele íntegra e tricotomizada no dorso de ratos saudáveis avaliando-se então a sua biodistribuição em modelo animal. O nanossistema lipossoma/MCO foi comparado ao lipossoma vazio e ao filtro solar MCO puro com a finalidade de verificar se o lipossoma/MCO seria capaz de manter o MCO por mais tempo na pele (SÁ *et al.*, 2012).

A marcação das amostras (MCO, lipossoma/MCO e lipossoma vazio) foi realizada incubando-se 150  $\mu\text{L}$  de cada uma com igual volume de solução de cloreto estanoso por 20 minutos a temperatura ambiente. Esta solução foi então incubada com 100  $\mu\text{Ci}$  (aproximadamente 300  $\mu\text{L}$ ) de tecnécio-99m por

10 minutos com o intuito de marcar as estruturas com  $^{99m}\text{Tc}$ . As estruturas marcadas foram caracterizadas por cromatografia de camada fina empregando-se papel Whatman nº 1 com o objetivo de verificar se a marcação foi efetiva.

Os estudos de biodistribuição foram realizados usando-se dois ratos Wistar para cada amostra marcada. O protocolo do estudo (nº 23076002362/2010-37) foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa em Animais do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Radiofarmácia) da UFRJ.

Uma área de um  $\text{cm}^2$  no dorso dos ratos foi depilada com depilatório químico (Depiroll<sup>®</sup>) e após 24 horas 0,2 mL das amostras marcadas (3,7 MBq) foram aplicadas sobre a pele dos ratos com auxílio de uma pipeta automática. Após 30 minutos, os animais foram sacrificados e seus órgãos foram removidos, pesados e a captação de radioatividade foi quantificada por um contador Gamma Packard-Cobra II. A contagem foi realizada durante 5 minutos em uma janela de 15% centralizado a 140 Kev. Os resultados foram expressos como percentual da dose de radioatividade por grama de tecido (SÁ *et al.*, 2012).

### **5.5 Desenvolvimento das formulações com MCO**

As formulações semissólidas tipo gel são constituídas por um agente gelificante que, na maioria das vezes, é um polímero, água e preservantes, adquirindo aspecto transparente. Por serem formulações simples com poucos componentes acredita-se que promovam menor interferência às análises e aos lipossomas nelas incorporados.

Neste trabalho, o polímero gelificante utilizado foi o copolímero do ácido sulfônico acrilóildimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado com o nome comercial Aristoflex<sup>®</sup>. Na tabela 2, está descrita a composição de cada formulação desenvolvida para o estudo. Após a preparação, o teor das formulações foi determinado por CLAE com detecção por UV.

TABELA 2 - Composição das formulações com MCO livre e com lipossoma/MCO.

Composição	MCO livre	Lipossoma/MCO
<b>Fase A</b>		
Aristoflex <sup>®</sup>	3 %	3 %
Metilparabeno	0,1%	0,1%
Água	q.s.p 100 mL	q.s.p 100 mL
<b>Fase B</b>		
<i>p</i> - Metoxicinamato de octila	8%	<b>5,5 %</b>
Polissorbato 80	1%	-
Lipossoma/MCO*	-	<b>50 mL = 2,5 g MCO</b>

A formulação com MCO livre foi preparada solubilizando-se o metilparabeno em água destilada à quente, com subsequente dispersão do Aristoflex, que foi adicionado aos poucos, sob forte agitação manual, em gral e pistilo. Após a incorporação de todo o Aristoflex, completou-se o qsp (quantidade suficiente para) com água destilada. O polissorbato 80 e o OMC foram incorporados ao gel pronto.

Para preparar a formulação lipossoma/MCO, adicionou-se a suspensão lipossoma/MCO uma quantidade maior de MCO para aumentar a concentração de filtro na formulação aumentando, então o FPS da preparação. O MCO foi primeiramente incorporado ao lipossoma/MCO. A essa mistura foi então adicionado o gel base pronto até completar o qsp.



## **5.6 Teste em Membrana Córion-alantóide de Ovos Embrionados de Galinha (HET-CAM) - Testes de Irritabilidade Ocular *in vitro***

A metodologia utilizada baseou-se no método oficial de avaliação do potencial irritante descrito no *Journal Officiel de La Republique Française – Arreté du 29 Novembre 1996*.

Foram testadas 4 formulações: gel base (gel de Aristoflex<sup>®</sup> a 3%), gel com lipossoma vazio, gel com MCO a 8% e gel com Lipossoma/MCO a 8%. Cada formulação foi aplicada sobre a membrana córion-alantóide (CAM) do ovo embrionado de galinha no décimo dia de incubação, e foi observada a presença ou não de efeitos irritantes, como: hiperemia, hemorragia e coagulação/opacidade. Utilizaram-se, para cada formulação, quatro ovos fertilizados de galinha da raça Leghorn, com peso entre 50 e 60 gramas. Utilizaram-se também quatro ovos como controle, sobre os quais nenhuma substância foi adicionada.

Os ovos foram adquiridos na granja Resende e inspecionados visualmente. Foram descartados os que apresentaram alguma lesão na casca e os demais ovos foram pesados, identificados e incubados por 10 dias a 37 °C ± 0,5 °C com umidade relativa de aproximadamente 70 %. Após esse procedimento, os ovos foram colocados em posição vertical, sobre um suporte, com a câmara de ar voltada para cima. A casca que cobria a câmara de ar foi removida com o auxílio de um motor odontológico expondo a membrana da casca que foi umidificada com solução salina a 0,9 % à 37 °C. Com o auxílio de uma pinça, a membrana da casca foi removida expondo, então, a CAM que foi observada quanto a quaisquer alterações, que poderiam comprometer o teste e implicariam no descarte do ovo. Antes da realização do teste a formulação foi mantida a 37 °C. Em cada ovo foram aplicados 300 µL da formulação não diluída sobre a CAM. Após 20 segundos de contato a formulação foi totalmente retirada com o auxílio de 5 mL de solução salina à 37 °C. A análise visual da CAM foi realizada utilizando-se de uma lupa durante 5 minutos com a ajuda de um cronômetro. As etapas descritas estão ilustradas em sequência na FIGURA 14. A graduação foi então determinada nesse período de 5 minutos, de acordo

com a escala descrita na TABELA 4. Os fenômenos irritantes observados foram graduados em valores numéricos (1, 3, 5, 7 e 9) dependentes do tempo.



FIGURA 15: Etapas do ensaio de irritabilidade ocular HET-CAM (NASCIMENTO, 2010).

TABELA 3: Graduação numérica (1, 3, 5, 7 e 9) dos fenômenos irritantes determinados em função do tempo decorrido (segundos) para a sua ocorrência.

Fenômeno	Menos de 30 segundos	Entre 30 e 60 segundos	Entre 60 e 300 segundos
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação/Opacidade	9	7	5

A classificação de cada formulação foi obtida com a média dos valores de graduação dos 4 ovos, o grau de irritação foi dividido em quatro categorias, descritas na Tabela 5. Os ensaios foram realizados em triplicata, para cada formulação.

TABELA 4: Média da graduação dos fenômenos irritantes e a classificação final do grau de irritação das formulações avaliadas

Média dos valores de graduação dos fenômenos irritantes	Classificação final do grau de irritação das formulações avaliadas
0,0 a 0,99	Não irritante (NI)
1,0 a 4,99	Irritante Leve (IL)
5,0 a 8,99	Irritante Moderado (IM)
9,0 a 21	Irritante Severo (IS)

### 5.7 Determinação do Fator de Proteção Solar *in vitro*

O FPS *in vitro* das duas formulações desenvolvidas foi determinado através do método de Mansur (MANSUR, 1986).

Cada formulação citada acima foi submetida a uma diluição de modo a obter uma concentração final de 0,2 µg/ml de formulação em etanol P.A. A seguir, procedeu-se a determinação da absorvância desta solução frente ao solvente. Este procedimento foi realizado em triplicata e a determinação espectrofotométrica do FPS foi avaliada empregando o espectrofotômetro. Os valores de absorvância destas amostras foram determinados nos comprimentos de onda de 290 a 320 nm, com um intervalo de cinco nm. Para o cálculo do FPS, foi utilizada a equação matemática (EQUAÇÃO 3), que relaciona o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda ( $EE \times I$ ) (TABELA 5) (MANSUR *et al*, 1986; SANTOS *et al*, 1999; FREITAS *et al.*, 2001).

## EQUAÇÃO 3: Cálculo do FPS segundo Mansur.

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

Onde: FC =10 (fator de correção), EE ( $\lambda$ ) = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda ( $\lambda$ ) definido pela Tabela 5. I ( $\lambda$ ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda ( $\lambda$ ) definido pela Tabela 5. Abs ( $\lambda$ ) = valor espectrofotométrico da absorbância da solução da preparação no comprimento de onda ( $\lambda$ ) definido pela Tabela 1 (MANSUR, 1986).

TABELA 5: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda (MANSUR *et al*, 1986).

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

### 5.8 Determinação do Fator de Proteção Solar *in vivo*

Os ensaios para a determinação do FPS *in vivo* à seco e após imersão em água (resistência à água) das formulações desenvolvidas (gel com MCO 8% e gel com lipossoma/MCO) foram realizados pela empresa ALLERGISA com base no protocolo *International Sun Protection Factor Test Method* da associação europeia *The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* (COLIPA, 2006) conforme preconizado pela RDC N° 30 (ANVISA,

2012). Foi utilizado simulador ultravioleta multiport 601 para avaliar 10 voluntários sadios do sexo feminino, com fototipos I a III, com idades entre 38 e 58 anos (idade média de 49 anos). Foram demarcadas áreas medindo 30 cm<sup>2</sup> cada, na região dorsal infra-escapular de cada voluntário (FIGURA 15), uma delas foi utilizada para a determinação da dose mínima eritematosa (DME) na pele não tratada. Foi aplicada em duas das áreas, de maneira uniforme e com o auxílio de uma dedeira, 60 ± 1,5 mg, o correspondente a 2 mg/cm<sup>2</sup> da formulação controle e em duas áreas adjacentes foi aplicada uma das formulações a serem testadas. Após 15 a 30 minutos da aplicação do produto a irradiação foi iniciada em uma área controle e em uma área com formulação teste. Os eritemas formados foram avaliados num período de 16 a 24 horas após a irradiação. Após este período de tempo, a resistência em água da formulação lipossoma/MCO foi avaliada. Para isso, os voluntários foram imersos em banheira com água a 29°C por 40 minutos. As duas outras áreas tratadas (controle e teste) foram então irradiadas e o DME foi medido após 16 a 24 horas. Foram então realizados os cálculos de FPS à seco e após imersão em água das formulações em teste segundo a Equação 4.

Equação 4: Cálculo do FPS in vivo

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

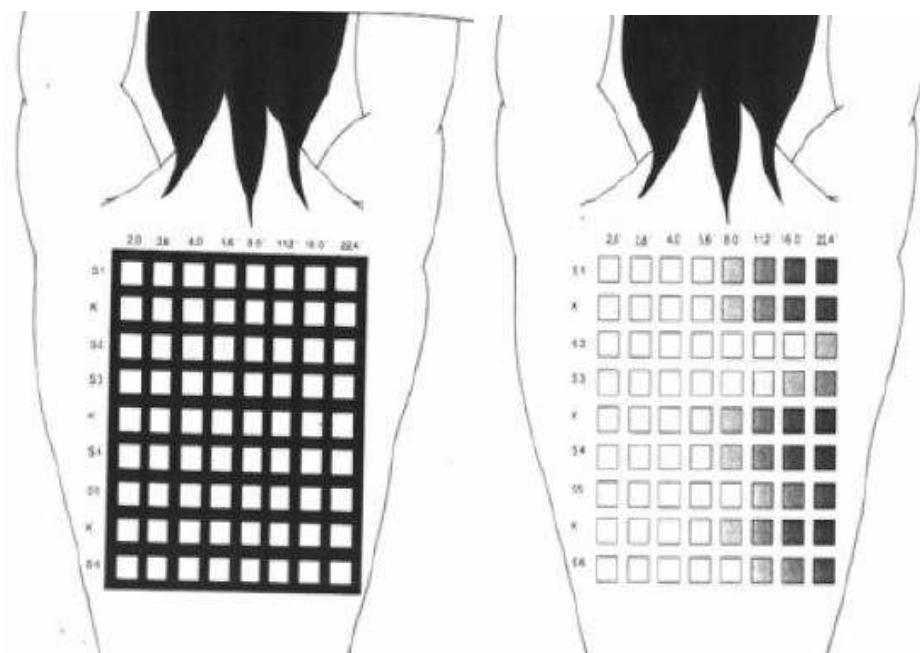


FIGURA 16: Áreas demarcadas nas costas dos voluntários para os ensaios de FPS *in vivo* (SHAATH, 1997).

### 5.9 Perfil de Liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas

O estudo do perfil de liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas foi realizado em condições experimentais adaptadas de Alvarez-Román *et al.* (2001), Monteiro (2008), Santis (2008) e Soares (2009).

Um sistema de difusão vertical com membrana artificial de acetato de celulose, com poros de 0,2  $\mu\text{m}$ , acoplada a dois compartimentos (doador e receptor) foi empregado para avaliar a liberação das formulações desenvolvidas. A área de difusão foi de 5,73  $\text{cm}^2$  e o volume do compartimento receptor foi de 20 mL. A solução receptora foi composta por 70% de tampão fosfato salino pH 7,4 contendo 0,2 % de polissorbato 80 e 30% de etanol (MONTEIRO, 2008).

Antes de iniciarmos os ensaios de liberação, realizou-se a hidratação das membranas artificiais em três becheres com água destilada em ebulição, submergindo-as, por cinco minutos em cada um. A seguir os sistemas foram montados com as membranas de modo a separar os meios, receptor e doador,

observando a ausência de bolhas entre as membranas e os referidos meios. Com o auxílio de barras magnéticas, os meios receptores foram mantidos sob agitação constante a 900 rpm e a temperatura ambiente 22-25°C. Os sistemas foram mantidos nesse estado por 30 minutos a fim de estabelecer o equilíbrio entre a membrana e a solução receptora. Decorridos os 30 minutos, foram aplicados aproximadamente 1g de formulação no compartimento doador com o auxílio de pipeta automática para semissólidos. A difusão ocorreu sob a condição de quantidade infinita de ativo. Em intervalos de tempo de 30 minutos, foram retiradas alíquotas de 3 mL do meio receptor com reposição de volume de solução receptora. Estas alíquotas foram diretamente quantificadas em espectrofotômetro. A quantificação dos filtros solares liberados na solução receptora foi realizada durante 180 minutos. O fluxo foi definido por avaliação quantitativa de ativo transportado do compartimento doador para o receptor por unidade de área, por tempo (MONTEIRO, 2008).

#### **5.10 Biometria Cutânea e Tape Stripping – Avaliação da penetração do MCO em voluntários**

A avaliação da penetração cutânea do filtro solar MCO contido em formulações nanocosméticas foi realizada empregando-se a metodologia conhecida como *tape stripping* ou “remoção do estrato córneo” por fita adesiva (SOEBORG et al, 2007; HERKENNE, 2008). Antes de realizarmos o *tape stripping*, foram realizados ensaios de Biometria Cutânea nos voluntários com o intuito de verificarmos a integridade da barreira da pele, medindo variáveis como pH, hidratação e oleosidade da superfície cutânea. Este estudo foi realizado após aprovação do protocolo de pesquisa intitulado “Avaliação da penetração e biometria após aplicação do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila em nanocosmético” pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro – CEP (HUCFF/UFRJ) sob o nº 120/10 em 14/04/2011 (Anexo).

### **5.10.1 Seleção e Avaliação dos Voluntários**

O *tape stripping* e a biometria cutânea foram realizados em 10 voluntários sadios, do sexo feminino, com idades entre 22 e 60 anos, capazes de fornecer seu consentimento livre e esclarecido, sem histórico de doença de pele e antebraços sem lesões cutâneas que pudessem interferir com os resultados do estudo.

Os voluntários foram recrutados entre a comunidade academia (alunos, funcionários, docentes) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CCS/UFRJ); tomaram ciência do experimento e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo).

O investigador clínico, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Maria Azevedo CRM-5236934-1, do Departamento de Dermatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ), examinou a região do antebraço de cada voluntário e questionou-os sobre possíveis doenças de pele como: vitiligo, psoríase, dermatite atópica, sensibilidade a filtros solares. Ao final deste exame dermatológico, todos os voluntários foram considerados aptos para participar do estudo.

### **5.10.2 Preparo dos Voluntários para os Ensaios**

Após os esclarecimentos e o consentimento por escrito, os voluntários foram encaminhados à uma sala climatizada com temperatura entre 20°C e 22°C, e umidade relativa na faixa de 50-60%. Uma hora antes do experimento, os antebraços dos voluntários foram lavados com água corrente e sabonete líquido neutro e secos com papel toalha. O voluntário então permaneceu na sala por uma hora para aclimação antes da realização da biometria e posterior aplicação das formulações.



### 5.10.3 Biometria Cutânea

A biometria cutânea consiste no estudo das características biológicas, mecânicas e funcionais da pele através da medição rigorosa de determinadas variáveis, por métodos cientificamente comprovados e não invasivos (SERUP & JEMEC,1995). Utilizando a biometria, pudemos avaliar a integridade da barreira cutânea medindo determinadas variáveis, tais como: pH, teor lipídico e hidratação cutânea (GASPAR, 2001). Para isso, foi empregada a unidade combinada Sebumeter, pHmeter e Corneometer (Courage Khazaca) (FIGURA 16).

Os testes de Biometria Cutânea foram realizados antes da aplicação das formulações para o ensaio de *tape stripping* com o objetivo de verificar a integridade da barreira da pele das voluntárias e avaliarmos se essas variáveis foram capazes de modificar a captação do MCO pelo EC.



FIGURA 17: Unidade combinada Sebumeter - pHmeter - Corneometer

Análise da hidratação cutânea: mede o grau de hidratação da superfície cutânea, utilizando a medição da capacitância do estrato córneo. Este método de medição baseia-se na variabilidade do valor da constante dielétrica da água que pode ser medida através de um capacitor capaz de determinar essas variações, registrando-as automaticamente no aparelho. O aparelho possui ainda uma sonda que é colocada em contato com a pele, onde não existe contato galvânico entre o local a ser medido e o aparelho de medição. O aparelho utilizado é o Corneometer CM 820 PC. A pele é considerada

hidratada quando apresenta de 80 – 95 UA (unidades arbitrárias), e muito hidratada quando apresenta de 130-150 UA a temperatura de 20°C e umidade relativa do ar de 45% (SERUP & JEMEC,1995; GASPAR, 2001).

Análise do teor lipídico: Baseia-se na fotometria (banda do visível) de uma fita plástica especial, a qual se torna progressivamente transparente por adsorção dos lipídios após contato com a superfície da pele em análise. A cabeça do cassete de medição contém uma tira plástica de aproximadamente 0,1 mm de espessura, que adsorve a gordura ao ser colocada em contato com a pele. O tempo de medição é de 30 segundos. Seguidamente o cassete é colocado no aparelho onde uma célula fotoelétrica avalia a transparência da tira plástica, quantificando assim o conteúdo lipídico da superfície cutânea. O aparelho utilizado é o Sebumeter SM 810 PC. A oleosidade da pele varia de acordo com a região do corpo analisada. A TABELA 6 abaixo descreve o nível de oleosidade que podemos encontrar em algumas regiões do corpo.

TABELA 6: Nível de oleosidade encontrado em diversas partes do corpo

	<b>Testa grande T (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>Face (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>Pescoço/ Corpo (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>Dorso da mão (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>
Seca	< 99	< 66	< 66	< 6
Normal	99 - 220	66 - 176	67 – 110	> 6
Oleosa	> 220	> 176	> 110	

(SERUP & JEMEC,1995; GASPAR, 2001)

Análise do pH da superfície cutânea: Determinado instantaneamente por potenciometria direta, isto é através de um eletrodo especial. A avaliação do pH através de aparelhos de biometria é considerada como o único método técnico e cientificamente comprovado. A medição é rápida e sem dificuldades, garantindo resultados precisos. A determinação do pH requer um eletrodo

especialmente concebido através de uma fina membrana de vidro com uma face plana, de forma a assegurar um contato total com a pele. O aparelho utilizado é o Skin pH-Meter. O pH da pele também pode variar em função do local do corpo onde é medido. Nas mulheres o pH normal da pele é na faixa de 5,5 a 5,8 e nos homens entre 5,0 e 5,5 (SERUP & JEMEC,1995; GASPAR, 2001).

#### 5.10.4 Tape Stripping

##### 5.10.4.1 Procedimento de aplicação das formulações

Após a realização dos ensaios de biometria cutânea foram demarcadas cinco áreas de aproximadamente 5 cm<sup>2</sup> cada uma em cada antebraço (FIGURA 17). No antebraço direito foi aplicada a formulação convencional gel com 8% de MCO livre e no antebraço esquerdo aplicamos a formulação em gel contendo o nanossistema lipossoma com MCO (Lipossoma/MCO). A formulação foi aplicada nas áreas demarcadas, com auxílio de uma haste com ponta de algodão (Cotonetes<sup>®</sup>) de modo uniforme em quantidade de aproximadamente 10 mg (para prover 2mg/cm<sup>2</sup>).

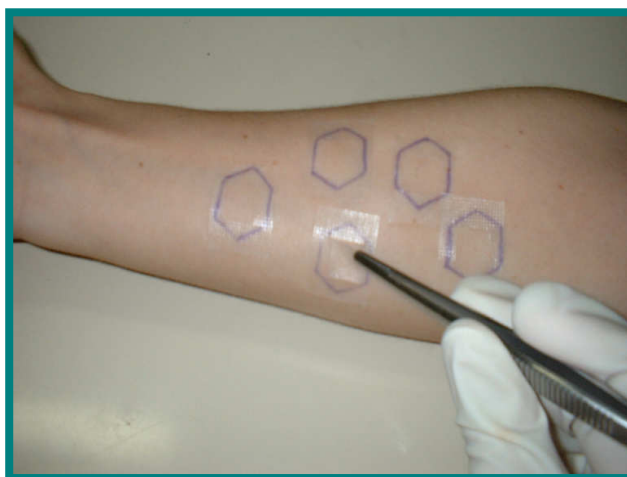


FIGURA 18: Esquema da metodologia *tape stripping* empregada (FREITAS, 2005)

Cada área demarcada possui um tempo determinado de espera para a retirada da amostra (15, 60, 120 e 240 minutos). Também há uma área de

controle, onde nenhuma formulação foi aplicada. Após cada tempo, a formulação foi removida da área específica limpando-a com algodão embebido em água e depois com algodão seco.

A seguir, foi realizada a coleta de estrato córneo com o auxílio de fita adesiva hipoalergênica Transpore<sup>®</sup>, marca 3M do Brasil. Em cada área foram aplicadas e retiradas 11 fitas adesivas consecutivas com área de um cm<sup>2</sup>. Após a aplicação na pele, as fitas foram pressionadas com um bastão de vidro rolando-o regularmente 10 vezes. A seguir as fitas foram retiradas rapidamente. A primeira fita foi descartada para evitar uma quantidade superestimada do MCO. As outras dez fitas adesivas foram transferidas para um tubo de ensaio contendo solvente extrator e levadas à análise por CLAE no mesmo dia com o objetivo de quantificar a massa total de MCO, por área, em um determinado tempo. Como controle negativo, uma área não tratada também foi demarcada e o EC retirado; e um controle positivo foi realizado pela adição de 0,5 µg de MCO em cada fita (10µL de uma solução de 50 µg/mL) depois de retirada do EC, perfazendo 5 µg de MCO num total de 10 coletas do EC.

#### 5.10.4.2 Determinação da metodologia de extração do MCO em fitas conjuntas

Na avaliação da penetração do MCO no EC, por *tape stripping*, foram utilizadas 10 fitas para extração do EC para cada tempo. Essas 10 fitas podem ser analisadas conjuntamente, já que a massa contida nas mesmas seria a massa total do fármaco que penetrou na pele, por unidade de área, em um determinado tempo, ou seja, concentração *versus* tempo (SHAH *et al.*, 1998, FREITAS, 2005).

Antes de iniciarmos a determinação da metodologia de extração do MCO em fitas conjuntas, foi realizada a determinação em apenas uma fita para a escolha da melhor mistura de solventes. Em 3 tubos eppendorff de 3,0 mL, mantidos na horizontal, foram colocadas 3 fitas adesivas Transpore<sup>®</sup> 3M em forma de quadrado com área de 1,0 cm<sup>2</sup>, com a parte adesiva voltada para cima (uma fita em cada tubo). Sobre cada fita, foram dispostos 50 µL de uma solução de MCO a 50 µg/mL em etanol. Após a evaporação total do solvente procedeu-se a extração do fármaco. Sabe-se que o filtro solar MCO é muito

solúvel em etanol (THE MERCK INDEX, 2001), por isso, três misturas desse solvente foram testadas: etanol 96° GL, etanol:água (90:10) e etanol:água (70:10). Foi adicionado 1 mL de cada mistura de solvente a cada tubo eppendorff sob agitação utilizando barra magnética e placa de agitadora durante 1 hora (em duplicata). As respostas foram obtidas como percentual de massa extraída de MCO em relação à massa de MCO adicionada às fitas empregando-se CLAE/UV para quantificar o MCO. (FREITAS, 2005)

Após a determinação das duas melhores misturas de solvente para a extração do MCO no experimento realizado com apenas uma fita, foi dado prosseguimento à determinação do melhor método para a extração conjunta das fitas realizando-se o seguinte experimento: após a “remoção do estrato córneo” do antebraço com 10 fitas adesivas sequenciais, estas foram colocadas separadamente em um suporte com a parte adesiva voltada para cima. Sobre cada fita foram dispostos 50 µL de uma solução de MCO a 50 µg/mL em etanol. Após a evaporação completa do solvente, cerca de 1 hora, cada conjunto de 10 fitas foi fixado em uma fina haste de metal. Esta haste contendo as 10 fitas foi colocada dentro de um tubo de ensaio de vidro contendo 10 mL da mistura (etanol, etanol:água 90:10 ou etanol:água 70:10). Neste experimento foram avaliados dois solventes, escolhidos no experimento realizado com uma única fita, variando-se também as condições de agitação: a) utilizando barra magnética durante 1 hora e b) utilizando vórtex por 2 minutos. Após a extração as amostras foram quantificadas por CLAE/UV, o experimento foi realizado em duplicata. (FREITAS, 2005).

### **5.11 Quantificação do MCO presente nas fitas adesivas por CLAE**

Esta análise foi realizada no sistema cromatográfico Gilson. Foi utilizado um sistema isocrático, equipado com a coluna cromatográfica Kromasil 100 C18 de 5 µ e 250 x 4,6 mm, mantida a temperatura de 40°C, loop de 50 µL, fluxo de 1,5 mL/min e fase móvel composta por metanol:água na proporção de 90:10. O comprimento de onda de detecção foi fixado em 310 nm, correspondente ao λ máximo encontrado por espectrofotometria de varredura

na região do UV, de uma solução de MCO a 10 µg/mL preparada na fase móvel metanol:água (90:10).

A metodologia analítica utilizada para identificar e quantificar o MCO nas formulações desenvolvidas foi baseada nos estudos realizados por Volpato (1999) e Monteiro (2008) com algumas modificações para adaptar a metodologia ao equipamento e à coluna utilizados no presente estudo.

### **5.12 Análise Estatística**

Os resultados experimentais obtidos foram expressos como média mais ou menos desvio padrão (DP) ou erro padrão da média (EPM), submetidos à análise estatística empregando-se o software Prism 6 versão 6.01 GraphPad para Windows. Foram realizados os testes t pareado e não pareado com fator  $\alpha = 0,05$ .

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Caracterização físico-química do filtro solar MCO**

A Farmacopéia Brasileira não disponibiliza padrões primários para filtros solares, além disso, existe a dificuldade em se obter padrões farmacopéicos internacionais. Desta forma, foram realizados testes de caracterização da matéria prima MCO adquirida pela empresa DEG com teor de pureza declarado pelo fabricante de 99,8%. Seu uso é permitido em cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal, na concentração máxima de 10%, de acordo com a resolução RDC N° 47, de 16 de março de 2006.

#### **6.1.1 Determinação dos parâmetros de absorção na região do UV do filtro solar MCO**

A análise realizada no espectro de absorção na região do UV tornou possível a determinação de alguns parâmetros, permitindo a identificação da substância. O espectro de absorção obtido a partir de uma solução de MCO a 10,0 µg/mL em etanol (FIGURA 18) mostrou que a molécula apresenta uma absorção máxima em 310 nm.

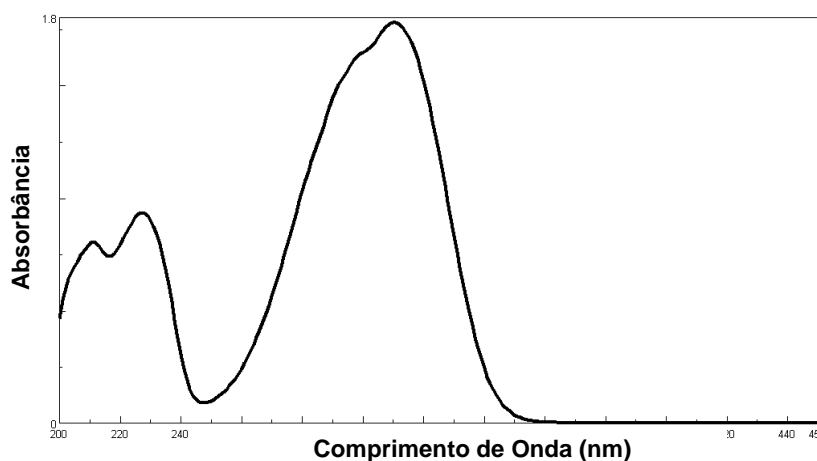


FIGURA 19: Espectro de absorção no UV (entre 200 e 450 nm) do MCO

Com os resultados encontrados na análise do MCO por espectrofotometria de UV pode-se concluir que o  $\lambda$  máximo na análise está de acordo com os valores de referência da literatura (SHAATH, 2007). Sendo, portanto, um indicativo da identidade para esta molécula.

A curva padrão foi obtida com cinco pontos nas concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg/mL de MCO em solução de etanol para HPLC/UV. A reta de calibração apresentou coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9993 e equação da reta  $y = 0,0966x - 0,0229$ , indicando uma boa linearidade (FIGURA 19). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9986 demonstrou que os valores teóricos foram correlacionados com os obtidos na prática (NETO *et al.*, 2002).

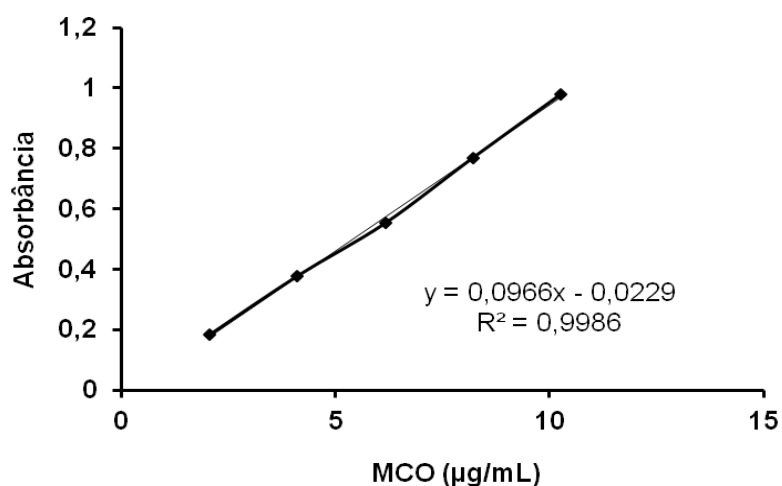


FIGURA 20: Curva padrão de absorbância versus concentração de MCO ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtida por espectrometria de ultravioleta em dois dias.

## 6.2 Caracterização do nanossistema lipossoma/MCO

### 6.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As fotomicrografias dos lipossomas vazios (A) e com MCO (B) apresentadas na FIGURA 20 mostram vesículas lipossomais com formato arredondado, a presença de várias lamelas e tamanho na escala nanométrica indicado pelos diâmetros em torno de aproximadamente 200 a 500 nm.



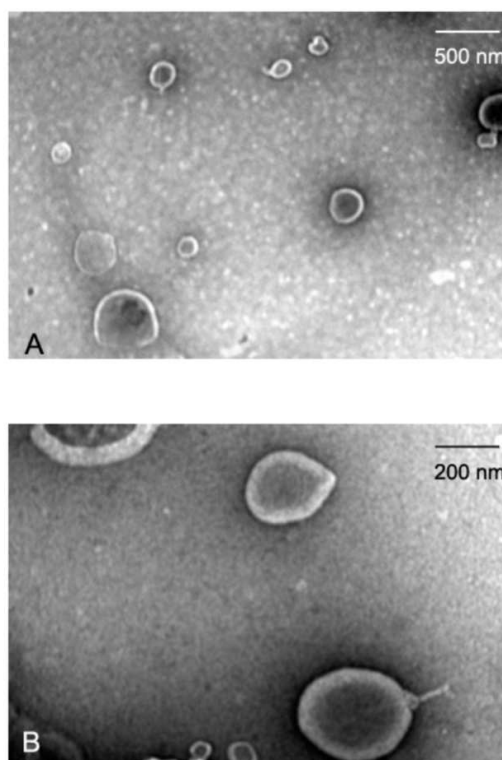


FIGURA 21: Fotomicrografia de Lipossomas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, (A) lipossoma vazio, aumento de 44000x, (B) lipossoma/MCO, aumento de 56000x.

### 6.2.2 Tamanho e Índice de Polidispersividade

A determinação do diâmetro médio dos lipossomas foi realizada pela técnica do espalhamento de luz, que consiste na utilização da modificação da intensidade da luz espalhada por partículas em suspensão sob movimento Browniano no tempo com o objetivo de se obter a distribuição hidrodinâmica do tamanho. A partir desse princípio, as vesículas maiores se movimentam mais lentamente e as menores mais rapidamente, como consequência, a intensidade da luz flutua também lentamente em relação às primeiras e, mais rapidamente em relação às últimas. O equipamento realiza a correlação entre os dois parâmetros para efetuar o cálculo do diâmetro médio das partículas presentes na suspensão lipossomal. Além do diâmetro médio das partículas, o cálculo do índice de polidispersividade (IP) considera o tamanho médio, o

índice de refração do solvente, o ângulo de medida e a variação da distribuição. Embora não exista uma correlação linear entre um valor de IP alto e uma monodispersividade verdadeira de uma amostra, em uma escala de 0 a 1,0, valores de IP próximos a 0,1 podem ser associados à um sistema monodisperso, com alta homogeneidade na população de partículas, sugerindo uma distribuição de tamanho monomodal. Por outro lado, valores altos de IP sugerem uma distribuição de tamanho alargada ou polimodal (GAUMET *et al.*, 2008).

De acordo com o exposto acima e analisando os valores de diâmetro médio e IP encontrados (TABELA 7) pode-se dizer que os lipossomas analisados mostram-se com baixos valores de IP sugerindo sistemas monodispersos, com alta homogeneidade.

TABELA 7: Valores médios de tamanho e índice de polidispersividade dos lipossomas

	<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>IP</b>
Logo após o preparo	Lipossoma vazio	483,20 ± 27,70	0,272 ± 0,033
	Lipossoma/MCO	982,00 ± 68,00	0,464 ± 0,050
Após 3 meses	Lipossoma vazio	621,93 ± 48,43	0,127 ± 0,021
	Lipossoma/MCO	1066,00 ± 32,66	0,545 ± 0,029

Como podemos visualizar na FIGURA 15, o lipossoma vazio (A) mostrou-se mais homogêneo com apenas uma população de vesículas com diâmetro médio de  $483,2 \pm 27,7$  nm e IP de  $0,272 \pm 0,03$  mostrando uma distribuição monomodal e uma amostra mais homogênea, o que podemos confirmar observando a FIGURA 21(A). O lipossoma/MCO, em contrapartida, apresentou uma distribuição bimodal, com duas populações de vesículas, confirmadas pela FIGURA 21(B). Uma população maior com diâmetros semelhantes aos do lipossoma vazio e uma população menor contendo vesículas maiores que 1000 nm. Este resultado torna o diâmetro médio do

lipossoma/MCO com valor de  $982 \pm 68$  nm, maior que o diâmetro do lipossoma vazio ( $483,2 \pm 27,7$  nm). Os valores de diâmetro do lipossoma vazio e do lipossoma/MCO são estatisticamente diferentes (teste t não pareado,  $p < 0,05$ ). E indica que, possivelmente, o lipossoma/MCO é mais instável que o lipossoma vazio, pois esta segunda população pode estar presente devido ao aumento de tamanho provocado pela coalescência das vesículas formadas comprovando que os lipossomas são estáveis durante este período de tempo.

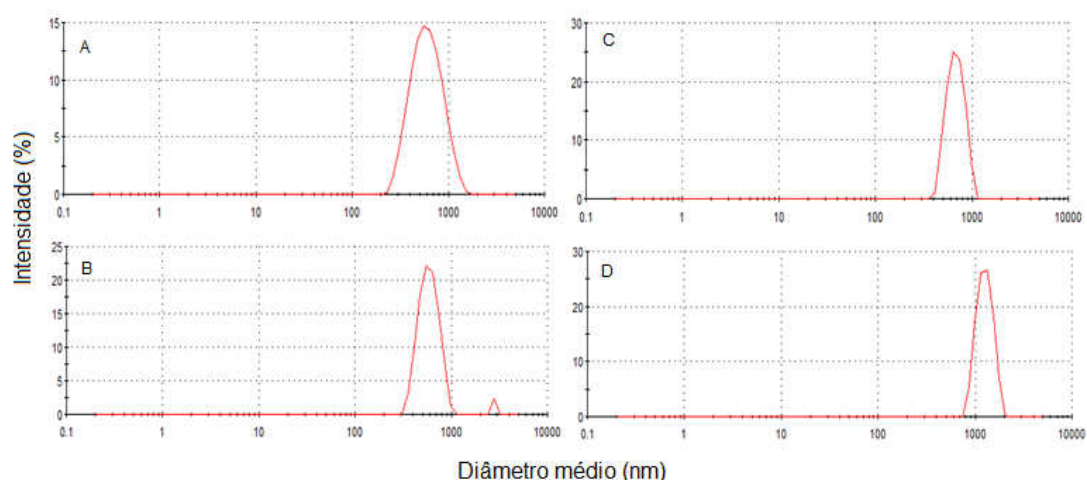


FIGURA 22: Distribuição de tamanho das vesículas do lipossoma vazio (A) e do lipossoma/MCO (B) logo após o preparo e lipossoma vazio (C) e lipossoma/MCO (D) após 3 meses.

### 6.2.3 Determinação do Potencial Zeta (PZ)

As fosfatidilcolinas, presentes nos lipossomas preparados neste estudo, são zwitteríons, portanto são moléculas com carga total igual a zero. O objetivo de estudar-se o potencial zeta dos lipossomas formados por esses fosfolipídeos é determinar a orientação do grupamento fosfato presente na cabeça polar da fosfatidilcolina na interface da vesícula e a orientação do grupamento apolar em relação à fase aquosa (JONES, 1996).

Os valores obtidos nas análises de potencial zeta foram de  $-11,27 \pm 0,46$  para as amostras de lipossoma vazio e de  $-10,31 \pm 0,58$  para o

lipossoma/MCO, e estão descritos na TABELA 8 e demonstrados na FIGURA 22. Estes valores são estatisticamente iguais (teste t não pareado,  $p < 0,05$ ).

TABELA 8: Valores médios de potencial zeta e desvio padrão dos lipossomas

Amostra	Potencial Zeta (mV)
Lipossoma vazio	$-11,27 \pm 0,46$
Lipossoma/MCO	$-10,31 \pm 0,58$

Ambos os valores de potencial zeta são negativos, ou seja, o grupamento fosfato presente na cabeça polar da fosfatidilcolina está direcionado para a parte externa da vesícula. Este direcionamento deve-se a baixa força iônica dos componentes da suspensão lipossomal. O fato dos lipossomas terem carga negativa é importante, pois, a repulsão das cargas aumenta a estabilidade e evita a coalescência das vesículas. Porém, esta baixa carga negativa não é suficiente para mantê-las estáveis por muito tempo (JONES, 1996; VEMURI, 1995).

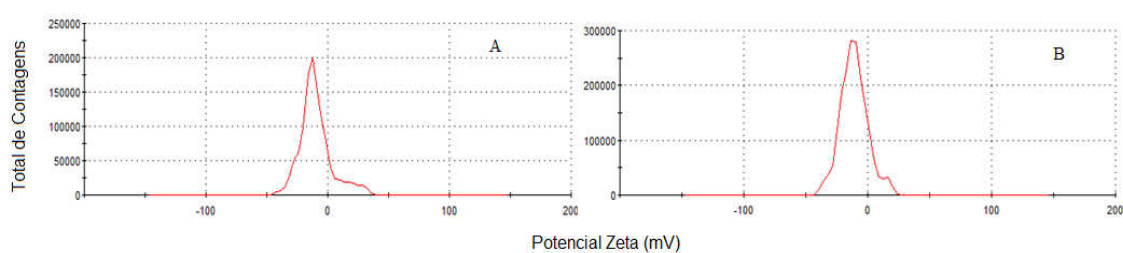


FIGURA 23: Diagramas de potencial zeta do lipossoma vazio (A) e do lipossoma/MCO (B)

#### 6.2.4 Rendimento de Inclusão

A TABELA 9 mostra os valores de concentração de filtro solar MCO nas soluções analisadas de acordo com a equação da reta da curva padrão encontrada. Os valores de rendimento de inclusão foram obtidos

correlacionando-se a massa quantificada por espectrometria de UV com a massa real adicionada para a preparação do lipossoma. O rendimento de inclusão médio do lipossoma/MCO foi de  $84,97\% \pm 2,02$ .

TABELA 9: Valores de rendimento de inclusão do MCO em lipossoma

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rendimento (%)
4,74	85,26
4,78	86,82
4,69	82,82
<b><math>4,74 \pm 0,05</math></b>	<b><math>84,97 \pm 2,02</math></b>

### 6.2.5 Dosagem de Fósforo

A fosfatidilcolina utilizada foi o Lipoid<sup>®</sup> S100 com teor declarado de 96,6%. Com a realização do teste de fósforo, foi obtida uma curva de calibração da absorbância versus a concentração de fósforo (FIGURA 23). A reta de calibração apresentou coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,999 e equação da reta  $y = 0,1591x + 0,0277$ , indicando uma boa linearidade (FIGURA 19). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,998 demonstrou que os valores teóricos foram correlacionados com os obtidos na prática (NETO *et al.*, 2002).

A amostra de lipossoma/MCO analisada mostrou rendimento de preparação de  $84,55 \pm 3,39\%$ . A partir das absorbâncias encontradas das amostras de Lipoid<sup>®</sup> S100 o teor desta matéria prima foi de  $96,70 \pm 1,2\%$ .

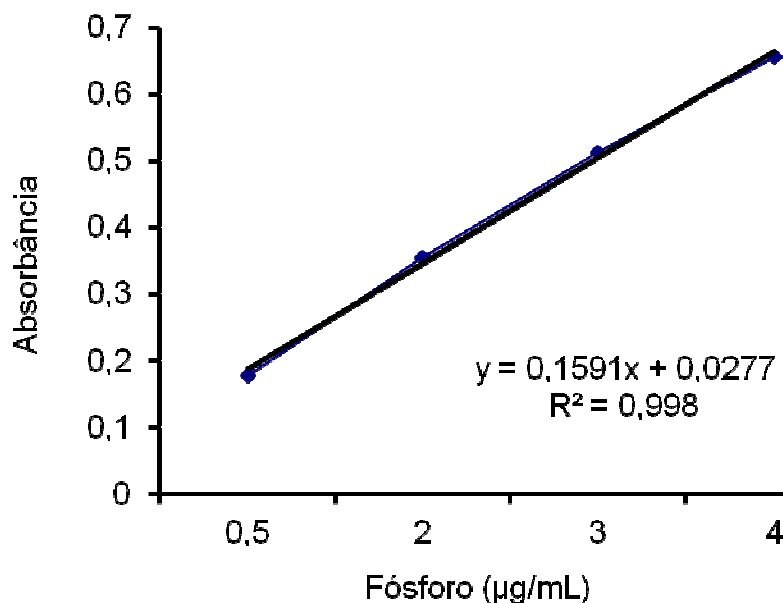


FIGURA 24: Curva padrão de absorvância versus concentração de P (µg/mL) por espectroscopia de ultravioleta.

Pode-se concluir, então, que o teor do Lipoid® S100 está de acordo com o teor declarado pelo fabricante e a preparação do lipossoma/MCO obteve um bom rendimento de preparação.

### 6.3 Hidrólise Enzimática - Avaliação do lipossoma/MCO como substrato para lipase microbiana

O objetivo deste teste foi comparar a taxa de hidrólise do filtro solar MCO com o nanossistema lipossoma/MCO para prever o metabolismo da pele do lipossoma/MCO. A taxa de hidrólise do MCO nas condições experimentais empregadas foi de  $4,439 \pm 0,028$  mmol/min. Os outros substratos testados, lipossoma vazio e lipossoma/MCO, não foram hidrolisados pela lipase uma vez que o volume de NaOH consumido para estas duas amostras foi semelhante aos volumes de NaOH consumidos pelo branco obtendo-se uma diferença de volume (volume NaOH consumido pela amostra – volume NaOH consumido

pelo branco) de 0,096 ml para o lipossoma vazio e de 0,19 ml para o lipossoma/MCO.

O fato dos lipossomas não serem hidrolisados pela lipase microbiana, provavelmente, ocorreu devido à disposição das moléculas de fosfatidilcolina nas bicamadas do lipossoma. As unidades de ácido graxo estão direcionadas para o lado interno das vesículas, prevenindo, desta forma, o ataque da lipase aos grupamentos éster presentes nas moléculas de fosfatidilcolina. Podemos concluir, então que o lipossoma é capaz de proteger o filtro solar MCO da degradação enzimática causada pelas lipases presentes no EC, aumentando o tempo de permanência do lipossoma/MCO na pele.

#### **6.4 Biodistribuição do lipossoma/MCO marcado com tecnécio-99-m**

Todas as amostras foram marcadas com sucesso, ou seja, obtiveram um percentual de marcação superior a 90%. Na TABELA 10 estão descritos os valores de percentual de dose por grama de tecido ou órgão encontrados no ensaio com lipossomas marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ . Foram realizados testes com o lipossoma vazio com o lipossoma/MCO e o MCO com a finalidade de avaliar se o nanocosmético desenvolvido lipossoma/MCO seria capaz de reter o MCO na pele formando um reservatório (BOUWSTRA, 2002; GILLET *et al.*, 2011) pois sabe-se que o filtro solar MCO veiculado a formulações convencionais é capaz de atravessar a barreira da pele atingindo a circulação sistêmica (HAYDEN, 1997; SARVEIYA, 2004; GONZALEZ *et al.*, 2002; JANJUA, 2008).

TABELA 10: Biodistribuição do nanossistema lipossoma/MCO marcado com tecnécio-99-m em comparação com o lipossoma vazio e o filtro solar MCO.

Tecido	Percentual de dose por grama de tecido (%) $\pm$ D.P.		
	MCO	Lipossoma vazio	Lipossoma/MCO
Baço	0,0180 $\pm$ 0,013	0,0180 $\pm$ 0,0013	0,0200 $\pm$ 0,0300
Coração	0,200 $\pm$ 0,030	12,000 $\pm$ 0,130	13,000 $\pm$ 0,130
Rins	0,060 $\pm$ 0,0640	0,0300 $\pm$ 0,0064	0,040 $\pm$ 0,0064
Pulmões	0,0120 $\pm$ 0,0013	0,0060 $\pm$ 0,0013	0,00600 $\pm$ 0,0013
Sangue	0,00001 $\pm$ 0,0002	0,0003 $\pm$ 0,002	0,00020 $\pm$ 0,00020
Estômago	0,010 $\pm$ 0,020	0,1000 $\pm$ 0,0200	0,0001 $\pm$ 0,00002
Fígado	70,000 $\pm$ 0,300	35,000 $\pm$ 0,3100	37,000 $\pm$ 0,035
Intestino	0,080 $\pm$ 0,0130	0,0800 $\pm$ 0,0300	0,100 $\pm$ 0,030
Pele	6,00 $\pm$ 0,0300	56,000 $\pm$ 0,2300	57,00 $\pm$ 0,13

Com estes resultados pode-se perceber que tanto o lipossoma vazio quanto o lipossoma/MCO tiveram perfis de biodistribuição semelhantes. A comparação entre as três amostras pode ser também observada no gráfico da FIGURA 24, onde se verifica que o principal órgão de deposição do MCO foi o fígado, este resultado sugere que o MCO é rapidamente absorvido após aplicação na pele, sofrendo metabolização hepática. As quantidades encontradas nos outros tecidos avaliados não foram significativas para o MCO. Ao analisar as barras do gráfico referentes aos lipossomas podemos perceber que o principal órgão de deposição deste nanossistema foi a pele sugerindo então que o lipossoma tem maior afinidade por este órgão permanecendo na pele por mais tempo quando comparado ao MCO. Os lipossomas também foram encontrados no fígado, porém em menor quantidade do que o MCO (FIGURA 24), sugerindo que houve uma pequena absorção sistêmica dos lipossomas a partir da pele. Os lipossomas também foram encontrados no coração o que sugere que parte destes sistemas ao chegar à circulação sistêmica liga-se à albumina. O mesmo ocorre com o MCO, porém em menor proporção (SÁ *et al.*, 2012; PATRICIO *et al.*, 2012). Com isso, podemos concluir que o nanossistema lipossoma/MCO tem maior afinidade pela pele do que o MCO sendo encontrado em maior proporção na pele.



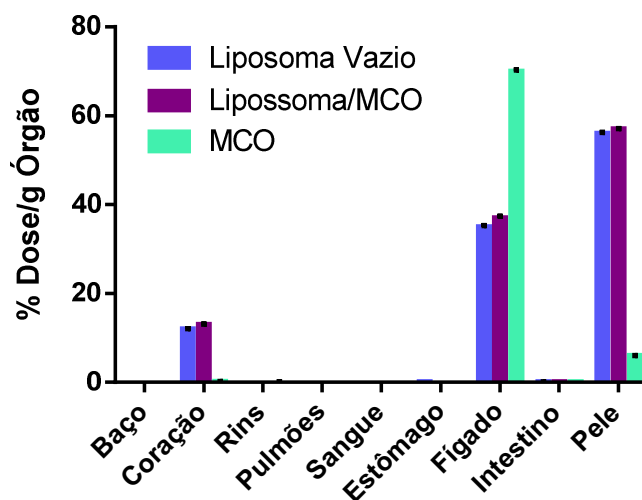


FIGURA 25: Biodistribuição do nanossistema lipossoma/MCO marcado com tecnécio-99-m em comparação com o lipossoma vazio e o filtro solar MCO

### 6.5 Doseamento das Formulações com MCO

O doseamento do MCO presente nas formulações gel com MCO e gel com lipossoma/MCO foi determinado por CLAE, diluindo-se as formulações em etanol até uma concentração de MCO de  $8\mu\text{g/mL}$ . As corridas foram realizadas em triplicata. A concentração das soluções foram obtidas através da curva padrão realizada no dia do experimento. Com isso, obteve-se a concentração de  $7,89\% \pm 0,11$  de MCO na formulação gel com MCO livre e  $8,68 \pm 0,66\%$  de MCO na formulação lipossoma/MCO.

### 6.6 Segurança das formulações – HET-CAM

Os resultados obtidos estão descritos na TABELA 11. Todas as formulações testadas obtiveram o grau de irritação avaliado como “não irritante” com o emprego do método HET-CAM. As formulações gel base e lipossoma/MCO apresentaram valores de graduação dos fenômenos irritantes igual a 0,45 e 0,25, respectivamente, e para as formulações gel com lipossoma vazio e gel com MCO os valores de graduação dos fenômenos irritantes foram

igual a zero obtendo-se uma classificação final do grau de irritação como “não irritante” (de acordo com as TABELAS 4 e 5) (DRAIZE, 1944; INCQS/FIOCRUZ, 2008).

TABELA 11: Grau dos fenômenos irritantes obtidos por HET-CAM e a classificação final do grau de irritação das formulações

<b>Formulações</b>	<b>Valores de graduação dos fenômenos irritantes</b>	<b>Classificação final do grau de irritação das formulações avaliadas</b>
Gel base	0,45	Não irritante
Gel com MCO	0	Não irritante
Lipossoma Vazio	0	Não irritante
Lipossoma/MCO	0,25	Não irritante

### 6.7 Determinação do Fator de Proteção Solar *in vitro*

Os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico de Mansur (1986) apresentados na TABELA 12, mostram que os valores de FPS das duas formulações testadas são estatisticamente iguais (teste T não pareado,  $p < 0,05$ ). Isto ocorre em vista das formulações terem concentrações semelhantes de filtro solar MCO e devido ao próprio método, pois a leitura espectrofotométrica das amostras diluídas em solvente nos dá uma ideia do FPS, mas nem sempre retrata a realidade, visto que, as propriedades dos lipossomas presentes na formulação e a sua interação com o EC podem alterar o FPS da formulação quando esta é aplicada na pele *in vivo* (MANSUR, 1986).

TABELA 12: Resultado do FPS *in vitro* das formulações MCO a 8% e lipossoma/MCO

Formulação	FPS $\pm$ DP
MCO 8%	13,98 $\pm$ 0,66
Lipossoma/MCO	13,88 $\pm$ 0,07

### 6.8 Determinação do Fator de Proteção Solar *in vivo*

A determinação do FPS *in vivo* a seco das formulações em gel com MCO livre foi realizada com a participação de 10 voluntários sadios, do sexo feminino, idades entre 26 e 59 anos. A TABELA 13 mostra que o FPS médio da formulação com MCO livre foi de 7,0  $\pm$  1,6.

O FPS *in vivo* da formulação com lipossoma/MCO foi determinado a seco e após imersão em água. Para a obtenção dos resultados houve a participação de 10 voluntários sadios, do sexo feminino, idades entre 23 e 55 anos. O FPS médio a seco foi de 11,5  $\pm$  2,7, e após 40 minutos de imersão em água foi de 5,8  $\pm$  1,4 (TABELA 13). Ao compararmos os valores de FPS entre as formulações com MCO livre e lipossoma/MCO a seco utilizando-se o teste t não pareado com  $p < 0,05$  pode-se verificar que os valores médios de FPS das formulações são estatisticamente diferentes. Portanto, podemos dizer que o lipossoma foi capaz de aumentar o FPS à seco da formulação.

TABELA 13: Resultado do FPS *in vivo* (média  $\pm$  D.P.) das formulações MCO livre e lipossoma/MCO.

MCO livre	Lipossoma/MCO	
FPS a seco	FPS a seco	FPS após 40 minutos de imersão em água
7,0 $\pm$ 1,6	11,5 $\pm$ 2,7	5,8 $\pm$ 1,4

Ao compararmos os valores de FPS do lipossoma/MCO a seco e após imersão em água verificamos uma diminuição do valor do FPS após imersão em água (teste t não pareado,  $p < 0,05$ ). A ausência de resistência á água se deve, provavelmente, ao fato do lipossoma/MCO ser incorporado em uma base totalmente aquosa, o gel de Aristoflex®.

### **6.9 Perfil de liberação *in vitro***

A determinação do perfil de liberação de ativos é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de formulações mais eficazes e seguras, já que permite a avaliação da capacidade de um ativo se difundir de uma formulação. Sendo assim, o modelo bicompartimental com célula de difusão vertical e membrana sintética tem sido bastante empregado para a determinação dos perfis de liberação de ativos para uso tópico, pois consiste na quantificação destes ativos em função da sua partição do veículo para uma solução receptora correlacionando com a área de aplicação e o tempo. O estudo da liberação *in vitro* visou prever o comportamento termodinâmico das formulações antes da realização de estudos de penetração *in vivo* (HAIGH & SMITH, 1994; MONTEIRO, 2008).

Após um pequeno lag time, observou-se um perfil de liberação do MCO linear com o tempo, permitindo o cálculo do fluxo no estado estacionário (Jss) para cada formulação. Os valores de Jss (TABELA 14) foram calculados para cada uma das seis unidades de ensaio de cada uma das duas formulações, por regressão linear, a partir do tempo de 60 minutos, considerando-se que o equilíbrio fora alcançado a partir desse ponto. A TABELA 14 mostra a média dos fluxos das seis células de cada formulação em teste com o erro padrão da média obtido.

TABELA 14: Fluxo  $\pm$  erro padrão da média das formulações contendo MCO livre e Lipossoma/MCO.

Formulação	Fluxo (Jss) ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )
MCO Livre	6,345 $\pm$ 0,523
Lipossoma MCO	3,948 $\pm$ 0,185

Os valores apresentados na TABELA 15 e plotados no gráfico da FIGURA 25 representam a média da concentração de MCO liberada em cada tempo com os respectivos erros padrão da média das seis unidades de ensaio, para cada uma das formulações.

Estes dados mostram que o gel com MCO livre apresentou maior fluxo  $6,3 \pm 1,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ , cedendo maior quantidade de filtro para a solução receptora  $24,06 \pm 3,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ao final das 3 horas de experimento (180 minutos). Os elevados valores de desvio padrão mostram que houve grande variabilidade entre as seis células utilizadas.

A formulação gel com lipossoma/MCO apresentou fluxo de  $3,9 \pm 0,33 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  e a quantidade do ativo cedida foi a menor,  $14,70 \pm 0,98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  em 180 minutos de experimento. Esta formulação apresentou um baixo desvio padrão, mostrando uma pequena variabilidade entre as seis células do ensaio de liberação. Os valores de fluxo demonstraram que existe diferença estatisticamente significativa (teste t não pareado,  $p < 0,05$ ) entre a formulação com lipossoma/MCO e a formulação gel com MCO livre.

TABELA 15: Quantidade total de MCO cedida e quantidade cedida por área  $\pm$  erro padrão da média (EPM) das formulações MCO livre e Lipossoma/MCO.

Tempo	Quantidade Total Cedida $\pm$ E.P.M. ( $\mu\text{g}$ )		Quantidade Cedida/Área $\pm$ E.P.M. ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	
	MCO Livre	Lipossoma/MCO	MCO Livre	Lipossoma/MCO
30	12,81 $\pm$ 7,70	7,40 $\pm$ 1,74	8,11 $\pm$ 2,44	4,68 $\pm$ 0,49
60	18,49 $\pm$ 8,69	10,85 $\pm$ 2,47	11,70 $\pm$ 2,75	6,86 $\pm$ 0,70
90	23,74 $\pm$ 8,75	13,90 $\pm$ 2,80	15,02 $\pm$ 2,77	8,79 $\pm$ 0,79
120	28,81 $\pm$ 9,43	16,80 $\pm$ 2,96	18,23 $\pm$ 2,98	10,63 $\pm$ 0,84
150	33,31 $\pm$ 11,02	19,90 $\pm$ 3,06	21,08 $\pm$ 3,49	12,59 $\pm$ 0,87
180	38,02 $\pm$ 11,43	23,22 $\pm$ 3,47	24,06 $\pm$ 3,62	14,70 $\pm$ 0,98

As quantidades de filtro solar cedidas por área foram estatisticamente diferentes a partir do tempo de 90 minutos, mostrando que as formulações liberam o filtro solar de forma diferente e que o lipossoma é capaz de modificar a liberação do filtro MCO, liberando-o mais lentamente. Provavelmente, o lipossoma alterou a atividade termodinâmica da formulação lipossoma/MCO, tornando desta forma, mais lenta a difusão do MCO da formulação com lipossoma para a solução receptora. O lipossoma fornece um meio lipofílico para o MCO dentro da formulação. Meio pelo qual este filtro possui maior afinidade por ser lipofílico o que dificulta a sua difusão da formulação para a solução receptora, o mesmo não ocorre com a formulação com MCO livre que é totalmente hidrofílica permitindo uma difusão mais rápida do MCO para a solução receptora. (EL MAGHRABY et al, 2008; BOUWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002).

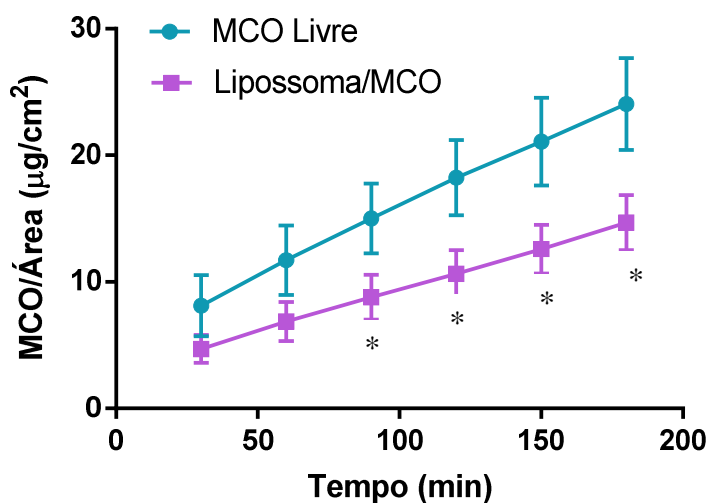


FIGURA 26: Quantidade de MCO total cedida por área encontrada para as formulações contendo MCO livre (●) e Lipossoma/MCO (■), os tempos estatisticamente diferentes foram marcados com asterisco.

### 6.10 Biometria Cutânea

A hidratação do estrato córneo afeta diretamente a permeabilidade, as propriedades mecânicas, bem como, a regulação de enzimas hidrolíticas envolvidas no processo normal de descamação dos corneócitos. Sabemos que o grau de hidratação da pele pode alterar as funções de barreira da pele e que quanto maior a hidratação maior a permeabilidade do estrato córneo. Sendo assim, é importante conhecer o grau de hidratação da pele antes da aplicação de um ativo cosmético ou medicamento na pele. Da mesma forma, o ambiente ácido da superfície da pele tem papel fundamental na homeostase da permeabilidade cutânea, na restauração da barreira rompida e na defesa antimicrobiana inespecífica. Os lipídios provenientes da secreção sebácea, por sua vez, formam uma camada protetora em toda a extensão da pele e participa dos mecanismos inespecíficos de proteção. Apesar de não afetarem diretamente a permeabilidade, podem aumentar a perda de água da pele diminuindo a sua hidratação e consequentemente a permeabilidade

(DARLENSKI, et al, 2009). Deve-se a esses fatores a importância de se avaliar as características da pele como barreira antes de realizarem-se os ensaios de *tape stripping* para melhor discutir os resultados obtidos.

Os valores de pH e hidratação dos antebraços direito e esquerdo das voluntárias estão representados na TABELA 16. O teor lipídico dos antebraços de todas as voluntárias foi igual à zero.

TABELA 16: Biometria cutânea onde BD = braço direito e BE = braço esquerdo. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.

Voluntário	Hidratação		pH	
	BD	BE	BD	BE
1	30,8 ± 2,5	25,6 ± 7,2	7,1 ± 0,7	7,0 ± 0,5
2	38,6 ± 7,0	39,2 ± 4,2	7,6 ± 0,3	7,0 ± 0,5
3	41,2 ± 4,5	38,2 ± 4,4	9,4 ± 0,3	8,5 ± 1,5
4	41,4 ± 7,9	36,6 ± 4,6	8,1 ± 1,3	8,6 ± 0,9
5	37,0 ± 3,2	34,2 ± 5,7	8,0 ± 1,1	5,1 ± 0,9
6	42,6 ± 3,8	40,2 ± 4,1	5,8 ± 0,5	6,7 ± 0,8
7	61,2 ± 3,5	50,6 ± 4,1	6,9 ± 0,6	7,1 ± 1,4
8	30,6 ± 4,5	31,2 ± 2,1	6,5 ± 1,3	7,6 ± 1,6
9	32,4 ± 2,9	35,6 ± 3,7	8,5 ± 0,5	7,7 ± 0,9
10	34,8 ± 2,7	33,4 ± 2,5	10,1 ± 1,1	8,7 ± 0,9

De acordo com a TABELA 16 a superfície da pele dos antebraços de todos os voluntários avaliados foi classificada como seca, pois obtiveram grau de hidratação abaixo de 80 UA (SERUP & JEMEC,1995; GASPARG, 2001). Os valores de pH variaram bastante e a maioria dos voluntários tiveram pH superior a faixa encontrada na literatura 5,5 – 5,8. Para melhor discutir os



resultados os voluntários foram divididos em dois grupos: voluntários com pH cutâneo até 7,4 e voluntários com pH cutâneo maior que 7,4. Aplicando o mesmo raciocínio do pH com o grau de hidratação, os voluntários foram divididos em voluntários com hidratação cutânea até 35 e voluntários com hidratação cutânea maior que 35. Estes dados foram analisados em conjunto com os valores de quantidade de MCO encontrados no EC com o objetivo de verificar se o pH e/ou o grau de hidratação da pele influenciaram na absorção do MCO pelo EC.

## **6.11 Tape Stripping**

### **6.11.1 Determinação da metodologia de extração do MCO em fitas conjuntas**

A metodologia de extração do MCO das fitas foi testada inicialmente em fitas individuais utilizando três diferentes tipos de solventes (etanol 96<sup>o</sup>GL, etanol 90:10 e etanol 70:10) e agitação com vórtex durante 2 minutos. O etanol foi selecionado devido à alta solubilidade do MCO neste solvente (THE MERK INDEX, 2001), por sua baixa toxicidade, baixo custo e disponibilidade.

De acordo com os valores encontrados na TABELA 17 concluiu-se que as melhores misturas para a extração do MCO nas fitas foram etanol 96<sup>o</sup>GL e etanol 90:10, com percentuais médios de recuperação de 103,2% e 85,5% respectivamente. A mistura etanol:água 70:10 foi descartada pois não conseguiu extrair o MCO de forma eficiente das fitas oferecendo percentual de recuperação muito baixo, de apenas 12,9%.

TABELA 17: Recuperação do MCO em fitas individuais com agitador magnético

<b>Solvente</b>	<b>Recuperação média de MCO (%)</b>	<b>DP</b>	<b>DPR</b>
Etanol 96°GL	103,2	5,76	5,59
Etanol:Água 90:10	85,5	7,40	8,65
Etanol:Água 70:10	12,9	0,391	3,04

Sendo assim, o etanol 96°GL e o etanol 90:10 foram os solventes escolhidos para dar sequencia a extração do MCO nas 10 fitas conjuntas após extração do EC. Nesse teste, além das duas misturas escolhidos, variou-se também o métodos de agitação: a) com agitador magnético durante 1 hora (TABELA 18); b) com vórtex durante 2 minutos (TABELA 19). Os resultados obtidos com os dois solventes e a duas condições de agitação foram semelhantes. Portanto, a extração do MCO das fitas conjuntas foi realizada utilizando-se etanol 90:10 e agitação em vórtex por ser mais rápida e possibilitar a quantificação de todas as amostras em um mesmo dia de experimento.

TABELA 18: Recuperação do MCO em fitas conjuntas com agitador magnético

<b>Solvente</b>	<b>Recuperação média de MCO (%)</b>	<b>DP</b>	<b>DPR</b>
Etanol 96°GL	100,01	9,98	9,98
Etanol:Água 90:10	85,5	14,21	13,58

TABELA 19: Recuperação do MCO em fitas conjuntas com agitação em vórtex

Solvente	Recuperação média de MCO (%)	DP	DPR
Etanol 96°GL	93,77	9,78	10,42
Etanol:Água 90:10	81,62	9,04	11,08

### 6.11.2 Penetração do MCO no extrato córneo – Tape Stripping

A TABELA 20 apresenta a quantidade de MCO em  $\mu\text{g}$  que penetrou no EC por área ( $\text{cm}^2$ ) após a aplicação de aproximadamente 15 mg de formulação nos antebraços de 10 voluntários sadios. Os valores da TABELA 20 encontram-se plotados no gráfico da FIGURA 26.

TABELA 20: Penetração do MCO no extrato córneo de 10 voluntários sadios. Média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.).

Tempo (min)	Quantidade de MCO no E.C. ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	
	MCO livre	Lipossoma/MCO
15	8,66 $\pm$ 1,15	12,04 $\pm$ 4,01
60	10,24 $\pm$ 0,91	16,21 $\pm$ 5,40
120	12,21 $\pm$ 1,76	17,26 $\pm$ 5,75
240	14,57 $\pm$ 2,30	22,64 $\pm$ 7,55

Com estes resultados podemos verificar que foi encontrada maior quantidade de MCO por  $\text{cm}^2$  de EC nos antebraços onde foi aplicada a formulação lipossoma/MCO, um total de 22,64  $\pm$  7,55  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  após os 240

minutos de experimento. Já nos antebraços em que a formulação com MCO livre foi aplicada verificamos que a quantidade de MCO por  $\text{cm}^2$  foi de  $14,57 \pm 2,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  em 240 minutos, o erro padrão da média foi mais baixo para a formulação com MCO livre indicando uma menor variabilidade entre as respostas.

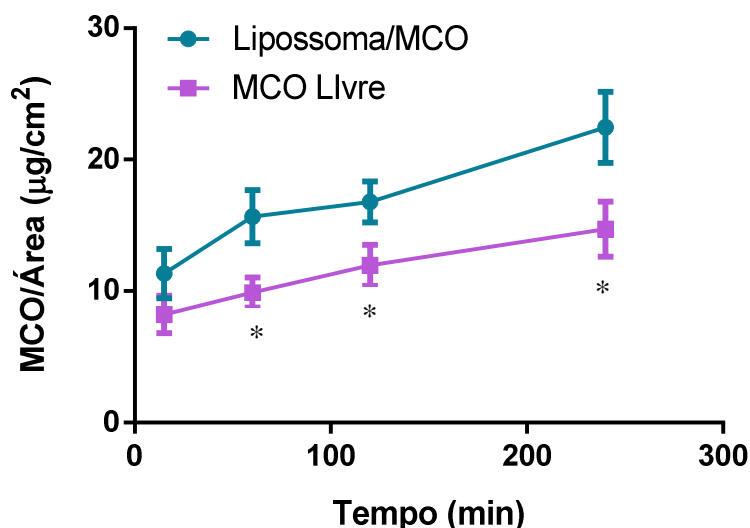


FIGURA 27: Penetração do MCO no extrato córneo a partir das formulações MCO livre (■) lipossoma/MCO (●) empregando-se o *tape stripping*.

Com a análise estatística dos dados obtidos podemos verificar que houve diferença significativa quanto à penetração cutânea de MCO entre as duas formulações testadas nos tempos 60, 120 e 240 (marcados com asterisco).

A captação de MCO pelo EC foi maior após o tratamento com a formulação lipossoma/MCO. A FIGURA 26 mostra o percentual de MCO recuperado do número total das fitas (10 fitas) após os diferentes tempos de aplicação (15, 60, 120, 240). Os resultados da FIGURA 27 correspondem ao valor médio dos 10 voluntários para cada tempo. Após as 4 horas de experimento verificou-se que o percentual de recuperação das 10 fitas não excedeu 2% para nenhuma das formulações. Mas, comparando-se o percentual de recuperação das duas formulações, verificou-se que o lipossoma apresentou maiores percentuais do que a formulação convencional.

Os resultados de penetração cutânea obtidos das duas formulações testadas (lipossoma e convencional) por tape stripping demonstraram que quantidades maiores de MCO por área foram recuperadas das fitas obtidas da formulação lipossoma/MCO em comparação com a formulação convencional. O lipossoma/MCO pode se misturar com os lípidos intercelulares e causar a sua expansão, sem alterar a estrutura do EC produzindo uma barreira lipídica extra na pele sem alterar a estrutura de bicamadas múltiplas do EC, uma vez que os lipídios intercelulares são importantes no controle da absorção percutânea (VERMA, 2003).

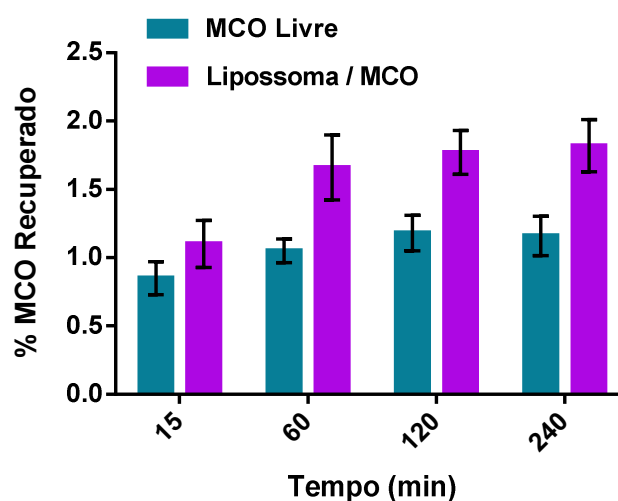


FIGURA 28: Percentual de recuperação do MCO das fitas adesivas

Estes resultados são similares àqueles relatados por Monteiro (2012) cujo trabalho demonstrou que grandes quantidades de MCO foram encontradas na epiderme de orelha de porco após aplicação de uma formulação contendo MCO lipossomado. Neste trabalho, aproximadamente 56% do MCO lipossomado aplicado permaneceu na pele e apenas 29% passaram para a derme (MONTEIRO, 2012). Portanto, o lipossoma pode prover um sistema carreador de liberação modificada e agir como um reservatório para o filtro solar MCO, aumentando o tempo de permanência nas camadas superiores do EC, aumentando o FPS da formulação, diminuindo a

degradação enzimática do MCO pelas lipases da pele e evitando a absorção sistêmica.

A variação do pH da superfície da pele das voluntárias não influenciou na captação do MCO pelo EC (FIGURA 28), pois não houve diferença significativa entre a quantidade de MCO encontrada no EC dos voluntários com pH cutâneo  $\leq 7,4$  e as respostas daqueles com pH cutâneo  $> 7,4$ , tanto para a formulação com MCO livre e quanto para a formulação lipossoma/MCO. Embora tenha havido diferença para o lipossoma/MCO no ponto de 120 minutos, não houve diferença entre as curvas como um todo (teste t pareado e não pareado,  $p < 0,05$ ).

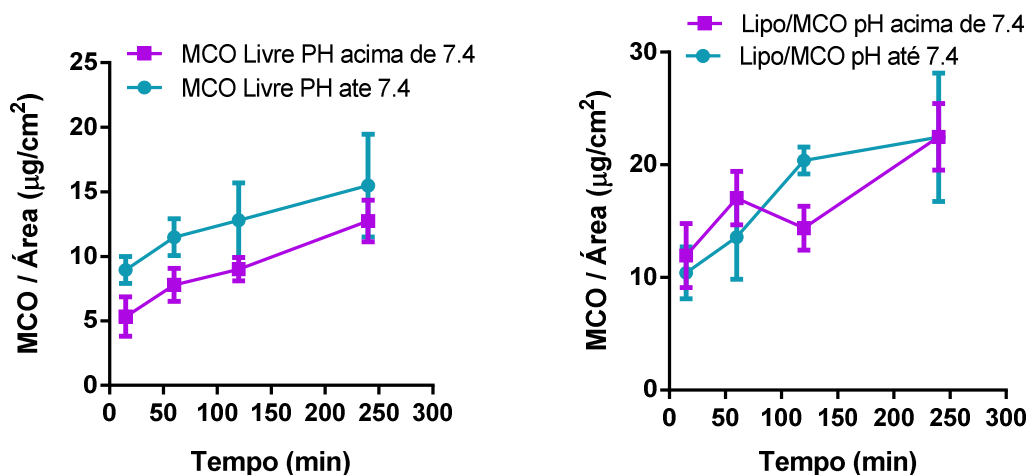


FIGURA 29: Influência do pH da superfície cutânea na captação do MCO pelo EC

A variação no grau de hidratação cutânea dos voluntários também não afetou a captação de MCO pelo EC (FIGURA 29), pois as quantidades absorvidas de MCO, a partir da formulação com MCO livre, foram estatisticamente iguais em todos os tempos, exceto no tempo de 60 minutos. Embora tenha havido diferença para o lipossoma/MCO neste ponto, não houve diferença entre as curvas como um todo, podendo-se afirmar que não houve, portanto, diferença estatisticamente significativa na captação de MCO com a variação de grau de hidratação e o pH da superfície cutânea (teste t pareado e

não pareado,  $p < 0,05$ ). Estes resultados são importantes já que o pH e a hidratação do EC podem modificar as propriedades de barreira da pele alterando a penetração do MCO.

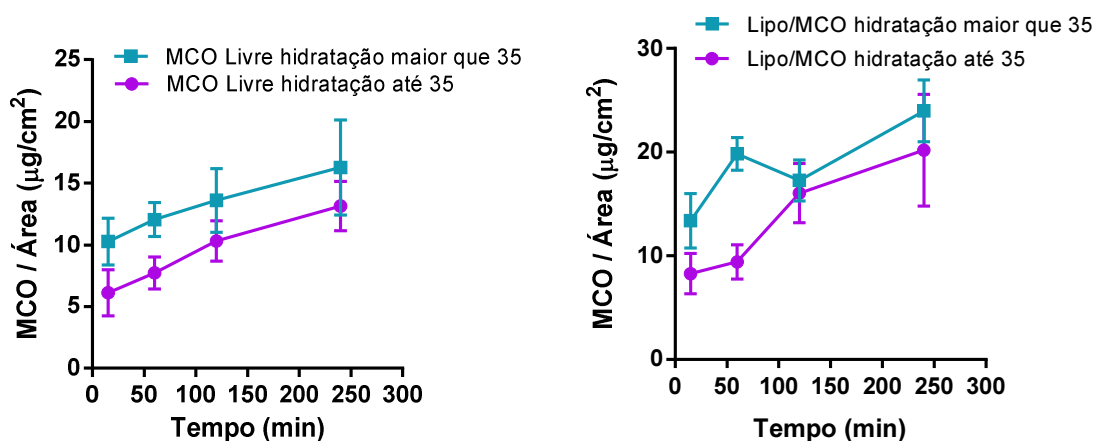


FIGURA 30: Influência da hidratação da superfície cutânea na captação do MCO pelo EC

Estes resultados indicam fortemente que os lipossomas são excelentes carreadores para o filtro solar MCO devido ao aumento de retenção do MCO no estrato córneo, minimizando a penetração para camadas mais profundas da pele e proporcionando aumento de FPS. Com isso, podem-se obter formulações fotoprotetoras mais seguras e eficazes.

## 7 CONCLUSÕES

- O nanossistema lipossoma/MCO foi preparado com sucesso pelo método de hidratação do filme lipídico.
- No ensaio de avaliação do lipossoma/MCO como substrato da lipase microbiana verificou-se que os lipossomas não foram hidrolisados pela lipase microbiana.
- Nos ensaios de biodistribuição com o lipossoma/MCO marcado com tecnécio-99-m observou-se que o lipossoma teve a pele como principal órgão de deposição o que comprova o efeito reservatório do nanossistema lipossoma/MCO.
- No HET-CAM, a formulação em gel contendo o lipossoma/MCO foi considerada não irritante provando que esta formulação é segura para aplicação na pele.
- Os valores de FPS *in vitro* das formulações lipossoma/MCO e MCO livre não tiveram diferença significativa .
- O FPS *in vivo*, mostrou valores superiores de FPS a seco para o lipossoma/MCO em gel. Porém, não mostrou resistência à água.
- O perfil de liberação *in vitro* das formulações mostrou que o lipossoma é capaz de modificar a liberação do filtro solar MCO.
- O ensaio de biometria cutânea revelou que a variação de pH e hidratação da superfície cutânea dos voluntários não influenciaram na captação do MCO pelo EC.
- O ensaio de *tape stripping* mostrou que o lipossoma é capaz de aumentar a captação do MCO pelo EC.
- Estes resultados indicam fortemente que os lipossomas são excelentes carreadores para o filtro solar MCO aumentando a eficácia e a segurança das formulações fotoprotetoras.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Brasil). Resolução RDC nº 30, de 1º de junho de 2012. Regulamento técnico mercosul sobre protetores solares em cosméticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 jun. 2012. Disponível em: Disponível em: <http://www.e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 jan. 2013.

\_\_\_\_\_. 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: 20 ago. 2012.

\_\_\_\_\_. 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: 20 out. 2011.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. **Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6.ed. Baltimore: Premier, 2000, p.195-197.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2005.

AZULAY, R.D.; AZULAY, D.R. **Dermatologia**, 2ª edição revisada e atualizada, 1999.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 14, p.101-114, 2001.

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

BETZ, G. *et al.* *In vivo* comparison of various liposome formulations for cosmetic application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p. 44-54, 2005.

BLANCO, M.D.; BERNARDO, M.V.; TEIJÓN, C.; SASTRE, R.L.; TEIJÓN, J.M. Transdermal application of bupivacaine-loaded poly(acrylamide(A)-co-monomethyl itaconate) hydrogels. **International Journal of Pharmaceutics**, v.255, p.99-107, 2003.

BOLZINGER, M.A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, p.156-165, 2012.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced drug delivery reviews**, v.54, Suppl. 1, p. S41-S55, 2002.

BOUWSTRA, J.A. *et al.* The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v.1419, n.2, p.127-136, 1999.

COLIPA – The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association. **International sun protection factor (spf) test method, 2006**. Disponível em: <www.colipa.com>. <Acesso em: 24 jun 2010>.

CONTEAU. C.; CULLEL PEREZ. N.; CONNAN. A.E.; COIFFARD. L. J. M. ; **International Journal of Pharmaceutics**, v. 222, p. 153- 157, 2001.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p.123-133, 2001

DAMIANI, E.; ROSATI, L.; CASTAGNA, R.; CARLONI, P.; GRECI, L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 82, p. 204-213, 2006.

DANGELO, J.G.; FANTINI, C.A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

DRAIZE, J. H.; GEOFFREY, W.; HERBERT, O. C. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v.83, p.377-390, 1944.

DREHER, F.; ARENS, A.; HOSTYNEK, J. J.; MUDUMBAS, S.; ADEMOLA, J.; MAIBACH, H.I.; **Acta Dermato-Venereologica (Stockh)**, v.78, p. 186-189. 1998.

DURAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. Artliber Editora, São Paulo, SP, 2006.

EGBARIA, K.; WEINER, N. Liposomes as a topical delivery system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 5, n. 3, p. 287-300,1990.

EL MAGHRABY, G.M.; BARRY, B.W.; WILLIAMS, A.C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.34, p. 203-222, 2008.

FATTAL, E.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Méthodes de préparation des liposomes. **Lês Liposomes**, cap. 2, p. 46-47, 1993.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores Solares. **Química Nova**. V. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.

FORESTIER, J.P. Les enzymes de l'espace extra-cellulaire du stratum corneum. **International Journal of Cosmetic Science**, v.14, p.47-63, 1992

FREITAS, Z.M.F. **Avaliação biofarmacotécnica de formulações dermatológicas semi-sólidas de cetoconazol**. 154f. Tese de Doutorado em Fármaco e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FREITAS, Z.M.F. **Síntese e avaliação das propriedades fotoprotetoras de ésteres glicéricos do ácido p-metocinâmico**. 111f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

FRONZA, T.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; TEIXEIRA, H.F. Nanocosméticos. **Em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios**. Gráfica da UFRGS, Porto Alegre, 2007

GAMMER, A.O.; LEIBOLD, E.; VAN RAVENZWAAY, B. The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. **Toxicology in vitro**, v. 20, p. 301-307, 2006.

GARCIA, S. **Liposomas com Filtro Solar: preparação e controle de qualidade**. 161f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 1998.

GASPAR, L.R.; GONÇALVES, G.M.S.; PEREIRA, L.H.T.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Aplicação e padronização de metodologias não invasivas para avaliação de eficácia. **Cosmetics and Toiletries**, v.13, p.68-73, 2001.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 1– 9, 2008.

GILLET, A.; COMPÈRE, P.; LECOMTE, F.; HUBERT, P.; DUCAT, E.; EVRARD, B.; PIEL, G. Liposome surface charge influence on skin penetration behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, p. 223-231, 2011.

GOMESZ-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.

GONZALEZ H.G., FARBROT, A., LARKÖ, O. Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 27, p.691-694, 2002.

GONZALEZ, O.G. **Fundamentos de físico-química**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, cap.8, p.224-245, 2002.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE M.; GILBERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinical Dermatology** v.26, p. 614-626, 2008.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v.224, p.1-18, 2001.

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

HAYDEN, C.G.J.; ROBERTS, M.S.; BENSON, H.A.E. Systemic absorption of sunscreen after topical application. **The Lancet**, v.350, p.863-864, 1997.

HENRIQUES, B.G., SANTOS, E.P., GARCIA, S. Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos (XVII COLAMIQC) – Cusco, Peru, 2005.

HERKENNE, C.; ALBERTI, I.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; MATHY, F-X.; PRÉAT, V.; GUY, R.H. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 1, 2008.

IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Ultraviolet Radiation; Volume 55. Lyon, France, Sci Publ, 1992.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Validation of analytical procedures: methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

INUI, M.; ADACHI, T.; TAKENAKA, S.; INUI, H.; NAKAZAWA, M.; UEDA, M.; ET AL. Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka. **Toxicology**, v. 194, p. 43-50, 2003.

JAIN, S. K.; JAIN, N. K. Multiparticulate carriers for sun-screening agents. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 32, p.89-98, 2010.

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

JONES M.N. Surface properties and interections of vesicles. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 1, p.91-100, 1996.

JUNJINGER, H.E.; HOFLAND, H.E.J. & BOUWSTRA, J. Lipossomas e niossoams: interações com a pele humana. **Cosmetics and Toiletries** (edição em português), v.4, p. 19-27, 1992

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

KLAMMER, H.; SCHLECHT, C.; WUTTKE, W.; JARRY, H. Multi-organic risk assessment of estrogenic properties of octyl-methoxycinnamate in vivo A five day sub acute pharmacodynamic study with ovariectomized rats. **Toxicology**, v. 215, p.90-96, 2005.

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

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H.; PITTELKOW, M. Photoprotection. **The Lancet**, v. 370, n. 9586, p. 528-537, 2007.

LEONARDI, G.R.; CHORILLI, M. Dermofarmácia. **Bases Dermocosméticas, Microemulsões & Lipossomas**. RX Editora, São Paulo, 2006, 112 p.

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

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

MANCONI, M.; CADDEO, C.; SINICO, C. VALENTI, D.; MOSTALLINO, M.C.; BIGGIO, G.; FADDA, A.M. Ex vivo skin delivery of diclofenac by transcutol containing liposomes and suggested mechanism of vesicle–skin interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, p. 27-35, 2011.

MANSUR, J. S.; BREDE, 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.

MARTINI, M.C.; SEILLER, M. Actifs et additifs en Cosmetologie. Paris, Technique & Documentation, 2006.

MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced drug delivery Reviews**., v.54, S1, p.S3-S17, 2002.

MIGRATORI, S. In situ determination of partition and diffusion coefficients in the lipid bilayers of stratum corneum. **Pharmaceutical Research**, New York, v.17, n.8, 2000.

MONTEIRO, M.S.S.B. Filtros Solares em Nanocosméticos: **Desenvolvimento e Avaliação da Segurança e Eficácia**. 2008. 165 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MOSER K., KRIWET, K., KALIA, Y.N., GUY R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.

MOSER, K. *et al.* Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.52, p.103-112, 2001.

MOTA, A.C.V.; VOLPATO N.M.; FREITAS, Z.M.F.; SANTOS, E.P. Estudo de liberação *in vitro* do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila incluído em lipossoma e  $\beta$ -ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29 (3), 2008.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 343-356, 2004.

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

NETZ, P.A; GONZALEZ ORTEGA, O.G. Fenômenos de Transporte. In: NETZ, P.A; GONZALEZ, O.G. **Fundamentos de físico-química**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, cap.8, p.224-245, 2002.

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

NOHYNEK, G.J.; ANTIGNAC, E.; RE, T.; TOUTAIN, H.; Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, p. 239-259, 2010.

OSTERWALDER, U.; LUTHER, H.; HERZOG, B. Novo protetor UVA. **Cosmetics and Toiletries**, v. 12, jul/ago, 2000.

PATTANAARGSON, S. *et al.* Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.161, p.269-274, 2004.

PERSHING, L.K . Dermatopharmacokinetics for assessing bioequivalence of topically applied products in human skin. **Cosmetics and Toiletries**, v. 115, n. 5, p.43- 51, 2000.

PERUGINI, P. *et al.* Intracellular delivery of liposome-encapsulated prolidase in cultured fibroblasts from prolidase-deficient patients. **Journal of Controlled Release**. V. 102, p. 181-190, 2005.

PERUGINI, P., SIMEONI, S., SCALIA, S., GENTA, I., MODENA, T., CONTI, B., PAVANETTO, F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of

the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-metoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, p. 34-45, 2002.

RAMOS, M.F.S. **Perspectivas da utilização dos extratos de Própolis, Aloe spp. e Hamamelis virginiana como agentes antisolares: avaliação espectrofotométrica e fototóxica.** 1995. 155p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

RIBEIRO, R.P. **Desenvolvimento e Validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS in vitro em formulações fotoprotetoras comerciais.** 2004. 77p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

ROUGIER, A.; RALLIS, M.; KRIEN, P.; LOTTE, C. *In vivo* percutaneous absorption: a key role for stratum corneum/vehicle partitioning. **Archives of Dermatological Research**, v.282, n.8, p.498-505, 1990.

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.

SÁ, L.T.M.; ALBERNAZ, M.S.; PATRICIO, B.F.C.; FALCÃO JUNIOR, M.V.; COELHO, B.F.BORDIM, A., ALMEIDA, J.C. Biodistribution of nanoparticles: initial considerations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p.602-604, 2012.

SANTIS, A. K. **Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica.** 2008, 157p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

SANTOS, E. P. *et al.* *In vitro* and *in vivo* determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. **International Journal of Cosmetic Science.**, v. 21, p. 1-5, 1999.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v.25, nº 6B, p.1181-1185, 2002

SANTOS, V.M. **Preparação de filtros solares em nanosistema visando à maior ação fotoprotetora.** 2007. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.



SARVEIYA, V. Skin penetration and systemic absorption of sunscreens after topical application. **Journal of American Academy of Dermatology**, P75 P288, março 2004.

SCALIA, S., CASOLARI, A., IACONINOTO, A., SIMEONI, S. Comparative studies of the influence of cyclodextrins on the stability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 30, p. 1181-1189, 2002.

SCHALLER, M.; KORTING, H.C. Interactions of liposomes with human skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, p. 303-309, 1996

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

SCHLUMPF, M.; COTTON, B.; CONSCIENCE, M.; HALLER, V.; STEINMANN, B.; LICHTENSTEIGER, W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 3, p.239-244, 2001.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. Introdução aos produtos fotoprotetores. **Cosmetics and Toiletries**, v. 12, jul/ago, 2000.

SCHULZ, J. *et al.* Distribution of sunscreen on skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, suppl. 1, s 157-s 163, 2002.

SERUP, J.; JEMEC, E.B.G. Handbook of non-invasive methods and the skin. CRC Press 1995.

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

SHAATH, N.A. **The Encyclopedia of Ultraviolet Filters**, Allured Publishing Corporation, IL, USA, 2007.

SHAATH, V.P. IV-IVC for topically applied preparations-a critical evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.60, n.2, p.309-314, 2005.

SHAH, V.P.; *et al.* Bioequivalence of topical dermatological dosage forms: methods of evaluation of bioequivalence. **Pharmaceutical Research**, Norwell, v.15, n.2, p.167-171, 1998.

SHAH, V.P.; ELKINS, J.S.; WILLIAMS, R.L. E.; Evaluation of the 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.

SINGH, S.; SINGH, J. Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: a review. **Medical research review**, v.13, n. 15, p. 569-621, 1993

SOARES, M.V. **Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo zinco(II)ftalocianina para uso na terapia fotodinâmica do câncer.** 2009, 142 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

SOEBERG, T.; BASSE, L.H.; HALLING-SORENSEN, B. Risk assessment of topically applied products. **Toxicology**, v.236, p.140-148, 2007

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

SURBER C.; WILHELM K.P.; HORI M.; MAIBACH, H.I.; GUY, R.H. Optimization of topical therapy: partitioning of drugs into stratum corneum **Pharmaceutical Research**, v.7, n.12, p.1320-1324, 1990.

THE COMPLETE DRUG REFERENCE, Martindale, 32. ed, Pharmaceutical Press, p.1093-1094, 1999.

THE MERCK INDEX. Thirteenth Edition, Merck Co. Inc., USA, ISBN: 0911910-13-1, P.1213, 2001.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 64, p. 99-104, 2001.

VELASCO de PAOLA, M. V.; RIBEIRO, M. E. Interação entre Filtros Solares. **Cosmetics and Toiletries**, v. 10, set/out, 1998.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as 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.

VIGLIOGLIA, P. Cosmiatria II. Ap Americana de publicaciones S.A, Buenos Aires , 1989.

VOLPATO, N.M., GARCIA, S., GONÇALVES, J.R.O., SALES, W.D.R., SANTOS, E.P. Evaluation of skin permeation of octyl methoxycinnamate in liposomes. IV Pharmatec. Proceedings of the IV Pharmatec: **New perspectives in drug delivery systems**. P.67. Rio Grande do Norte. Brazil. Aug.1999.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.603-618, 2004.

WYSS, R. Chromatography of retinoids. **Journal of Chromatography B**, v. 531, p. 481-508. 1990

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.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e investimentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n. 2, p. 94-101, 2008.

ZATZ, J.L. Skin Permeation-Fundamentals and Application. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993.

**ANEXO**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho  
Faculdade de Medicina  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

CEP - MEMO – n.º 199/11

Rio de Janeiro, 25 de abril de 2011.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Prof<sup>a</sup> Aline de Carvalho Varjão Mota

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. S.a. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa páginas 001 a 019 e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 120/10 - CEP

Título: “Avaliação da penetração e biometria após aplicação do filtro solar p-metoxicinamato de octila em nanocosmético”.

Pesquisador (a) responsável: Prof<sup>a</sup> Aline de Carvalho Varjão Mota

Data de apreciação do parecer: 14/04/2011

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 14/10/2011, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof. Carlos Alberto Guimarães  
Coordenador do CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE FARMÁCIA

<b>CEP-HUCFF/FM</b>
Projeto n.º 120/10
Folha n.º 1
Ass. Sec. <i>[assinatura]</i>



**Avaliação da penetração e biometria cutânea após aplicação do  
filtro solar *p*-metoxicinamato de octila em nanocosmético**

**Aluna:**

**Aline de Carvalho Varjão Mota**

**Orientadores:**

**Elisabete Pereira dos Santos (FF-UFRJ)**

**José Carlos Saraiva Gonçalves (FF-UFRJ)**

**Agosto/2010**

<b>CEP-HUCFF/FM</b>
Projeto n.º 120/10
Folha n.º 2
Ass. Sec. <i>[assinatura]</i>

## I. IDENTIFICAÇÃO

**Título do Projeto:** "Avaliação da penetração e biometria cutânea após aplicação do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila em nanocosmético"

**Pesquisador Responsável:** Aline de Carvalho Varjão Mota

**Instituição onde se realizará:** Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

**Data da apresentação ao CEP:** 18 de agosto de 2010

## II. OBJETIVOS

### II.1. Geral

Avaliar as características da pele e a extensão da penetração cutânea, em voluntários sadios, do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila (MCO) presente nas formulações semissólidas (convencional e nanocosmético), empregando metodologias não invasivas: biometria cutânea e *tape-stripping*.

### II.2. Específicos

- ◆ Desenvolver duas formulações (convencional e nanocosmético) contendo o MCO;
- ◆ Avaliar parâmetros fisiológicos da pele dos voluntários, tais como: hidratação, oleosidade, pH através de equipamentos de biometria adequados, antes de realizar os estudos de dermatofarmacocinética.
- ◆ Avaliar a extensão da penetração do MCO no estrato córneo dos voluntários sadios empregando a técnica de *tape stripping*;

## III. SUMÁRIO DO PROJETO

### III.1. Descrição e Caracterização da Amostra

#### Participantes do Estudo

Este estudo será realizado com 10 voluntários sadios, do sexo feminino devido à menor quantidade de pelos no corpo o que facilita a aplicação das formulações; maiores de 18 anos, que não possuam lesões ou doenças na

pele e que não possuam histórico de hipersensibilidade ao filtro solar de metoxicinamato de octila, e que não estejam fazendo uso de medicamentos. Estes participantes deverão evitar, na semana anterior ao estudo, o uso na pele de cosméticos que podem alterar os resultados do estudo, tais como, hidratantes, loções e perfumes. O recrutamento será realizado entre alunas, docentes e funcionárias do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFRJ. Os participantes serão recrutados através de cartazes espalhados pelo CCS. As alunas que podem ser inseridas no estudo não serão necessariamente alunas vinculadas aos pesquisadores/professores ou que tenham relação direta com eles podendo ser quaisquer alunas do CCS que desejarem participar voluntariamente do estudo. As participantes recrutadas para o estudo serão alunas e/ou funcionárias do CCS e, por isso, já vêm ao local diariamente não havendo despesas extras com transporte.

### **Formulações Utilizadas**

O MCO é usado em muitas formulações fotoprotetoras comercializadas mundialmente e, devido a esse fato, ele é bem caracterizado toxicologicamente. A aplicação tópica do MCO é bem tolerada e a incidência de dermatite de contato associada ao MCO é muito baixa (NASH, 2006).

É um derivado da classe dos cinamatos que absorve na faixa do UVB, apresentando absorção máxima em 310 nm. Na estrutura molecular dos cinamatos há uma insaturação extra conjugada com o anel aromático e o grupamento carbonila que permite a maior distribuição eletrônica. A energia capaz de gerar essa transição eletrônica corresponde ao comprimento de onda nas proximidades de 305 nm. A presença do grupamento 2-etilhexil no carbono oito da molécula do MCO diminui sua solubilidade em água proporcionando a eficácia das formulações fotoprotetoras que o contêm (SHAATH, 1997).

Os fabricantes na tentativa de tornar os filtros solares mais resistentes à água os tornam mais lipofílicos, como o MCO. Sendo que o aumento da lipofilicidade dessas moléculas pode favorecer a absorção cutânea das mesmas, o que não é desejável. O filtro solar deve cobrir e proteger a pele, desenvolvendo suas atividades nas camadas superiores do tecido cutâneo, ou



seja, no estrato córneo (PETRAZZUOLI, 2000; NOHYNEK & SCHAEFER, 2001; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

De acordo com Sarveiya, Risk & Benson (2004) uma quantidade significativa dos filtros solares como oxibenzona, MCO, octilsalicilato e homosalato foram encontrados em camadas mais profundas do estrato córneo 30 minutos após a aplicação em voluntários. Esta quantidade encontrada diminuiu 4 horas após a aplicação, sugerindo que pode ter ocorrido absorção para camadas mais profundas da pele, e aproximadamente 1% da dose aplicada de oxibenzona e seus metabólitos foram encontrados na urina após uma única aplicação. Além disso, estes filtros solares também foram detectados em amostras de leite materno de voluntárias (total de 16-417 ng/ g de gordura) (HANY & NAGEL, 1995).

Sistemas nanoestruturados como lipossomas, ciclodextrinas, microsferas polimérica e nanosferas têm sido empregados para assegurar a presença dos filtros solares na camada mais superficial da pele, o estrato córneo, proporcionando maior eficácia dos nanocosméticos. As vantagens da veiculação de ativos cosméticos em sistemas nanoestruturados são: melhoria das propriedades biofarmacotécnicas dos ativos, como o aumento da retenção dos ativos no estrato córneo, diminuindo sua permeação cutânea e aumentando seu Fator de Proteção Solar (FPS); controle da liberação e aumento da fotoestabilidade (PERUGINE, 2002; SCALIA, 2002; YENER, 2003; JIMÉNEZ, 2004).

As formulações semissólidas tipo gel creme são constituídas por uma base em gel, emulsificantes e substâncias oleosas, adquirindo um aspecto leitoso. Os agentes gelificantes empregados na formação do gel creme são geralmente os mesmos utilizados para a obtenção de um hidrogel convencional.

Neste trabalho, o polímero gelificante utilizado foi o fosfato de hidroxipropilamido, que possui um caráter não iônico, derivado do amido, compatível com a fosfatidilcolina, não interagindo com a bicamada fosfolipídica e conseqüentemente protegendo a integridade dos lipossomas. Na tabela 1, está descrita a composição de cada formulação desenvolvida para o estudo.

Após o preparo das formulações, essas foram caracterizadas, realizando-se a quantificação do MCO por Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência (CLAE) e determinando-se o fator de proteção solar (FPS) *in vitro* pelo método de Mansour (MONTEIRO, 2008).

TABELA 1 - Composição das formulações semissólidas desenvolvidas.

<b>Composição</b>	<b>Convencional</b>	<b>Nanocosmético</b>
<b>Fase A</b>		
Fosfato de Hidroxipropilamido	5 %	5 %
Água	q.s.p 100 mL	q.s.p 100 mL
<b>Fase B</b>		
Lauril glucosido, poligliceril 2-dipoli-hidroxiestearato e glicerina	3%	3 %
Phenova	0,5%	0,5 %
p- Metoxicinamato de octila	8%	4,75 %
Butilhidroxitolueno	0,05%	0,05 %
Lipossoma/MCO*	-	50 mL = 3,25 g de MCO

\* O sistema nanoestruturado foi preparado e caracterizado segundo Mota (2008).

As formulações testadas são formulações desenvolvidas no Laboratório de Desenvolvimento Galênico da UFRJ (LADEG/UFRJ) para a utilização neste trabalho de tese, portanto, são formulações que não tem finalidade de comercialização, por isso não possuem registro na ANVISA.

### III.2. Critérios de Inclusão

Serão incluídos no estudo 10 participantes que:

- Tiverem 18 anos ou mais;
- Forem do sexo feminino;
- Passarem na avaliação clínica da pele realizada por médico dermatologista;
- Concordarem em participar do estudo, mediante compreensão e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

### III.3. Critérios de Exclusão

Serão excluídos do estudo os participantes que:

- Recusarem-se a assinar o TCLE;
- Estiverem fazendo uso de medicamentos;
- Estiverem utilizando cosméticos com filtro solar;
- Possuírem histórico de alergia ao filtro solar MCO;
- Forem portadores de doenças onde a integridade da pele esteja comprometida.

### III.4. Metodologia

#### Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo para avaliar a capacidade do nanocosmético contendo lipossoma em reter o filtro solar MCO no estrato córneo.


#### Desenvolvimento da Pesquisa

O estudo será realizado no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG) da Faculdade de Farmácia da Universidade do Brasil (UFRJ) no período de setembro de 2010 a fevereiro de 2011.

Antes de serem incluídos nos estudos os participantes farão uma avaliação médica com a Dra. Lúcia Maria Soares de Azevedo – Prof<sup>ª</sup>. Associada da Faculdade de Medicina/UFRJ, CRM-5236934-1 na sala 05 B 11 no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ). A avaliação será realizada uma semana antes dos experimentos e consistirá em análise da pele do voluntário e determinação de peso e altura.

#### Biometria Cutânea:

A Biometria Cutânea consiste no estudo das características biológicas, mecânicas e funcionais da pele através da medição rigorosa de determinadas variáveis, por métodos cientificamente comprovados e não invasivos. Utilizando

<b>CEP-HUCFF/FM</b>
Projeto n.º 120/10
Folha n.º 7
Ass. Sec. 

a biometria, pode-se avaliar a integridade da barreira cutânea antes e após a realização dos ensaios de *tape-stripping*, medindo determinadas variáveis, tais como: pH, teor de material graxo, hidratação cutânea (SERUP, JEMEC, 1995).

Nesse estudo, o efeito das formulações dermocosméticas desenvolvidas será avaliado, empregando métodos de biometria cutânea capazes de medir a hidratação, a oleosidade e o pH da pele. Para tais medidas faz-se o uso, respectivamente, dos equipamentos Corneometer CM 820 PC; Sebumeter SM 810 PC e Skin pH-Meter, em ambiente climatizado com temperatura variando entre 20°C e 22°C, e umidade relativa do ar variando entre 40% e 50%.

- **Análise da hidratação cutânea:** mede o grau de hidratação da superfície cutânea, utilizando a medição da capacitância do EC. Este método de medição baseia-se na variabilidade do valor da constante dielétrica da água que pode ser medida através de um capacitor capaz de determinar essas variações, registrando-as automaticamente no aparelho. O aparelho possui ainda uma sonda que é colocada em contato com a pele, onde não existe contato galvânico entre o local a ser medido e o aparelho de medição. O aparelho utilizado é o Corneometer CM 820 PC.
- **Análise do teor de gordura:** baseia-se na fotometria (banda do visível) de uma fita plástica especial, a qual se torna progressivamente transparente por adsorção dos lipídios após contato com a superfície da pele em análise. A cabeça do cassete de medição contém uma tira plástica de aproximadamente 0,1 mm de espessura, que adsorve a gordura ao ser colocada em contato com a pele. O tempo de medição é de 30 segundos. Seguidamente o cassete é colocado no aparelho onde uma célula fotoelétrica avalia a transparência da tira plástica, quantificando assim o conteúdo lipídico da superfície cutânea. O aparelho utilizado é o Sebumeter SM 810 PC.
- **Análise do pH da superfície cutânea:** determinado instantaneamente por potenciometria direta, isto é, através de um eletrodo especial. A avaliação do pH através de aparelhos de biometria é considerada como

o único método técnico e cientificamente comprovado. A medição é rápida e sem dificuldades, garantindo resultados precisos. A determinação do pH requer um eletrodo especialmente concebido através de uma fina membrana de vidro com uma face plana, de forma a assegurar um contato total com a pele. O aparelho utilizado é o Skin pH-Meter.

As avaliações de hidratação, secreção sebácea, pH e eritema permitem detectar em uma etapa prematura qualquer alteração na capacidade protetora da pele.

Os participantes incluídos no estudo irão aplicar a formulação nos antebraços diariamente durante um mês. Os ensaios de biometria serão realizados após sete, quinze e trinta dias de aplicação das formulações. Fazer um intervalo de um mês entre uma formulação e outra (DECACHE, 2006).

A metodologia envolve a aplicação de cada formulação (uma de cada vez com intervalo de um mês) pelos voluntários em seus antebraços, duas vezes ao dia, durante trinta dias consecutivos. As avaliações de biometria serão realizadas antes do uso das formulações (tempo zero) e após os sete, quinze, vinte e trinta dias de uso das mesmas para efeito comparativo de resultados. Nos dias determinados para avaliação da biometria, os voluntários serão acomodados em ambiente climatizado, com temperatura entre 20°C e 22°C, e umidade relativa na faixa de 50-60%, por 20 a 30 minutos antes dos testes. A área de aplicação (antebraços) será lavada com água e sabonete líquido neutro, e enxugada com toalha de papel macia. A medida será realizada em 5 a 10 minutos após a limpeza dos antebraços.

Após a realização dos estudos de biometria serão realizados os ensaios de tape stripping com os mesmos voluntários, com intervalo de um de um mês entre os ensaios.

#### *Avaliação da extensão e penetração do MCO:*

A avaliação da extensão e penetração do filtro solar pelo EC em voluntários sadios será realizada empregando a técnica de *tape stripping* ou "remoção do estrato córneo" por fita adesiva.

O experimento será realizado em uma sala climatizada com temperatura entre 20°C e 22°C, e umidade relativa na faixa de 50-60%, e consistirá na aplicação da formulação nos antebraços dos voluntários:

- Uma hora antes do experimento, os antebraços do voluntário serão lavados com água corrente e sabonete neutro.
- Serão demarcadas cinco áreas em cada antebraço, para estudo da mesma formulação em duplicata.
- A formulação será aplicada nas áreas demarcadas, com auxílio de uma haste com ponta de algodão (Cotonetes®) de modo uniforme quanto à distribuição e quantidade (5-10 mg/cm<sup>2</sup>). Serão aplicadas duas formulações em cada voluntário, com um intervalo de 15 a 30 dias entre cada formulação, tempo necessário para eliminação completa do fármaco até a próxima aplicação.
- As áreas de cada braço possuem um tempo determinado de espera para a retirada da amostra, sendo 15, 60, 120 e 240 minutos. Também há uma área de controle, sem aplicação de formulação (Figura 1).

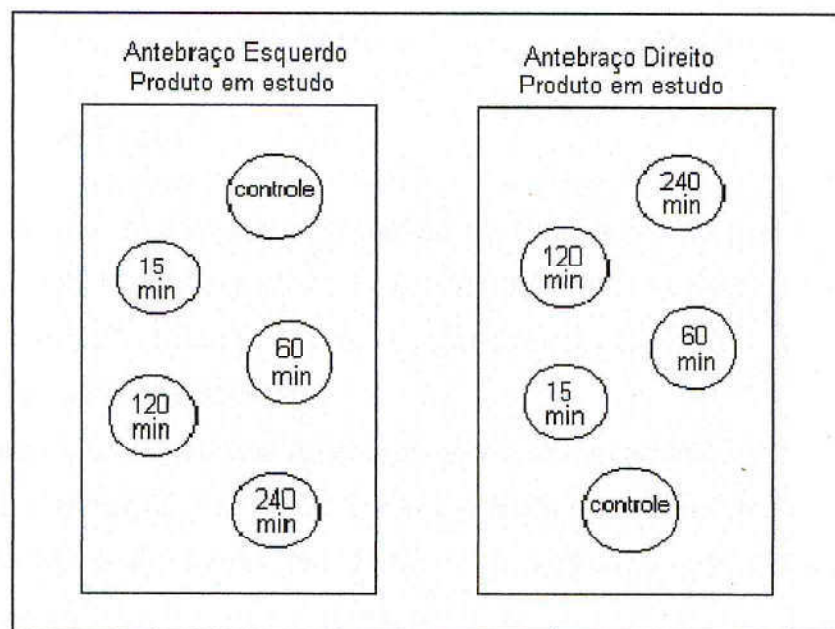


Figura 1: Esquema da metodologia empregada

- Após cada tempo, remover o excesso do fármaco da área específica limpando-a três vezes com algodão. A seguir, será realizada a coleta de

estrato córneo com o auxílio de fita adesiva hipoalergênica Transpor® marca 3M do Brasil. Em cada área serão aplicadas e retiradas 11 fitas adesivas consecutivas com área de um cm<sup>2</sup>. Dessa forma é possível coletar células do estrato córneo, juntamente com o fármaco que penetrou na pele nessa camada.

- As fitas adesivas correspondentes a um determinado tempo serão transferidas para um tubo de ensaio contendo solvente extrator e levadas à análise em até 48 horas.
- A técnica *tape-stripping* não causa nenhum tipo de dano sério ao voluntário. Poderá ocorrer leve irritação local (vermelhidão) que desaparecerá após alguns minutos.
- O voluntário participante do estudo deve se comprometer a:
  - Estar disponível durante aproximadamente 5 horas, em 3 dias alternados por um intervalo de 15 a 30 dias, marcados de acordo com a conveniência dos pesquisadores e voluntários. O experimento será realizado no laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos.
  - Não usar hidratante, perfume ou qualquer outro cosmético ou medicamento na região dos antebraços 24 horas antes do experimento.

### **Considerações Éticas**

O presente projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (e-mail: [cep@hucff.ufrj.br](mailto:cep@hucff.ufrj.br); tel.: 2562-2480, fax: 2562-2481). Nenhum procedimento previsto no protocolo será iniciado antes da sua aprovação.

Os objetivos e procedimentos do estudo estão explicitados no TCLE, elaborado conforme a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos. No TCLE será explicado que a participação é estritamente voluntária e que o participante poderá se recusar a participar do estudo ou dele se retirar a qualquer momento sem justificativas, sem que isso traga qualquer prejuízo ao seu atendimento futuro. Uma cópia do termo de consentimento ficará com o participante.

Os procedimentos do estudo não apresentam risco para os voluntários e a concentração de MCO utilizada nas formulações está de acordo com a legislação vigente (BRASIL, RDC nº 47/2006). Os benefícios esperados do estudo são para a coletividade, auxiliando na formulação de novos fotoprotetores mais seguros e eficazes.

Os dados obtidos de informantes ou de registros dos serviços serão tratados como confidenciais pela equipe do estudo. A divulgação dos resultados será feita com dados consolidados, de forma a não permitir a identificação de indivíduos.

### **Análise Estatística**

Os dados obtidos serão analisados estatisticamente empregando-se Análise de Variância (ANOVA), com modelo de planejamento com um e/ou dois fatores fixos, com nível de significância ( $\Rightarrow$ ) de 5%.

### **Local da Pesquisa**

Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG) da Faculdade de Farmácia da Universidade do Brasil (UFRJ)

### **Demonstrativo da existência de infra-estrutura**

O Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG) da Faculdade de Farmácia da Universidade do Brasil (UFRJ) possui sala climatizada com temperatura entre 20°C e 22°C, e umidade relativa na faixa de 50-60%, e os equipamentos e materiais necessários para os estudos.



## Financiamento do Projeto

<b>CEP-HUCFF/FM</b>
Projeto n.º 120/10
Folha n.º 12
Ass. Sec. <i>[assinatura]</i>

O presente estudo faz parte do projeto de doutoramento da farmacêutica Aline de Carvalho Varjão Mota, inserido no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos na Faculdade de Farmácia da Universidade do Brasil (UFRJ). Este trabalho conta, até o momento, com a taxa de bancada da CAPES e apoio dos Projetos de Extensão: "Farmácia Universitária" e "Laboratório de Farmacomетria – LabFarma" da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## IV. Cronograma

Atividades	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar
Preparação do projeto	X	X								
Encaminhamento do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)			X	X	X					
Avaliação da formulação convencional (sem MCO) nos voluntários						X				
Avaliação do nanocosmético nos voluntários							X			
Quantificação do MCO por CLAE								X		
Cálculos e elaboração de gráfico e tabelas						X	X	X		
Análise estatística dos dados								X		
Discussão dos resultados								X	X	
Apresentação dos dados								X	X	
Elaboração de publicações								X	X	X

## V. Bibliografia

BRASIL. Resolução RDC n.º 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: 25 de nov. 2009.

DECACCHE, D.S. Formulação dermocosmética contendo DMAE glicolato e filtros solares: desenvolvimento de metodologia analítica, estudo de estabilidade e ensaio de biometria cutânea. 2006. 152f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

HANY, J.; NAGEL, R. Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Muttermilch. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, n. 11, p. 341-345, 1995.

INUI, M.; ADACHI, T.; TAKENAKA, S.; INUI, H.; NAKAZAWA, M.; UEDA, M.; ET AL. Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka. *Toxicology*, v. 194, p. 43-50, 2003.

JANJUA, NR; KONGSHOJ, B.; ANDERSON, A-M.; WULF, HC. Sunscreen in human plasma and urine after repeated whole body topical application. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*. v. 22, p. 456-461, 2008.

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

KLAMMER, H.; SCHLECHT, C.; WUTTKE, W.; JARRY, H. Multi-organic risk assessment of estrogenic properties of octyl-methoxycinnamate in vivo A five day sub acute pharmacodynamic study with ovariectomized rats. *Toxicology*, v. 215, p.90-96, 2005.

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

MONTEIRO, M.S.S.B. Filtros solares em nanocosméticos: desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia. 2008. 170 p. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MOTA, A.C.V.; VOLPATO N.M.; FREITAS, Z.M.F.; SANTOS, E.P. Estudo de liberação *in vitro* do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila incluso em lipossoma

e  $\beta$ -ciclodextrina. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, V. 29, (3), 2008.

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

PERUGINI, P., et al. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-metoxicinnamate. *International Journal of Pharmaceutics*. V. 246, p. 34-45, 2002.

PETRAZZUOLI, M. Advances in sunscreens. *Current Problems in Dermatology*, v.12, n. 6, p. 287-290, 2000.

SARVEIYA, V.; RISK, S.; BENSON, A.E.B. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. *Journal of chromatography B*, v.803, p. 225-231, 2004.


SCALIA, S., CASOLARI, A., IACONINOTO, A., SIMEONI, S. Comparative studies of the influence of cyclodextrins on the stability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 30, p. 1181-1189, 2002.

SCHLUMPF, M.; COTTON, B.; CONSCIENCE, M.; HALLER, V.; STEINMANN, B.; LICHTENSTEIGER, W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. **Environ. Health Perspect.** v. 109, n. 3, p.239-244, 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.



## ANEXO I

CEP-HUCFF/FM
Projeto n.º 120/10
Folha n.º 15
Ass. Sec. 

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avaliação da penetração e biometria cutânea após aplicação do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila em nanocosmético

Venho, por meio deste, convidá-lo (a) a participar do projeto "Avaliação da penetração e biometria cutânea após aplicação do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila em nanocosmético". O objetivo desta pesquisa é avaliar o grau de penetração na pele e as características da pele após a aplicação de duas formulações na forma de gel creme (lipossoma e convencional) contendo 8% do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila (MCO). O MCO é um filtro solar anti UVB encontrado na maioria das formulações comerciais. Diversos trabalhos demonstram que este filtro pode ser absorvido pela pele e atingir a circulação sistêmica. Para evitar este efeito adverso que diminui a eficácia das formulações antissolares foi desenvolvida uma nova formulação onde o MCO encontra-se em um nanocosmético objetivando aumentar a sua concentração no estrato córneo, seu local de ação. Além disso, avaliaremos as características da pele antes e após a aplicação das formulações tais como grau de hidratação, oleosidade e pH empregando a biometria cutânea, uma análise não invasiva, com o objetivo de compará-las.

Os procedimentos do estudo não apresentam riscos para os voluntários já que o MCO é uma substância bem conhecida, segura quando aplicada sobre a pele íntegra e está presente na maioria dos protetores solares comerciais. As reações adversas ocorrem raramente e podem consistir de irritação e alergia. A concentração de MCO utilizada nas formulações em estudo (8%) está dentro da concentração máxima permitida pela ANVISA (BRASIL, 2006 RDC nº 47/2006). Os desconfortos que envolvem o estudo consistem em leve irritação transitória no local da aplicação das fitas utilizadas nos ensaios de *tape stripping*.


Antes de serem incluídos nos estudos os participantes farão uma avaliação médica com a Dra. Lúcia Maria Soares de Azevedo – Prof<sup>a</sup>. Associada da Faculdade de Medicina/UFRJ, CRM-5236934-1 na sala 05 B 11 no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ). A

avaliação será realizada uma semana antes dos experimentos e consistirá em análise da pele do voluntário e determinação de peso e altura.

CEP-HUCFF/FM
Projeto n.º 120/10
Folha n.º 16
Ass. Sec. <i>[assinatura]</i>

Tanto os ensaios de biometria cutânea quanto os ensaios de *tape stripping* serão realizados no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG) – UFRJ localizado na Farmácia Universitária, bloco L subssolo. As metodologias empregadas são não invasivas e indolores. A avaliação da extensão da penetração do filtro solar na pele será realizada empregando a técnica de *tape stripping* ou “remoção do estrato córneo” por fita adesiva. O experimento será realizado em uma sala climatizada com temperatura entre 20°C e 22°C, e umidade relativa na faixa de 50-60%, consistindo na aplicação da formulação nos antebraços do voluntário. Uma hora antes do experimento, os antebraços do voluntário serão lavados com água corrente e sabonete neutro. Serão demarcadas cinco áreas em cada antebraço, para estudo da mesma formulação em duplicata. A formulação será aplicada nas áreas demarcadas, com auxílio de uma haste com ponta de algodão (cotonetes®) de modo uniforme quanto à distribuição e quantidade (5-10 mg/cm<sup>2</sup>). Após cada tempo, o excesso do fármaco da área específica será removido limpando-a 3 vezes com algodão. A seguir, será realizada a coleta de estrato córneo com o auxílio de fita adesiva hipoalergênica Transpore®, marca 3M do Brasil. Em cada área serão aplicadas e retiradas 11 fitas adesivas consecutivas com área de 1 cm<sup>2</sup>. Dessa forma é possível coletar células do estrato córneo, juntamente com o fármaco que penetrou na pele nessa camada. Serão aplicadas duas formulações em cada voluntário, com um intervalo de 15 a 30 dias entre cada formulação, tempo necessário para eliminação completa do fármaco até a próxima aplicação.

No estudo de biometria cutânea será avaliado o efeito das formulações dermocosméticas desenvolvidas, através de métodos capazes de medir a hidratação, a oleosidade e o pH da pele. Para tais medidas faz-se o uso, respectivamente, dos equipamentos Corneometer CM 820 PC; Sebumeter SM 810 PC e Skin pH-Meter, em ambiente climatizado com temperatura variando entre 20°C e 25°C, e umidade relativa do ar variando entre 40% e 50%. A metodologia envolve a aplicação de cada formulação pelos voluntários em seu antebraço, duas vezes ao dia, durante trinta dias consecutivos. As avaliações de biometria serão realizadas antes do uso das formulações (tempo zero) e após os sete, quinze, vinte e trinta dias de uso das mesmas para efeito comparativo de resultados. Nos dias marcados os participantes virão ao laboratório e. Nos dias determinados para avaliação da biometria, os

CEP-HUCFF/FM
Projeto n.º 120/10
Folha n.º 17
Ass. Sec. 

voluntários serão acomodados em ambiente climatizado, conforme descrito acima, 20 a 30 minutos antes dos testes. Lavar a área de aplicação com água e sabão líquido neutro, e enxugar com toalha de papel macia. As medidas de pH, oleosidade e hidratação da pele do antebraço serão realizadas dentro de 5 a 10 minutos após a limpeza do antebraço. Essas medidas realizar-se-ão encostando-se o aparelho na pele.

Garantia de acesso: em todas as etapas do estudo você será acompanhado. A pesquisadora responsável Aline de Carvalho Varjão Mota, poderá ser encontrada no endereço: Centro de Ciências da Saúde, Farmácia Universitária, Bloco L, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro e nos telefones: (21) 2562-6625 em horário comercial ou por 24 horas no telefone (21) 8883-8797. Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) localizado no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ / Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco nº 255 – Cidade Universitária – RJ/RJ CEP: 21941-913- CNPJ: 33.663.683/0053-47, sala 01 D-46, 1º andar, Tel: (21) 2562-2480, email: [cep@hucff.ufrj.br](mailto:cep@hucff.ufrj.br). O investigador clínico Dra Lúcia Maria Soares de Azevedo estará disponível no telefone 2562-2580 para esclarecimentos em caso de reações adversas relacionadas ao estudo, tais como irritações cutâneas ou reações de hipersensibilidade na pele.

A sua liberdade de retirar o consentimento da participação é garantida em qualquer etapa do projeto, sem prejuízos a você. É de nosso total interesse tornar públicos os resultados da pesquisa assim que forem concluídos, por meio de publicação em revistas de impacto na área científica e acadêmica, mas sua identidade será preservada.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira por sua participação. Se houver qualquer despesa adicional, esta será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo acima citado cujas informações foram lidas para mim.

Eu discuti com a pesquisadora Aline de Carvalho Varjão Mota, sobre minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, os riscos e desconfortos, a garantia de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar, caso ocorra alguma reação adversa relacionada ao estudo. Concordo

voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesta Instituição.

\_\_\_\_\_  
Nome do sujeito da pesquisa

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

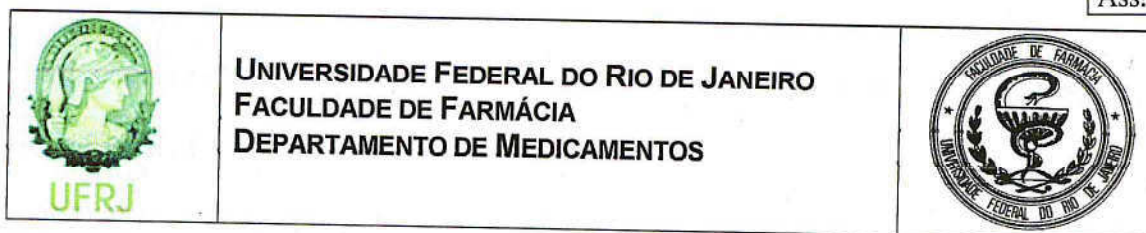
\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Nome do Pesquisador

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Para maiores informações consultar a Resolução 196, de 10 de outubro de 1996 –  
Capítulo IV – Consentimento Livre e Esclarecido



**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**Bloco L, Farmácia Universitária, CCS**  
**CIDADE UNIVERSITÁRIA, ILHA DO FUNDÃO - RIO DE JANEIRO**  
**BRASIL – CEP: 21941-590**

**ELISABETE PEREIRA DOS SANTOS, DSC**  
**PHONE: 55 21 2562-6625**  
**FAX: 55 21 2260 7381**  
**EMAIL: BETE@PHARMA.UFRJ.BR**

Rio de Janeiro, 16 de agosto de 2010.

**De:** Prof. Elisabete Pereira dos Santos – Coordenadora do Programa Farmácia  
Universitária.

**Ao:** Comitê de Ética em Pesquisa

Prezados (as) senhores (as),

Venho por meio desta encaminhar ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), o projeto intitulado: "Avaliação da penetração e biometria cutânea após aplicação do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila em nanocosmético". Este será realizado pela pesquisadora Aline de Carvalho Varjão Mota.

Informo que o referido projeto tem como finalidade servir de base para a elaboração de tese de doutorado.

No aguardo de suas devidas providências, me despeço reiterando nossos votos de grande estima e consideração.

*Elisabete P. Santos*

Professora Elisabete Pereira dos Santos  
Coordenadora do Programa Farmácia Universitária  
Fac. de Farmácia/UFRJ 0359670.

*Profª Elisabete Pereira dos Santos*  
Chefe de Farmácia Universitária  
UFRJ - Faculdade de Farmácia  
Farmacêutica CRF-RJ 2646