



Universidade Estadual Paulista

“Júlio De Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ALICE HADDAD DO PRADO

Carreadores lipídicos nanoestruturados como potencial estratégia para incorporação do *p*-metoxicinamato de octila: desenvolvimento, caracterização físico-química e ensaios biológicos *in vitro*

Araraquara – SP

2016

ALICE HADDAD DO PRADO

Carreadores lipídicos nanoestruturados como potencial estratégia para incorporação do *p*-metoxicinamato de octila: desenvolvimento, caracterização físico-química e ensaios biológicos *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara – SP

2016



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de ALICE HADDAD DO PRADO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aos 24 dias do mês de maio do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Auditório do Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da Qualidade de Cachaça da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da UNESP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. MARLUS CHORILLI - Orientador(a) do(a) Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, Prof. Dr. ANDRÉ ROLIM BABY do(a) Departamento de Farmácia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo da USP, Prof. Dr. JULIANA MALDONADO MARCHETTI do(a) Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de ALICE HADDAD DO PRADO, intitulada **CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS COMO POTENCIAL ESTRATÉGIA PARA INCORPORAÇÃO DO P-METOXICINAMATO DE OCTILA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão


Prof. Dr. MARLUS CHORILLI


Prof. Dr. ANDRÉ ROLIM BABY


Prof. Dr. JULIANA MALDONADO MARCHETTI

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P896c Prado, Alice Haddad do
Carreadores lipídicos nanoestruturados como potencial estratégia para incorporação do *p*-metoxicinamato de octila: desenvolvimento, caracterização físico-química e ensaios biológicos *in vitro* / Alice Haddad do Prado. – Araraquara, 2016.
71 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.

1. *p*-metoxicinamato de octila. 2. Carreadores lipídicos. 3. Nanotecnologia. 4. Protetor solar. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Título.

Dedicatória

*Dedico aos meus pais, irmãos,
amigos e professores.*

Alice Haddad do Prado

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu chefe e orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli pela oportunidade tanto na iniciação científica como no mestrado, pelo exemplo de pessoa e profissional, por todo o aprendizado, mas principalmente por entender e aceitar meu ritmo de trabalho. Por sempre me motivar, ensinar e respeitar os meus limites. Obrigada pela atenção e compreensão.

Agradeço também a Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini, a qual me incentivou a seguir o sonho de estudar farmácia e me realizar como pesquisadora. Mas mais que isso, agradeço por ser o meu suporte durante todos esses anos, meu porto seguro dentro e fora da faculdade. Obrigada por tudo que me ensinou e proporcionou e, além disso, obrigada pelo amor, carinho e cuidado de sempre!

À minha família, meus irmãos Ariane, Vitor e Luiza, mas principalmente à minha mãe Maria Silvia Haddad, por tudo! Por me apoiar em todas as minhas escolhas, por me ajudar todos os dias, pela paciência de uma vida e por contribuir em cada página desse trabalho. Essa conquista é nossa!

À Martina Borges, por construir parte desse trabalho e de quebra uma amizade e sintonia inexplicável. Você se tornou uma irmã para mim. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e estiveram presentes me dando força, momentos de lazer e divertimento. Obrigada Felipe Hilário, Diego Kashiura, Danilo Moreira, Roger Turatti, Henrique Balarini, Caio Nardin e todos da República Intrometeu. Às amigas que dividem sobretudo alegrias, mas que também estão comigo em qualquer dificuldade, mesmo longe. Obrigada Adriana Ichimura, Carolina Jacote, Raissa Carmona, Julia Brunelli, Fernanda Oliveira, Bárbara Kapp. Sem vocês a vida não tem sentido!

À Jéssica Bernegossi por me incentivar e ensinar, não somente como profissional, mas como amiga, sempre com muita alegria e dedicação. Você é especial. Obrigada por entrar e permanecer na minha vida. Te amo!

Às amigas que ganhei trabalhando no Congresso Farmacêutico da UNESP. Obrigada Jéssica de Sá, Camila Santana e Camila Maringolo pela parceria, pelos encontros e alegria compartilhada. Amo vocês!

Alice Haddad do Prado

Agradecimentos

A todos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica que de alguma forma contribuíram para o meu trabalho, em especial à Giovana Calixto, Roberta Rigon e Natália Gonçalves dos Santos. Principalmente aos que se tornaram mais que colegas, aos amigos Mariana Sato e Bruno Fonseca, obrigada pelos bons momentos, pelo carinho e amizade.

Aos amigos do laboratório CMAF que sempre me ajudaram seja para a realização desse trabalho quanto na vida. Principalmente à Marina Paiva Abuçafy e Eloísa Berbel Manaia. Vocês são especiais. Obrigada por tudo!

A todos do laboratório de Toxicologia, os quais foram a minha segunda família sempre me ajudando e me recebendo com alegria. Muito obrigada Michel Campos, Elias Padilha, Marco Nogueira, Helen Cimatti, Kelly Pestana, Caroline Candido, Juliana Assumpção, Evelin Martins, Jonata Oliveira, Taísa Franchin, Rodrigo Scalia, Maria Aparecida dos Santos e Marcão.

Agradeço, especialmente, ao Rafael Romano Domenegueti pelo zelo e ajuda para a realização desse trabalho. Obrigada pelo cuidado, carinho, amor e atenção.

Agradeço, ainda, a todos os professores, alunos e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR) – UNESP que vivenciaram comigo momentos únicos e especiais.

Por fim, agradeço imensamente à Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo pelo auxílio de famigerada importância para a realização deste mestrado (Processo FAPESP nº 2014/22426-2).

Alice Haddad do Prado

"O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo". Winston Churchill

Resumo

O p-metoxicinamato de octila (OMC) vem sendo empregado em protetores solares objetivando a prevenção do câncer de pele e envelhecimento precoce. Todavia, estudos têm detectado a presença deste filtro solar em amostras de sangue, urina e leite após sua administração cutânea. Para promover a retenção do OMC nas camadas mais externas da pele, bem como protegê-lo da fotodegradação, sua incorporação em carreador lipídico nanoestruturado (CLN) pode ser interessante, pois este sistema permite maior retenção cutânea do ativo e conseqüentemente menor permeação pela pele, além de maior proteção e encapsulação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de CLN como estratégia para incorporação do OMC. Os CLNs foram compostos por: miristato de miristila (MM) como lipídeo sólido, triglicerídeo de ácido cáprico e caprílico (TACC) como lipídeo líquido e tween 80 (T80) como tensoativo (F1), associados ou não à fosfatidilcolina de soja (FS) – F2 ou óleo de rícino (OR) – F3. O OMC foi adicionado na fase lipídica na concentração de 1,0%, obtendo-se as formulações F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC. A caracterização dos sistemas foi realizada a partir de análises de diâmetro médio, polidispersidade, potencial zeta, calorimetria diferencial exploratória, microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura. Foi realizada a eficiência de encapsulação das formulações, além de ensaios de determinação do fator de proteção solar (FPS), liberação, permeação, retenção cutânea e citotoxicidade *in vitro*. Também, foi desenvolvido um método analítico para a quantificação do OMC por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) com fase móvel constituída por 80:20 de acetonitrila e água ácida. As formulações desenvolvidas apresentaram valores de diâmetro hidrodinâmico médio entre 90 e 250 nm, índice de polidispersidade de 0,09 até 0,26 e potencial zeta de aproximadamente -20 mV. As análises de microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura sugeriram que as formulações apresentam formato esférico. Os resultados de DSC mostraram que os sistemas apresentaram estrutura cristalina, sofrendo alteração com a incorporação de OMC, além do aumento no ponto de fusão. Os resultados indicaram valores de FPS de aproximadamente 40 para as formulações. Os ensaios de liberação *in vitro* demonstraram que o OMC foi liberado das formulações seguindo o modelo matemático proposto por Peppas. A formulação F2.OMC foi a que promoveu maior liberação (55%) de OMC dos carreadores e maior permeação (37%) e retenção cutânea (0,17%). A formulação F1.OMC demonstrou menor liberação (30%) e retenção cutânea (0,05%) apresentando maior eficiência de encapsulação (60%), enquanto a formulação F3.OMC foi responsável pela menor permeação (18%). Os ensaios de citotoxicidade *in vitro*, empregando células HaCaT saudáveis, evidenciaram que as formulações não se apresentaram tóxicas na faixa de IC₅₀ entre 0,08 e 0,004%. Os resultados sugerem que a formulação F3.OMC apresenta potencial aplicação para incorporação de OMC, objetivando sua aplicação em formulações fotoprotetoras.

Palavras-chave: metoxicinamato de octila, nanocarreadores lipídicos, filtro solar, nanotecnologia, permeação cutânea, administração tópica.

Abstract

The octyl methoxycinnamate has been used in sunscreens aiming at the prevention of skin cancer and premature aging. However, studies have detected the presence of this UV filter in samples of blood, urine and milk after topical administration. To promote the retention of the OMC in the outer layers of the skin and protect it from photobleaching, their incorporation into nanostructured lipid carrier (NLC) can be interesting because this system allows greater skin retention of active and therefore less permeation through the skin, besides greater protection and encapsulation. The objective of this study was to evaluate the potential of NLC as a strategy for incorporating the OMC. The NLCs was composed of: myristate miristila as solid lipid, acid triglyceride capric and caprylic as liquid lipid and tween 80 as surfactant (F1), associated or not with soy phosphatidylcholine (F2) or castor oil (F3). OMC was added to the lipid phase in a concentration of 1.0% to yield the F1.OMC, F2.OMC and F3.OMC formulations. The characterization of the systems was conducted from analysis of average diameter, polydispersity, zeta potential, differential scanning calorimetry (DSC), atomic force microscopy and scanning electron microscopy. The encapsulation efficiency of the formulations was carried out, as in vitro assays like sun protection factor (SPF), release, skin permeation, skin retention and cytotoxicity. Also, an analytical method was developed to quantify the OMC using liquid chromatography ultra-efficiency with mobile phase of 80:20 acetonitrile and acidic water. The formulations showed hydrodynamic mean diameter values between 90 and 250 nm, polydispersity of 0.09 to 0.26 and zeta potential of about -20 mV. The analysis of atomic force microscopy and scanning electron microscopy suggested that the formulations have spherical shape. The DSC results showed that the systems suffering crystalline structure changes with the incorporation of OMC, besides the increase in melting point. The SPF results indicate values about 40 for all formulations. In vitro release tests showed that the OMC was released from formulations following the mathematical model proposed by Peppas. The formulation F2.OMC was that promoted the greatest release of OMC (55%) higher skin permeation (37%) and retention (0.17%). The F1.OMC showed lower release (30%), skin retention (0.05%) and higher encapsulation efficiency (60%), while the F3.OMC formulation was responsible for the lower skin permeation (18%). In vitro cytotoxicity assays employing healthy HaCaT cells, demonstrated that the formulations did not show toxic IC_{50} in the range between 0.08 and 0.004%. The results suggest that F3.OMC formulation has potential application for incorporation of OMC, aiming their use in sunscreens formulations.

Keywords: Octyl methoxycinnamate. Lipid nanocarriers. Sunscreen. Nanotechnology. Skin permeation. Topical administration.

Alice Haddad do Prado

AFM – microscopia de força atômica
CLN – carreadores lipídicos nanoestruturados
DNA – ácido desoxirribonucleico
DSC – calorimetria diferencial exploratória
FPS – fator de proteção solar
FS – fosfatidilcolina de soja
HaCaT – queratinócitos humanos imortalizados
IC₅₀ – concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%
IUV – índice de radiação ultravioleta
MEV – microscopia eletrônica de varredura
MM – miristato de miristila
NLS – nanopartículas lipídicas sólidas
OMC – metoxicinamato de octila
OR – óleo de rícino
RNA – ácido ribonucleico
SC – estrato córneo
T80 – tween 80
TACC – triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico
UPLC – cromatografia líquida de ultra eficiência
UV – ultravioleta

Lista de Tabelas

Tabela 1. Categorias de intensidade da radiação ultravioleta.	19
Tabela 2. Características físico-químicas do miristato de miristila.	28
Tabela 3. Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.	36
Tabela 4. Variação do diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta em função da concentração de tensoativo Tween [®] 80 (\pm DP).	41
Tabela 5. Formulações desenvolvidas e concentração dos componentes utilizados.	42
Tabela 6. Polidispersidade das formulações em relação ao tempo em dias (\pm DP).	44
Tabela 7. Potencial zeta das formulações em relação ao tempo (\pm DP).	45
Tabela 9. Resultados de FPS das formulações obtidos através da técnica de Mansur (\pm DP).	52
Tabela 10. Precisão intracorrída e intercorrídas em isopropanol.	55
Tabela 11. Precisão intra e inter-corrídas em solução receptora.	56
Tabela 12. Robustez do método com pequenas alterações nas condições cromatográficas.	57
Tabela 8. Resultados da eficiência de encapsulação das formulações em porcentagem.	57
Tabela 13. Coeficiente de liberação in vitro do OMC obtido pelos diferentes modelos matemáticos para as formulações F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC.	60
Tabela 14. Retenção cutânea no estrato córneo e retenção dérmica das formulações (\pm DP).	62
Tabela 15. Valores de IC ₅₀ para células HaCat tratadas com as formulações.	62

Lista de Figuras

Figura 1. Espectro de radiação eletromagnética da luz solar.....	18
Figura 2. Ilustração da estrutura da pele (EMAZE, 2016).....	20
Figura 3. Mecanismo de ação de filtros UV orgânicos e inorgânicos.	23
Figura 4. Fórmula estrutural plana do p-metoxicinamato de octila.	23
Figura 5. Espectro de absorção do OMC em UV/Vis na concentração de 10ug/mL em isopropanol.	24
Figura 6. Organização da matriz das partículas.	26
Figura 7. Fórmula estrutural do miristato de miristila.	28
Figura 8. Fórmula estrutural dos ácidos cáprico e caprílico, respectivamente.	29
Figura 9. Fórmula estrutural do tensoativo Tween® 80.	29
Figura 10. Fórmula estrutural da fosfatidilcolina de soja.	29
Figura 11. Fórmula estrutural do óleo de rícino.	30
Figura 12. Ilustração da célula de Franz (PUGLIA et al., 2012).	38
Figura 13. Aspecto macroscópico das formulações mostrando a variação na concentração do tensoativo Tween® 80 de 1,0% a 5,0%, da esquerda para a direita.	41
Figura 14. Aspecto macroscópico das três formulações (F1, F2 e F3) desenvolvidas contendo carreadores lipídicos estruturados (NLCs) livres.....	42
Figura 15. Aspecto macroscópico das três formulações (F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC) contendo p-metoxicinamato de octila (OMC).	42
Figura 16. Média e desvio padrão do diâmetro médio (nm) dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) livres e carregados com OMC no período de 60 dias.....	43
Figura 17. Curvas de DSC das formulações F1, F2 e F3 e suas respectivas entalpias.	46
Figura 18. Curvas de DSC das formulações F1, F2 e F3 livres e acrescida de OMC (F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC).....	47
Figura 19. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F1.	48
Figura 20. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F2 diluída.	48
Figura 21. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F2.OMC diluída.	49
Figura 22. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F1 após diluição e dipcoating.....	49
Figura 23. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F2 após diluição e dipcoating.....	50
Figura 24. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F1.OMC após diluição e dipcoating.....	50
Figura 25. Fotomicrografias das formulações F1 (A) e F3 (B).	51

Lista de Figuras

Figura 26. Fotomicrografias das formulações F1.OMC (C), F2.OMC (D) e F3.OMC (E).....	51
Figura 27. Fotomicrografias das formulações F2 (F) e F2.OMC (G).....	52
Figura 28. Cromatograma do isopropanol utilizado como branco na quantificação do OMC.....	54
Figura 29. Cromatograma do OMC 100 µg/ml em isopropanol.....	54
Figura 30. Curvas analíticas do OMC em isopropanol e em solução receptora, respectivamente. ..	55
Figura 31. Perfil de liberação in vitro (%) do p-metoxicinamato de octila (OMC) incorporado em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) em três diferentes formulações (F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC) pelo período de 12 horas.....	59
Figura 32. Permeação cutânea in vitro das formulações F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC durante o tempo de 12 horas.	61
Figura 33. Ensaio de viabilidade em células HaCaT após o tratamento com diferentes concentrações de OMC.	63

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 Luz solar.....	18
2.2 Pele.....	19
2.3 Proteção solar.....	21
2.4 Sistemas nanoestruturados	25
2.5 Nanotecnologia em filtros solares.....	27
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAIS & MÉTODOS	32
4.1 Materiais	32
4.2 Equipamentos.....	32
4.3 Desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados	33
4.4 Caracterização físico-química.....	33
4.4.1 Determinação do diâmetro médio	33
4.4.2 Análise do potencial Zeta.....	34
4.4.3 Calorimetria diferencial exploratória.....	34
4.4.4 Análise microscópica	35
4.4.4.1 Microscopia de força atômica.....	35
4.4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	35
4.5 Fator de proteção solar.....	35
4.6 Quantificação do OMC por UPLC	36
4.6.1 Condições cromatográficas	36
4.6.2 Validação do método analítico.....	37
4.6.2.1 Linearidade	37
4.6.2.2 Precisão e exatidão.....	37
4.6.2.3 Limites de detecção e quantificação	37
4.6.2.4 Robustez.....	37
4.7 Eficiência de encapsulação	37
4.8 Ensaio <i>in vitro</i>	38
4.8.1 Liberação <i>in vitro</i>	38

4.8.2 Permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	39
4.8.3 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	40
5. RESULTADOS & DISCUSSÃO	41
5.1 Desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados	41
5.2 Caracterização físico-química.....	43
5.2.1 Determinação do diâmetro médio	43
5.2.2 Análise do potencial zeta	45
5.2.3 Calorimetria diferencial exploratória.....	46
5.2.4 Análise microscópica	47
5.2.4.1 Microscopia de força atômica.....	48
5.2.4.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	51
5.3 Fator de proteção solar.....	52
5.4 Quantificação de OMC por UPLC.....	53
5.4.1 Condições cromatográficas	54
5.4.2 Validação do método analítico.....	55
5.4.2.1 Linearidade	55
5.4.2.2 Precisão e exatidão.....	55
5.4.2.3 Limites de detecção e quantificação	56
5.4.2.4 Robustez.....	56
5.5 Eficiência de encapsulação	57
5.6 Ensaios <i>in vitro</i>	58
5.6.1 Liberação <i>in vitro</i>	58
5.6.2 Permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	60
5.6.3 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	62
6. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

A exposição da pele humana à luz solar, em um curto período de tempo, tem efeitos terapêuticos; porém, devido à destruição da camada de ozônio nos últimos anos, a intensidade da radiação ultravioleta (UV), que atinge a superfície da terra, tem aumentado. Diversos estudos demonstraram a influência da radiação solar sobre a pele constatando que os raios UVA e UVB são os principais responsáveis por patologias como queimaduras solares, degeneração cutânea, fotossensibilidade, elastose actínica e câncer de pele (CHISVERT *et al.*, 2007; GONZALEZ *et al.*, 2008; WHARTON *et al.*, 2011).

A pele é o órgão que sofre maior exposição solar devido a sua ampla superfície de contato. Por essa razão, é também a mais afetada quando se trata de efeitos prejudiciais. Existem vários mecanismos endógenos de proteção para ajudar a minimizar esses efeitos, entre eles, o estrato córneo, camada mais externa da epiderme. Porém, o uso de filtros solares tem sido fortemente aconselhado, tanto pelas organizações de saúde como por estudos científicos (BRULS *et al.*, 1984; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Filtros solares UVA e UVB são utilizados como substâncias ativas em formulações fotoprotetoras. Para a efetiva proteção solar, prevenção de câncer de pele e outros males, essas substâncias devem ser seguras. No entanto, alguns filtros solares podem penetrar a pele, causando efeitos como a formação de radicais livres, irritação e envelhecimento da pele, além de maior risco de câncer (FERREIRA *et al.*, 2013). O *p*-metoxicinamato de octila (OMC), por exemplo, pode ultrapassar barreiras da pele atingindo a circulação sistêmica e acometendo a regulação hormonal (JANJUA *et al.*, 2004; SCHLUMPF *et al.*, 2008). Portanto, é extremamente importante que os filtros solares permaneçam no local de ação – superfície da pele – apresentando alta retenção no estrato córneo e, dessa forma, evitando a permeação cutânea.

Sistemas baseados em nanotecnologia, como as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), tem atraído bastante atenção para incorporação de substâncias de uso tópico, uma vez que apresentam maior tolerabilidade e biodisponibilidade quando comparadas com as formulações convencionais. No entanto, devido ao alto grau de cristalização dos lipídeos sólidos, a substância ativa tende a ser expulsa das nanopartículas, causando uma baixa capacidade de encapsulação e prejudicando o armazenamento. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram então desenvolvidos com o propósito de solucionar essa questão ao adicionar um lipídeo líquido em sua composição, permitindo, dessa forma, maior acomodação do ativo e reduzindo sua expulsão durante a estocagem (LIN *et al.*, 2007). Além disso, esse sistema propicia maior retenção do ativo nas camadas superiores da pele, promove a liberação prolongada com redução da absorção sistêmica, além de possuir propriedades de proteção do ativo contra raios UV e degradação (PARDEIKE *et al.*, 2009).

Introdução

Pode-se observar, desta forma, que a incorporação de OMC em CLN pode ser vantajosa, o que justifica a realização deste estudo, de forma a obter sistemas que permitam proteção do OMC contra a degradação, propriedades de fotoproteção, maior incorporação do filtro na formulação e sua retenção nas camadas superiores da pele, de forma a localizá-lo no seu sítio de ação.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Luz solar

A exposição da pele humana à luz solar, por pequenos períodos, é essencial para a produção de vitamina D. No Brasil, cerca de 15 minutos de exposição já são suficientes para regular a produção dessa vitamina, necessária para o metabolismo da função osteoblástica (produção óssea), e secreção de PTH (hormônio paratireóide), além de evitar o raquitismo em bebês e crianças (CORREA, 2003). Em contrapartida, a exposição excessiva da pele humana à radiação ultravioleta (UV) é um importante fator de risco para queimaduras e desenvolvimento de câncer de pele dos tipos melanoma e não-melanoma (SHI *et al.*, 2012).

A luz solar é composta por um espectro contínuo de radiação eletromagnética (Figura 1) que está dividido em três regiões de comprimentos de onda principais: ultravioleta, visível e infravermelho. A radiação ultravioleta (UV), potencialmente perigosa para a pele humana, é definida pelos comprimentos de onda de 200-400 nm e convenientemente dividida nos grupos: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (200-280 nm). Os raios UVC são bloqueados pela camada de ozônio, enquanto que os raios UVA e UVB atingem a superfície da Terra em quantidades suficientes para causar consequências para a pele e os olhos (MATSUMURA e ANANTHASWAMY, 2004).

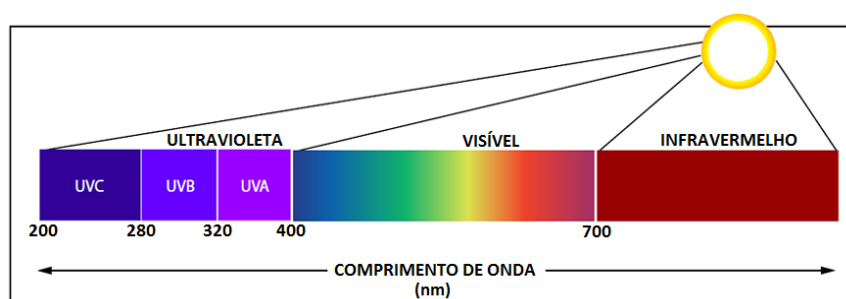


Figura 1. Espectro de radiação eletromagnética da luz solar.

A radiação UV é absorvida por diferentes cromóforos situados em estruturas da pele tais como melanina, DNA, RNA, proteínas e lipídeos, sendo responsáveis por reações fotoquímicas e interações secundárias que envolvem espécies reativas de oxigênio, as quais apresentam efeitos nocivos (GONZALEZ *et al.*, 2008; WHARTON *et al.*, 2011). Essa radiação pode causar ainda eritemas, doenças oculares, alterações no DNA, envelhecimento precoce da pele e imunossupressão. Os raios solares UVB são limitados a camadas superiores da pele e principalmente relacionados a eritemas e queimaduras. Já os raios UVA atingem camadas mais profundas da pele e são capazes de danificar o DNA, geralmente pela produção de espécies reativas

de oxigênio (KOCKLER *et al.*, 2012; DEBUYS *et al.*, 2000).

A irradiação UV aguda induz lesões no DNA que podem levar a mutações se não forem reparadas. Para isso, as células são equipadas de mecanismos de reparação de DNA. Já a exposição crônica promove a deterioração progressiva da estrutura e função cutânea, através de recorrentes lesões agudas e inflamatórias que podem levar ao desenvolvimento de câncer de pele (MATSUMURA e ANANTHASWAMY, 2004).

A Organização Mundial da Saúde estabeleceu recomendações importantes para conscientizar e alertar a população ao que diz respeito à exposição solar diária mediante o estabelecimento do índice de radiação UV (IUV), que é calculado a partir dos níveis de ozônio na atmosfera. O IUV é classificado como baixo, moderado, alto, muito alto ou extremo e representa o valor de exposição máximo diário referente ao horário de maior incidência de radiação UV, ou seja, ao meio dia (CORREA, 2003; OMS, 2013). A Tabela 1 apresenta as categorias dos índices de radiação UV e suas respectivas recomendações.

Tabela 1. Categorias de intensidade da radiação ultravioleta.

Categoria	Índice de radiação UV (IUV)	Recomendações
Baixo	2	Protetor solar
Moderado	3 a 5	Protetor solar, óculos de sol e evitar exposição ao sol do meio dia até 16h.
Alto	6 a 7	Protetor solar, óculos de sol com filtro UV, camiseta e chapéu. Procurar sombra entre meio dia e 16h.
Muito alto	8 a 10	Protetor solar, óculos de sol com filtro UV, camiseta, chapéu e guarda-sol. Evitar exposição ao sol entre meio dia e 16h.
Extremo	11	Evitar exposição ao sol.

2.2 Pele

Nas últimas décadas, tem se observado um grande aumento na incidência de câncer de pele, o qual está intimamente relacionado com a excessiva exposição à luz solar. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) o câncer de pele é o mais comum de todos os tipos de câncer e representa mais da metade dos diagnósticos da doença. Existem basicamente dois tipos de câncer de pele: o melanoma, representando o mais raro, e o não-melanoma, que é o mais frequente e dificilmente responsável por causar mortes. O câncer de pele não-melanoma é o mais incidente no

Brasil; quanto ao melanoma, sua letalidade é elevada, porém sua incidência é baixa (INCA, 2016; SCHERER; KUMAR, 2010).

A pele é a primeira proteção do corpo humano contra a radiação solar e é constituída por epiderme, derme e hipoderme, conforme ilustrado na Figura 2. A epiderme, camada mais externa da pele, apresenta baixa espessura que varia entre 0,02 mm até 5 mm e contém queratinócitos, responsáveis pela produção de queratina, que estão organizados em quatro regiões principais: estrato córneo, camada granular, camada espinhosa e camada basal. O estrato córneo (SC) auxilia na reflexão de 5 a 10% da radiação solar. É composto por células ricas em queratina que formam uma fina barreira evitando a perda de água e penetração de produtos provenientes do meio, porém, embora seja considerada uma barreira eficiente, radiações UV podem enfraquecê-la aumentando a penetração química (PUGLIA *et al.*, 2014; YAMAMOTO *et al.*, 2008).

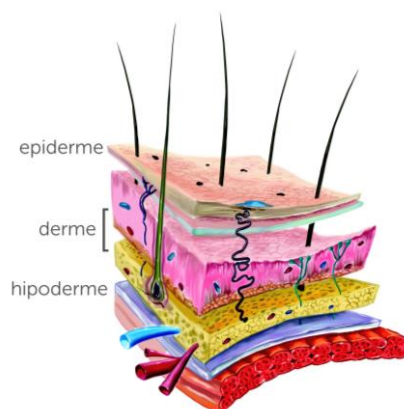


Figura 2. Ilustração da estrutura da pele (EMAZE, 2016).

A derme (1-2 mm) tem como funções a nutrição e sustentação da epiderme (AZZINI, 1999; PEYREFITTE *et al.*, 1998). É constituída por: células fixas na matriz extracelular (fibroblastos), as quais sintetizam macromoléculas e células migratórias que participam da defesa do organismo. Nessa região atravessam diversos vasos e nervos, e estão situadas glândulas sudoríparas e sebáceas, pêlos e unhas. A matriz extracelular é composta por fibras de colágeno e elastina envoltas por um material amorfo formado por água, sais minerais e macromoléculas, que são representadas pelos glicosanimoglicanos e glicoproteínas de estrutura (MORAIS, 2006; SHAHZAD *et al.*, 2015; VIGLIOGLIA, 1989).

A hipoderme, camada mais profunda da pele, é formada por tecido adiposo (adipócitos) e responsável por armazenar nutrientes e energia para o organismo, modelar a silhueta corporal além de funcionar como proteção mecânica, suavizando traumas, e isolante térmico, conservando a temperatura corporal. Nessa camada transcorrem vasos e nervos cutâneos de maior volume, contendo também fibras elásticas, proteoglicanos e colágeno. A reserva energética dos adipócitos é

feita pelo armazenamento de lipídios sob forma de triglicerídeos e ácidos graxos em caso de necessidade (DI SALVO, 1996; LEONARDI, 2004; MORAIS, 2006; PEYREFITTE *et al.*, 1998).

2.3 Proteção solar

A fotoproteção foi adotada após a percepção dos males causados pela exposição a luz solar. A autoimagem se torna cada vez mais importante na sociedade moderna, que tem reforçado o interesse na luta contra os efeitos do envelhecimento, particularmente fotoenvelhecimento. Além disso, diversas pesquisas na área de oncologia cutânea destacou a radiação UV como um dos principais fatores etiológicos no desenvolvimento de câncer de pele (DUMMER; MAIER, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2008). Estudos demonstraram os benefícios do uso de protetores solares. A sua utilização diária pode prevenir o desenvolvimento de ceratoses actínicas, carcinoma espinocelular e melanoma. Além disso, há evidências que sugerem que os protetores solares podem diminuir o envelhecimento prematuro e impedir as exacerbações da fotodermatoses (MANCEBO *et al.*, 2014).

Antigamente, os gregos utilizavam óleo de oliva na tentativa de proteger o corpo dos raios provindos do sol; porém, este agente não apresentava bons resultados. Em 1928, nos EUA, foi então criado o primeiro filtro solar contendo benzil-salicilato e benzil-cinamato incorporados em uma emulsão, sendo pouco utilizado na época. Mais tarde, na Segunda Guerra Mundial, uma série de queimaduras solares foram causadas pela exposição dos soldados durante tempo excessivo no sol. Por esse motivo, foi desenvolvido por Benjamin Greene um produto denominado petrolado veterinário vermelho e conhecido como “redvet pet” – substância vermelha e viscosa – a partir de um produto decorrente do petróleo. Já em 1943, uma substância chamada ácido para-aminobenzóico (PABA) foi patenteada representando o primeiro filtro solar. Porém, somente na década de 1970 os protetores solares foram realmente popularizados e diferentes filtros solares começaram a ser incluídos em cremes e loções (BAILLO; LIMA, 2012; MONTEIRO, 2010; SCHALKA; REIS, 2011).

A RDC nº 30 de 01 de junho de 2012 define protetor solar como qualquer preparação cosmética destinada a aplicação na pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação (ANVISA, 2012). Os protetores solares são considerados como cosméticos no Brasil, diferentemente do que acontece nos EUA onde são incluídos na categoria “OTC” (*over the counter*), denominação dada pelo órgão Food and Drug Administration (FDA) aos medicamentos de venda livre. Isso ocorre pelo fato de que filtros solares são utilizados na prevenção de efeitos agudos, como eritema, e crônicos, como câncer de pele, causados pela radiação solar (Brasil, 2002; FDA, 1999).

Um filtro solar ideal deve absorver a radiação UV em um amplo espectro e, fisicamente, cobrir e aderir bem à pele, bem como resistir à remoção pela água. Além disso, para ser eficaz, deve permanecer na camada mais externas da pele com permeação mínima para a circulação sistêmica (JIMÉNEZ *et al.*, 2004). Protetores solares fornecem uma proteção temporária contra a radiação UV. Os tipos de filtros UV utilizados como ingrediente ativo em formulações fotoprotetoras são denominados com base na sua composição química e mecanismo de ação e conhecidos como filtros orgânicos, ou químicos e filtros inorgânicos, ou físicos. Ambos são amplamente utilizados a fim de evitar queimaduras solares, envelhecimento e câncer de pele (DRAELOS, 2006; SHI *et al.*, 2012).

Os filtros orgânicos são compostos com estruturas simples ou aromáticas que podem estar conjugados com carbono, ligações duplas de carbono e ou grupos de carbonila, e apresentam alta capacidade de absorver a radiação UV em comprimentos de onda específicos. Os filtros inorgânicos são minerais e têm sua ação pela absorção, reflexão e/ou dispersão dessa radiação. Há vantagens e desvantagens associadas a ambos os tipos e é comum ver os dois tipos de filtros presentes em formulações disponíveis comercialmente (CHISVERT *et al.*, 2007; GONZALEZ *et al.*, 2008). Na Figura 3, é apresentada uma ilustração do mecanismo de ação dos filtros solares, em que se observa os filtros UV orgânicos absorvendo a energia da radiação UV, o que causa a excitação dos elétrons, sendo a energia liberada na forma de calor ou de luz. A transição de volta ao estado fundamental tem o potencial de causar modificações químicas, resultando em filtros menos eficazes. É demonstrado, ainda, os filtros UV inorgânicos absorvendo, dispersando ou refletindo a luz UV. Estas substâncias são mais estáveis à degradação pela exposição aos raios UV em comparação com os filtros orgânicos (MANCEBO *et al.*, 2014).

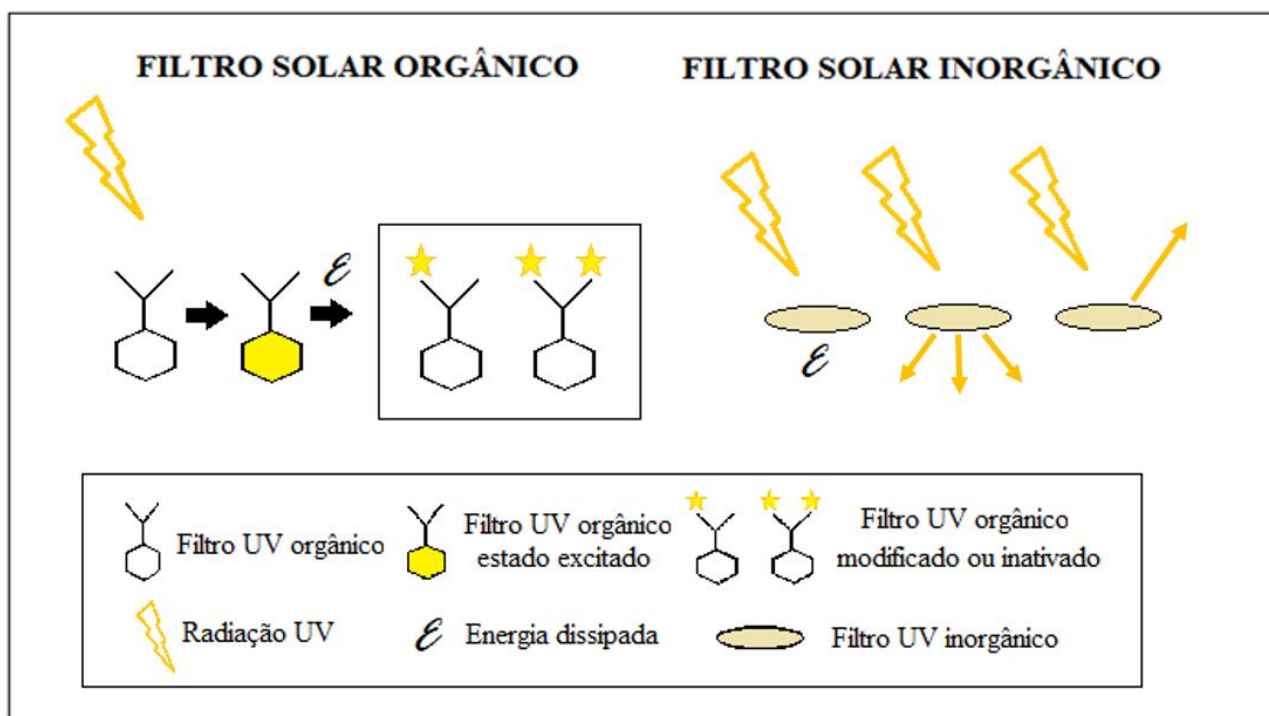


Figura 3. Mecanismo de ação de filtros UV orgânicos e inorgânicos.

O *p*-metoxicinamato de octila (OMC – Figura 4) - cinamato mais utilizado globalmente - é um filtro UVB orgânico desenvolvido na década de 1950, derivado de ácido cinâmico com um grupamento metoxi na posição para e esterificado com 2-etil-hexanol. Seu nome químico é 2-etil-hexil-3-(4-metoxifenil)-2-propeonato de etilo. Ele está presente em vários produtos cosméticos e, em virtude de sua característica de lipossolubilidade, é incluído principalmente nos produtos que necessitam de resistência à água. No Brasil, Japão e Europa sua máxima concentração permitida é de 10% e nos Estados Unidos é de 7,5% (CHISVERT *et al.*, 2001; JIMÉNEZ *et al.*, 2004; ZAMBON, 2011).

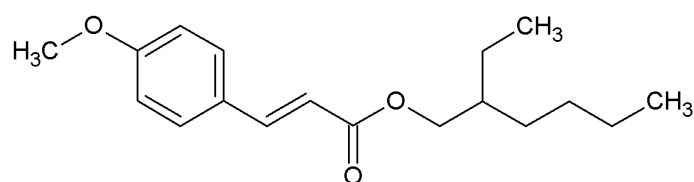


Figura 4. Fórmula estrutural plana do *p*-metoxicinamato de octila.

O OMC é um líquido oleoso, transparente, ligeiramente amarelo, inodoro, insolúvel em água (solubilidade em água, 0,1g/100 mL a 27 ° C) e solúvel em etanol, propilenoglicol e óleo mineral. O seu peso molecular é 290,4 e ponto de ebulição está entre 185 e 195 °C. A sua densidade é de 1,01 g/cm³. O coeficiente de partição octanol-água é 5,96, indicando que tem elevada solubilidade lipídica (MONTEIRO *et al.*, 2012). O OMC apresenta absorção máxima no comprimento de onda

de 310 nm, conforme apresentado na Figura 5. Porém, é relatada sua degradação pela luz solar e consequente transformação no isômero CIS, cujo pico de absorção é mais baixo (265 nm), o que diminui sua eficácia. Portanto, é geralmente associado a filtros solares com espectro mais amplo, quando se deseja maior proteção (CABRAL; PEREIRA; PARTATA, 2011; KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). Além disso, a escolha de um veículo inadequado ou a incorreta incorporação do OMC em uma formulação pode causar essa degradação sob luz solar, o que resulta em produtos com toxicidade desconhecida e/ou que penetrem a pele, expondo o organismo a possíveis efeitos prejudiciais (PUGLIA *et al.*, 2012).

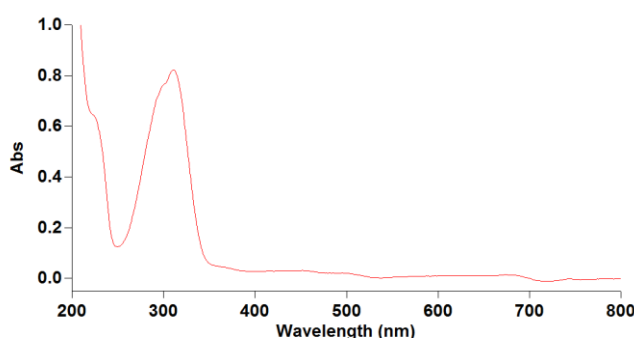


Figura 5. Espectro de absorção do OMC em UV/Vis na concentração de 10 μ g/mL em isopropanol.

Os filtros solares, após a exposição à luz UV, passam por processos de fotólise e reações de isomerização que podem produzir espécies reativas e/ou que tenham menor capacidade de absorver a radiação UV do que o filtro solar original, comprometendo assim a função do protetor (VILELA *et al.*, 2012). Um protetor solar que perde a capacidade de proteção contra a radiação UV durante a exposição ao sol proporcionaria um risco para o usuário podendo prejudicar a pele ao invés de protegê-la (HUONG *et al.*, 2007). Dessa forma, é importante conhecer o comportamento dos filtros solares segundo a sua penetração, alterações na pele ou organismo com ou sem exposição à radiação UV.

Um dos grandes problemas atualmente enfrentados, não somente pelo OMC, mas também por outros filtros orgânicos, é a questão da segurança de tais substâncias. Ao ser aplicado em uma grande extensão da pele, um filtro solar pode sofrer penetração e bioacumulação em quantidades significativas para causar efeitos adversos como desregulação endócrina, toxicidade pela geração de radicais livres e até efeitos mutagênicos e carcinogênicos (CHISVERT *et al.*, 2012; VILELA *et al.*, 2012). Alguns estudos têm detectado OMC em amostras de sangue, urina e leite após sua aplicação tópica, o que indica que os seres humanos são sistemicamente expostos a este composto (JANJUA *et al.*, 2004; SCHLUMPF *et al.*, 2008). Como exemplo, Axelstad *et al.* (2010) realizaram um estudo com a aplicação de OMC em ratas durante a gestação e lactação e observaram a desregulação endócrina nos filhotes com diminuição dos hormônios tiroxina (T4) e testosterona, o que indica que

houve absorção sistêmica deste filtro. Por sua vez, Ozáez *et al.* (2013) realizaram um estudo sobre o efeito da exposição em insetos onde o OMC estimulou a transcrição do gene do receptor de ecdisona *in vivo* após a exposição por 24 horas, proporcionando um forte apoio para um possível efeito perturbador sobre a via hormonal em animais invertebrados.

Sabe-se que o desempenho de uma formulação de filtro solar depende não só das propriedades físico-químicas dos filtros, mas também do veículo utilizado. A maioria das formulações fotoprotetoras baseiam-se em emulsões, óleos e géis que, apesar de suas vantagens, também apresentam limitações importantes, como a capacidade de lavagem da água, instabilidade e absorção percutânea dos filtros solares (PUGLIA *et al.*, 2014). Assim, com o objetivo de aumentar a retenção do filtro solar na pele, bem como protegê-lo da fotodegradação, diversos estudos estão sendo desenvolvidos para obtenção de carreadores mais adequados para sua incorporação, como os sistemas nanoestruturados (SHI *et al.*, 2012).

2.4 Sistemas nanoestruturados

A nanotecnologia é uma ciência dedicada à criação, modificação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas na gama de tamanho de nanômetro. Ela explora as características físicas, químicas e biológicas de materiais que melhorem ou se diferenciem radicalmente dos materiais a granel. Esses nanomateriais podem apresentar diferentes tamanhos, formas e composição química (BAILO; LIMA, 2012; DUNCAN; GASPAR, 2011; SANTANA *et al.*, 2008).

Dentre os sistemas nanoestruturados, um grande enfoque tem sido atribuído às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), desenvolvidas na década de 1990 como um sistema alternativo e diferente de emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas, por utilizar no lugar do lipídeo líquido de uma emulsão, por exemplo, um ou mais lipídeos sólidos, formando uma matriz de lipídeo sólido em temperatura ambiente ou corporal. Segundo Wissing e Müller (2002) o uso de NLS como sistema de transporte oferece duas vantagens principais: podem atuar propriamente como uma proteção física e, também, proporcionar um sistema de liberação prolongada, permanecendo, portanto, por mais tempo na superfície da pele.

Porém, as estruturas cristalinas formadas a partir das NLS se apresentavam tão perfeitas que limitavam o espaço para incorporação dos princípios ativos, além de estarem mais sujeitas a expulsão do fármaco durante a estocagem, pois o lipídeo sólido pode se transformar em outras formas cristalinas, deixando menor espaço para a acomodação de moléculas. Dessa forma, surgiram algumas limitações das NLS como menor incorporação do ativo e menor estabilidade físico-química em longo prazo (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Após a criação das NLS, pesquisas foram realizadas no sentido de incluir pelo menos um lipídeo líquido na composição das NLS, causando imperfeições na rede cristalina e dando origem

aos chamados carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), também conhecidos como a segunda geração das NLS (PARDEIKE *et al.*, 2009). As imperfeições provocadas propiciam aos CLN vantagens em relação às NLS, decorrentes principalmente do rearranjo dos componentes da formulação. Quando se utiliza uma mistura de lipídeos líquidos e sólidos, as moléculas podem ser diferentemente estruturadas não havendo formação de um cristal perfeito e, conseqüentemente, proporcionando maiores espaços para incorporação de fármacos na forma molecular ou como *clusters* (aglomerados) amorfos, conforme demonstrado na Figura 6 (MÜLLER *et al.*, 2007; BROWN; WILLIAMS; KIRWAN, 2011).

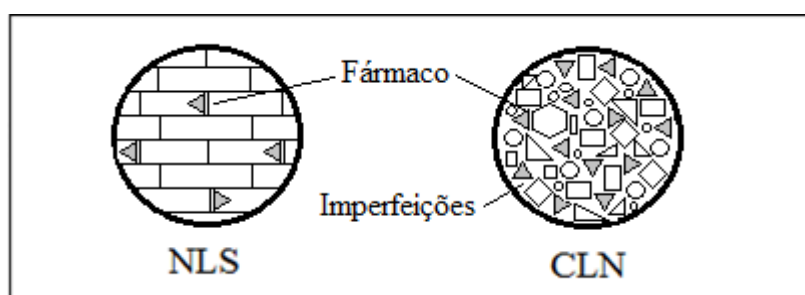


Figura 6. Organização da matriz das partículas.

Durante a última década, o número de estudos utilizando formulações baseadas em CLN aumentaram drasticamente. Isso se deve, essencialmente, às diversas barreiras derrotadas dentro do processo tecnológico de formulação de nanopartículas à base de lipídeos e maior conhecimento dos mecanismos subjacentes de transporte de CLN através de diferentes vias de administração (BELOQUI *et al.*, 2016).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) têm se destacado para administração tópica por apresentarem diversas vantagens em relação às formulações convencionais. Esses compostos lipídicos, além de biodegradáveis, favorecem a hidratação da pele através da oclusão do estrato córneo. Devido ao pequeno tamanho das nanopartículas, há a formação de um filme lipídico que adere ao estrato córneo aumentando a quantidade de ativo na pele e modulando sua permeação (MÜLLER *et al.*, 2011; PARDEIKE *et al.*, 2009; WISSING; MULLER, 2003). Tanto as NLS como os CLN são capazes de aumentar a estabilidade química de ativos sensíveis à luz, oxidação e hidrólise, resolvendo questões importantes acerca de cosméticos e produtos farmacêuticos dérmicos (PUGLIA *et al.*, 2012). Além disso, esses sistemas são vantajosos por apresentarem menor toxicidade, o que significa excelente tolerabilidade, e maior facilidade de transposição para escala industrial (PARDEIKE *et al.*, 2009).

2.5 Nanotecnologia em filtros solares

Diversos estudos têm incorporado filtros solares em sistemas nanoestruturados protegendo-os de fotodegradação e impedindo sua permeação através da pele (JIMÉNEZ *et al.*, 2004; MESTRES *et al.*, 2010; SANAD *et al.*, 2010; LACATUSU *et al.*, 2011). O filtro solar oxibenzona, por exemplo, pode provocar efeitos tóxicos ao permear a pele. Por sua vez, a sua incorporação em nanopartículas poliméricas reduziu a permeação cutânea *in vitro* utilizando como modelo a pele de orelha de porco, além de apresentar alto valor de fator de proteção solar (FPS) (MARCATO *et al.*, 2011). Wissing e Müller (2002) mostraram, empregando estudos de liberação e permeação *in vitro* e *tape stripping in vivo*, que a incorporação do filtro solar oxibenzona em NLS diminuiu sua taxa de liberação em até 50%, quando comparado com sua liberação a partir de emulsões.

Estudos demonstram que NLS e CLN podem atuar de forma eficiente como bloqueadores UV através da dispersão da luz. Por esse motivo, a incorporação de um filtro solar nesses sistemas pode proporcionar maior absorção UV comparado ao filtro solar livre, diminuindo os efeitos secundários e permitindo a utilização de menores concentrações de filtro solar (MÜLLER, RADTKE; WISSING, 2002). Ensaio de permeação *in vitro* revelaram o direcionamento das partículas para a camada mais superficial da pele, sendo o comportamento ideal para uma formulação contendo filtros solares (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2008).

Em relação ao OMC, Jiménez *et al.* (2004) realizaram estudos incorporando-o em nanocápsulas e emulsões simples. Os autores observaram aumento da retenção cutânea e diminuição da liberação e da penetração na pele do OMC nanoencapsulado. Por sua vez, Alvarez-Román *et al.* (2001) realizaram um estudo com OMC incorporado em nanocápsulas biodegradáveis e gel convencional e observaram melhor proteção aos raios UV e melhor capacidade de inibição do eritema induzido para o OMC em nanocápsulas. Perugini *et al.* (2002) estudaram a influência do encapsulamento do OMC em nanopartículas de PLGA (poli-lactídeo-co-glicolídeo) na decomposição pela luz solar e observaram redução da fotodegradação. Já Prado (2013), em seu trabalho de iniciação científica (Proc. FAPESP nº 2013/00485-4), incorporou o OMC em sistemas líquido-cristalinos constituídos por 40% de álcool cetílico propoxilado e etoxilado (Procetyl® AWS) como tensoativo, 10% de silicone DC 193® como fase oleosa e 50% de Policarbofil 0,5% como fase aquosa e observou alta retenção e baixa permeação cutânea deste filtro nos ensaios *in vitro* realizados.

A incorporação do OMC foi estudada a partir de NLS e CLN compostos por behenato de glicerol, TACC e poloxamer 188, demonstrando redução da permeação cutânea *in vitro* do OMC quando utilizados CLN e maior fotodegradação mediada por UV. Constatou-se ainda que a

incorporação de OMC em CLN foi mais eficaz que em NLS. Mais estudos obtiveram as mesmas evidências com outros filtros solares como etilhexil triazona (EHT), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB) e etilexiloxifenol metoxifenil triazina (Escalol[®] S). Quando incorporados em CLN, a capacidade de permeação dos filtros solares foi drasticamente reduzida, mantendo-se principalmente na superfície da pele. Além disso, os estudos também mostraram a manutenção da fotoestabilidade quando incorporados no sistema (MONTENEGRO *et al.*, 2015; NICULAE *et al.*, 2012; NIKOLIĆ *et al.*, 2011; PUGLIA *et al.*, 2014).

Dentre os materiais utilizados para a produção de CLNs destaca-se o lipídio sólido miristato de miristila, cujas informações como ponto de fusão e massa molecular estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2. Características físico-químicas do miristato de miristila.

Nome comercial	Fórmula química	Massa molecular	Ponto de fusão
Crodamol TM MM	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	424,74g/mol	37 – 39°C

Fonte: FISPQ do fabricante

O miristato de miristila (Figura 7) é um éster formado por ácido mirístico e álcool miristílico, na presença de um catalisador ácido. Apresenta-se como um sólido cintilante com odor característico de cera e coloração branca à amarela clara, sendo possível atingir efeitos pérola com uma concentração de 3,5% em certos sistemas. É, portanto, uma cera que se funde à temperatura corporal, altamente utilizada em formulações cosméticas e farmacêuticas destinadas a pele, apresentando um sensorial bastante agradável. Além disso, vários estudos realizados em animais evidenciaram que o lipídeo não apresenta toxicidade tópica, ocular ou oral quando testado em uma concentração de 8,0% (BECKER *et al.*, 2010; PRESTON, 1984).

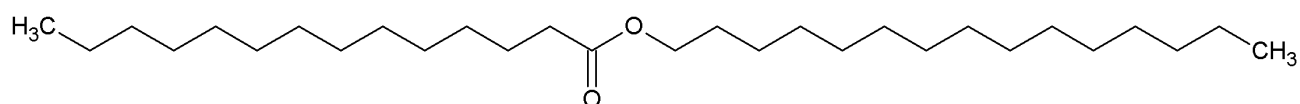


Figura 7. Fórmula estrutural do miristato de miristila.

Dentre os lipídeos líquidos utilizados na preparação de CLN, destaca-se o triglicerídeo de ácido cáprico e caprílico. É composto por triglicerídeos de cadeia média, obtidos a partir do óleo de coco pela esterificação de glicerol com uma mistura de ácido cáprico (C10) e caprílico (C8) apresentados na Figura 8. Seu uso é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e oferece vantagens como elevada estabilidade contra a oxidação e boa solubilidade devido ao seu baixo peso molecular, além de apresentarem baixo ponto de fusão (C8: 16,7°C; C10: 31,3°C) (BACH; BABAYAN, 1982; MARTEN 2006).

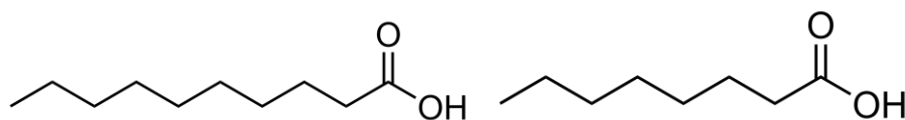


Figura 8. Fórmula estrutural dos ácidos cáprico e caprílico, respectivamente.

Na obtenção de CLN, também são empregados tensoativos, como o polissorbato ou Tween[®] 80 (T80), que apresenta equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) igual a 15,0 (WADE E WELLER, 1994) e representa um dos tensoativos não iônicos mais conhecidos e amplamente utilizado nas áreas farmacêutica e cosmética (ZAHID *et al.*, 2014; PRABHAKAR *et al.*, 2013). Segundo Montenegro (2011) a estabilidade de nanopartículas carregadas com OMC pode ser influenciada pelo tensoativo utilizado e, portanto, pela lipofilicidade do sistema. Estudos realizados encontraram formulações mais estáveis com o uso de tensoativos mais hidrofílicos, como o Tween[®] 80 apresentado na Figura 9.

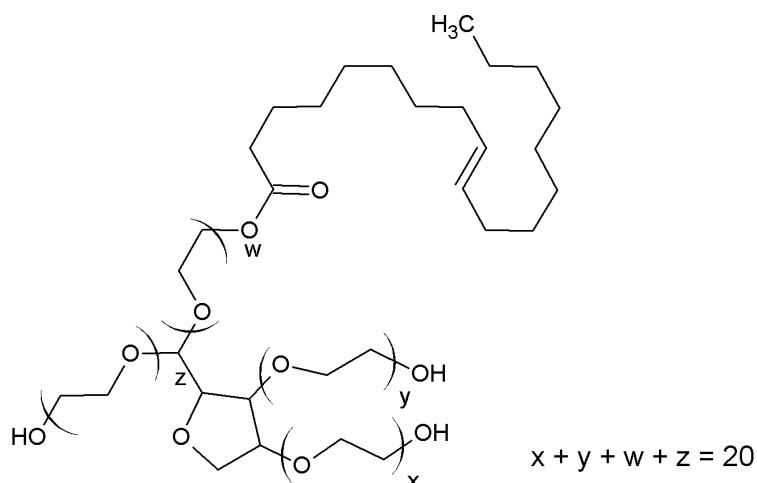


Figura 9. Fórmula estrutural do tensoativo Tween[®] 80.

Outros componentes podem ser adicionados nos CLN com a intenção de observar suas influências na formulação final, como a fosfatidilcolina de soja (FS) e o óleo de rícino (OR).

A fosfatidilcolina de soja (FS) é constituída por fosfolípídeos naturais, os quais possuem estrutura anfifílica contendo uma extremidade polar composta por um grupo colina e um grupo fosfato ligados à uma porção hidrofóbica de cadeias acílicas e estéres de glicerol. Sua estrutura é mostrada na figura 10 e representa um produto largamente utilizado como emulsificante e excipiente nas indústrias cosmética e farmacêutica (MERTINS *et al.*, 2008).

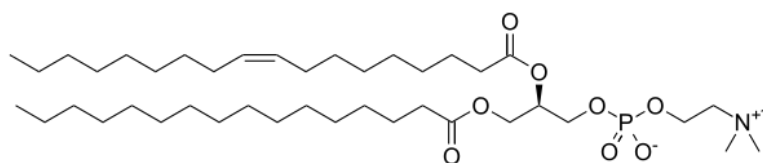


Figura 10. Fórmula estrutural da fosfatidilcolina de soja.

Fundamentação Teórica

Estudos comprovaram que a utilização simultânea de tensoativos, como T80 e FS, pode produzir sistemas mais estáveis (BARBOSA, 2013; CHEN *et al.*, 2006; HELGASON *et al.*, 2009). Além disso, a adição de T80 em combinação com fosfolípídeos pode levar a formação de filmes compactos conferindo um maior prazo de validade ao produto final (BRUXEL *et al.*, 2012). Müller *et al.* (2000) relataram que a adição de fosfatidilcolina de soja ao lipídio fundido ocasiona maior estabilidade das nanopartículas, correlacionando o aumento da sua concentração com a redução da cristalinidade das nanopartículas.

O óleo de rícino (OR) é composto por triglicerídeos naturais derivados do óleo de mamona, extraído das sementes da planta *Ricinus Communis* e encontrado em áreas tropicais como o Brasil. É um líquido amarelado viscoso constituído por 90% de ácido ricinoleico (ácido graxo insaturado e hidroxilado) e 10% de outros ácidos graxos como linoleico e oleico. Apresentado na Figura 11, o óleo de rícino é uma substância geralmente utilizada para a produção de nanopartículas e vem sendo inserida na área de nanotecnologia por ser considerada econômica e biocompatível, além de auxiliar positivamente na estabilidade da formulação (BINDER *et al.*, 1962; GHERCA *et al.*, 2012; MORAIS *et al.*, 2015; WENDER *et al.*, 2010).

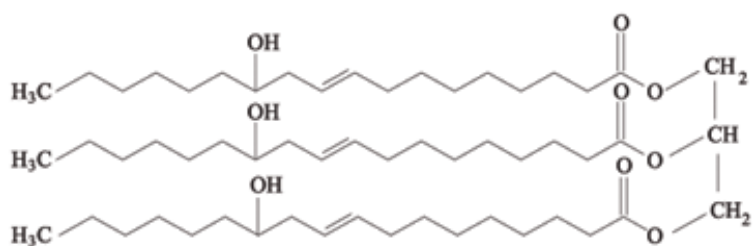


Figura 11. Fórmula estrutural do óleo de rícino.

3. OBJETIVOS

- Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) para a incorporação do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila (OMC);
- Caracterização físico-química através da determinação do diâmetro médio, potencial zeta, calorimetria diferencial exploratória, microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Análise da eficiência de encapsulação (EE) dos sistemas;
- Análise do fator de proteção solar (FPS) das formulações desenvolvidas;
- Validação de um método analítico por cromatografia de ultra eficiência (UPLC) para quantificação do *p*-metoxicinamato de octila (OMC);
- Realização de ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* utilizando células de Franz;
- Análise da citotoxicidade *in vitro*.

4. MATERIAIS & MÉTODOS

4.1 Materiais

- Acetonitrila grau UPLC (J. T. Baker, USA);
- Ácido fórmico 99%;
- Água deionizada em sistema Milli Q com condutividade 18,2 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$;
- Filtro PTFE 13mm 0,22 μm
- Fita adesiva 750 transparente Scotch[®] (3M, Brasil);
- Fosfatidilcolina de soja – Lipoid S 100 (PharmaNostra, Alemanha);
- Isopropanol grau UPLC (J. T. Baker, USA);
- Membrana de polissulfona– HT 450Tuffryn[®] (Pall Corporation, México);
- Metoxicinamato de octila – OMC (Deg, Brasil);
- Miristato de miristila – Crodamol MM[™] (Croda, Brasil);
- Óleo de rícino (Mapric, Brasil);
- Orelhas de porco (Olhos D'água, Brasil);
- Triglicerídeo de ácido cáprico e caprílico (Via Farma, Brasil);
- Tween 80[®] (Deg, Brasil).

4.2 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento Fisatom (752A);
- Balança analítica – Mettler Toledo[®] (Classic Plus);
- Centrífuga Spin Coater – SPI Supplies (KW – 4A);
- Coluna ACQUITY UPLC[®] HSS C18 SB 1.8 μm (2.1x100mm);
- DSC (Calorímetro TA Instruments – DSC Q10);
- DLS (Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK);
- Espectrofotômetro UV-Vis (Cary 60 – Agilent Technologies)

- Lavadora Ultrassônica – Unique®;
- Microcentrífuga Spectrafuge™ – 16 M (Labnet, USA);
- Microscópio de força atômica (Bruker, Dimension Icon);
- Microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-7500F);
- Peagâmetro – Gehaka®;
- Permeador – Hanson Research;
- Sistema de purificação de água Millipore®, Milli-Q Plus.
- Sonicador (Ultrasonic, Qsonica – Q700);
- UPLC® ACQUITY Waters (H Class).

4.3 Desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados

As formulações contendo carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) foram desenvolvidas por sonicação, durante 20 minutos com amplitude de 30% (20W de potência), através da adaptação do método anteriormente descrito (Lim *et al.*, 2004; Mehnert e Mäder *et al.*, 2001). As formulações foram constituídas por 2,0% de miristato de miristila (MM), 0,1% de triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (TACC) e 1,0% do tensoativo tween 80 (T80) em água (F1), adicionadas de 1,0% de fosfatidilcolina (F2) ou 0,88% de óleo de rícino (F3), a fim de avaliar a influência dessas substâncias no sistema. O OMC foi incorporado na fase lipídica na concentração de 1% em relação ao total do sistema, obtendo-se as formulações F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC.

A pré-emulsão foi formada a partir do aquecimento da fase aquosa (água e tensoativo) a aproximadamente 80 °C e junção com a fase oleosa aquecida à mesma temperatura, mantendo agitação em agitador magnético com auxílio de barra magnética. Essa pré-emulsão foi sonicada e posteriormente colocada em banho de gelo e resfriadas até a temperatura de 25 °C. As formulações foram centrifugadas a 5000 rpm, durante 10 minutos, a fim de retirar o titânio, interferente que pode ser despreendido no processo de sonicação (AGAYAN *et al.*, 2004).

4.4 Caracterização físico-química

4.4.1 Determinação do diâmetro médio

A determinação do diâmetro médio dos CLNs foi realizada pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons, também conhecida como espalhamento de luz dinâmico (DLS) ou *quase-*

elastic light scattering, usando equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, UK). A partir desta técnica é possível determinar o movimento Browniano das partículas através da incidência de um feixe de luz pela dispersão coloidal.

Desta forma, a intensidade do espalhamento da luz é captada permitindo o cálculo do raio hidrodinâmico das partículas, de acordo com a equação de Einstein-Stokes (Equação 1), realizada pelo *software Zetasizer*:

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R_h} \quad (1)$$

onde: D = coeficiente de difusão das partículas; K = constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$); T = temperatura absoluta (293,15 K); $\pi = 3,141592$; η = viscosidade ($1,002 \times 10^{-3} \text{ NM}^{-2}$); R_h = raio hidrodinâmico.

As dispersões de CLNs foram diluídas em água destilada (1:100 v/v), colocadas em frascos de cintilação e analisadas na câmara, de modo que feixes pudessem atravessar a dispersão em toda a sua extensão. As leituras foram realizadas nos tempos 1, 7, 15, 30 e 60 dias. As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados tratados estatisticamente pela análise de variância Friedman e ANOVA seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi ($p < 0,05$).

4.4.2 Análise do potencial Zeta

A análise do potencial zeta foi realizada por determinação da mobilidade eletroforética dos CLNs utilizando equipamento Light Scattering (Brookhaven). As amostras foram previamente diluídas (1:100) em água. As formulações foram analisadas durante o período de 60 dias e os resultados tratados estatisticamente pela análise de variância Friedman e ANOVA seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi ($p < 0,05$).

4.4.3 Calorimetria diferencial exploratória

As amostras foram analisadas segundo Puglia (2012) utilizando um calorímetro diferencial de varredura (TA Instruments, modelo DSC Q10), num intervalo de temperatura de 10 a 85°C com velocidade de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 50 cm³/min. Para isso, foram utilizados cerca de 5 mg de amostra da formulação liofilizada em um cadinho de alumínio selado. Os resultados de DSC foram analisados empregando o *software TA Universal Analysis*.

As análises de DSC foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Sandra Pulcinelli do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

4.4.4 Análise microscópica

4.4.4.1 Microscopia de força atômica

A determinação da forma geral dos CLNs foi realizada por microscopia de força atômica (MFA) empregando microscópio de força atômica (Bruker, modelo Dimension Icon), sob o modo de contato intermitente. A preparação da amostra foi feita de três maneiras diferentes. Primeiramente, uma gota da formulação foi pingada no substrato (mica) com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e centrifugada por Spin Coating, equipamento responsável por realizar em primeiro momento uma rotação centrípeta (500 rpm durante 30 segundos) a fim de fixar os CLNs no substrato, e em segundo momento uma rotação centrífuga (5000 rpm durante 60 segundos) expulsando o solvente ou líquido presente na amostra, neste caso a água. Como segunda metodologia adotada, alíquotas da formulação foram coletadas e diluídas (1:100) em água. A quantidade de 10,0 µl foi coletada e pipetada sob o substrato e, desta vez, a retirada do solvente foi realizada através de secagem à vácuo durante 24 horas. Por fim, uma terceira alternativa foi mergulhar o substrato na diluição (1:100 v/v), permanecendo durante 30 minutos e realizada secagem em gás de nitrogênio. Após a preparação da amostra, o substrato foi colocado no microscópio equipado com uma sonda (cantilever), onde foi realizado o rastreamento da superfície da amostra (FERREIRA; YAMANAKA, 2006). O tratamento das imagens topográficas foi realizado utilizando o *software NanoScope Analysis*.

As análises de MFA foram realizadas no Departamento de Física e Ciências de Materiais (FCM) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo – USP, em colaboração com o Prof. Dr. Marcelo A. Pereira da Silva.

4.4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada empregando microscópio eletrônico de varredura de efeito de campo (MEV-FEG) (JEOL JSM-7500F). Foi aplicada uma gota das NLS em um substrato de silício e realizada secagem durante 3 dias em um dessecador sob vácuo. Após este período, o substrato contendo a amostra foi retirado do dessecador e recoberto com carbono, no Sputter Coater SCD 050, visando criar uma camada condutora na superfície da amostra. Posteriormente, fotomicrografias foram obtidas utilizando feixe de elétrons de 10 e 20 kV.

4.5 Fator de proteção solar

O fator de proteção solar foi determinado segundo metodologia *in vitro* proposta por Mansur (1986). As amostras foram diluídas em isopropanol para avaliação por espectrofotometria no ultravioleta. Segundo Mansur et al. (1986) as soluções devem apresentar concentrações finais de 0,2

mg/mL e as análises realizadas nos comprimentos de onda de 290 nm até 320 nm (UVB) em intervalos de 5 nm. As formulações foram mantidas refrigeradas ($T^{\circ}\text{C} > 10$) e analisadas nos tempos 1, 7, 15 e 30 dias.

Para o cálculo do FPS, foram utilizados os valores da Tabela 3, a qual relaciona o efeito eritematogênico (EE) e a intensidade da radiação (I) em cada comprimento de onda.

Tabela 3. Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.

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

Os valores de absorbâncias obtidos foram substituídos na equação de Mansur (Equação 2):

$$\text{FPS}_{\text{espectrofotométrico}}^{320/290} = \text{FC} \cdot \Sigma \text{EE}(\lambda) \cdot \text{I}(\lambda) \cdot \text{abs}(\lambda) \quad (2)$$

onde: FC = 10 (fator de correção); EE (λ) = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ); I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda (λ); Abs (λ) = valor espectrofotométrico da absorbância da solução da preparação no comprimento de onda (λ) (MANSUR *et al.*, 1986).

4.6 Quantificação do OMC por UPLC

Um novo método simples e efetivo foi desenvolvido e validado seguindo as normas descritas na RDC 899 (29 de maio de 2003) para a quantificação do OMC por UPLC. Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação e robustez.

4.6.1 Condições cromatográficas

O sistema cromatográfico foi definido como:

- ❖ UPLC[®] ACQUITY Waters (H Class).

- ❖ Coluna ACQUITY UPLC® HSS C18 SB 1.8µm (2.1x100mm);
- ❖ Detector UV operando em 310 nm;
- ❖ Fase móvel 80:20 acetonitrila e água acidificada (ácido fórmico 0,1%);
- ❖ Fluxo de 0,5 mL/min;
- ❖ Tempo de corrida: 3,5 min
- ❖ Volume de injeção: 2,0 µL.

4.6.2 Validação do método analítico

4.6.2.1 Linearidade

Soluções de OMC foram preparadas e injetadas em triplicata no UPLC. Para a construção da curva foram utilizadas as áreas obtidas para cada concentração e a linearidade foi comprovada pela equação da reta, devendo obedecer a especificação de $R^2 > 0,99$.

4.6.2.2 Precisão e exatidão

As análises de precisão intersensaio foram realizadas utilizando os controles de qualidade definidos como baixo, médio e alto, juntamente com o ponto referente ao limite de quantificação (LIQ). Os testes foram realizados em dias diferentes e analisados em triplicata.

4.6.2.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) foi estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do filtro solar, até o menor nível detectável. Já o limite de quantificação (LQ) representa o menor valor que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis.

4.6.2.4 Robustez

A robustez é a susceptibilidade de um método analítico para diferentes condições experimentais. Este item foi determinado por alterações nos parâmetros: fluxo, fase móvel, pH da fase móvel, tipo da coluna e temperatura da coluna e da amostra. O método deve ser resistente à essas pequenas variações.

4.7 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi obtida pela medida da concentração de OMC livre presente no meio de dispersão. Foi realizada a centrifugação de 1 mL da amostra a 14000 rpm durante 30 min, afim de separar os CLNs. O OMC livre, presente na fase aquosa foi então coletado e filtrado

em filtro PTFE 0,22µm. As amostras foram analisadas em triplicata por UPLC. A eficiência de encapsulação (EE%) foi dada pela Equação 3.

$$\% EE = \frac{A}{B} \times 100 \quad (3)$$

onde: A é a quantidade de OMC encapsulado nos CLNs e B é a quantidade inicial de OMC adicionado na formulação. $A = B - [\text{OMC não encapsulado}]$. Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância ANOVA seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi ($p < 0,05$).

4.8 Ensaio *in vitro*

4.8.1 Liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* do OMC foram conduzidos utilizando o sistema de célula de difusão vertical (células de Franz – Figura 12) com volume no compartimento receptor de 7 mL e área de contato com a amostra de 1,77 cm². Para avaliar a liberação, foi utilizada uma membrana de polissulfona. O compartimento receptor foi preenchido com solução receptora composta por tampão fosfato pH 7,4 com tween 80 a 2,0% (m/v), garantindo a condição *sink* durante todo o ensaio.

As amostras (400µL) foram transferidas com auxílio de uma pipeta para o anel dosador colocado sobre a membrana sintética. Os experimentos foram conduzidos a 32 ± 2 °C e a solução receptora foi constantemente agitada a 300 rpm. Durante o ensaio, alíquotas de 1,5 mL foram coletadas nos tempos 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, filtradas em PTFE 0,22 µm e analisadas em UPLC para avaliar a liberação do OMC.

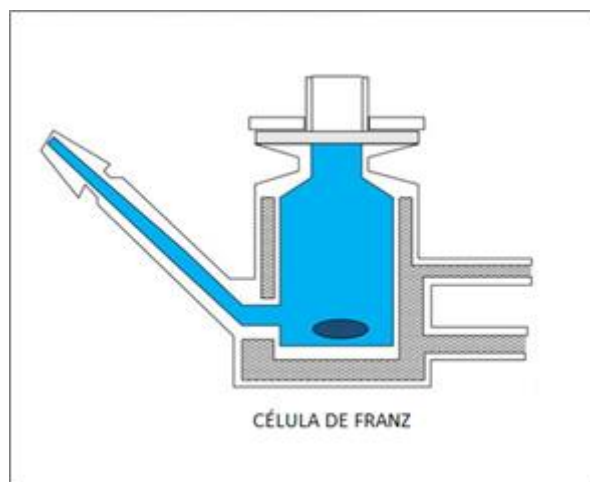


Figura 12. Ilustração da célula de Franz (PUGLIA *et al.*, 2012).

Os resultados da liberação *in vitro* foram tratados estatisticamente pela análise de variância ANOVA seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi ($p < 0,05$). O perfil de liberação de OMC *in vitro* foi analisado segundo os modelos matemáticos: Baker-Lonsdale, Primeira-Ordem, Peppas e Higuchi com o auxílio do *software Sigma Plot*[®] 11.0.

4.8.2 Permeação e retenção cutânea *in vitro*

Da mesma forma, os ensaios de permeação foram realizados utilizando células de Franz, porém, desta vez, entre o compartimento doador e receptor da célula de difusão foi utilizada a pele de orelha de porco buscando mimetizar a pele humana.

As peles de orelha de porco utilizadas nos experimentos foram obtidas no Frigorífico Olhos d'Água logo após o abate dos animais. As orelhas foram lavadas com água corrente, e os pêlos em excesso e tecidos não desejados foram removidos com o auxílio de tesoura. Logo após este procedimento, essas orelhas foram dissecadas com auxílio de bisturi e pinça. Em seguida, as peles foram dermatomizadas retirando-se apenas o estrato córneo, epiderme e a camada mais externa da derme com auxílio de um dermatômetro, com espessura de 500 μm .

Após a permeação cutânea, as peles foram retiradas do equipamento e colocadas em uma placa de vidro para a realização da retenção cutânea. O primeiro passo foi a realização da técnica de *tape stripping*, onde, após o período de exposição definido, a camada córnea foi retirada pela aplicação consecutiva de fita adesiva (TOUITOU; MEIDAN; HORWITZ, 1998).

Primeiramente, o estrato córneo foi removido com a utilização de 15 fitas adesivas. As fitas foram colocadas em tubos de ensaio contendo 3 mL do solvente extrator isopropanol, os quais foram agitados em vortex por 2 minutos e sonicados durante 30 minutos em banho de ultra-som. O sobrenadante foi então filtrado e analisado em UPLC para quantificação do OMC retido no estrato córneo.

Após a retirada do estrato córneo, a área em contato com a formulação foi recortada utilizando uma tesoura cirúrgica e picotada. A pele foi transferida para tubos de ensaio contendo 3mL de isopropanol. O mesmo processo descrito acima foi realizado, porém, desta vez, após a agitação por 2 minutos, a solução foi triturada durante 1 minuto no turrex, sonicada por 30 minutos e centrifugada durante 7 min em 3000 rpm. O sobrenadante foi filtrado e analisado em UPLC para quantificar o OMC retido na epiderme e derme. Esse teste secundário foi denominado convenientemente neste trabalho como retenção dérmica.

Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância ANOVA seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi ($p < 0,05$).

4.8.3 Citotoxicidade *in vitro*

As células HaCaT (linhagem de queratinócitos humanos, espontaneamente imortalizadas) foram gentilmente doadas pela Dra. Maria José Mendes Giannini (Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP), e incubadas em meio DMEM suplementado com FBS 10% e 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100µg/mL). As células foram mantidas em ambiente umidificado a 37 °C com 5% de CO₂ e subcultivadas duas vezes por semana.

Um ensaio de redução de resazurina foi utilizado para investigar a citotoxicidade das formulações. O ensaio baseia-se na redução do corante indicador resazurina, altamente fluorescente em células viáveis. As células não viáveis perdem rapidamente a capacidade metabólica para reduzir a resazurina e, portanto, não produzem um sinal fluorescente.

As células foram descoladas por tratamento com 0,25% de tripsina/EDTA (VitroCell, Brasil) e 2,5 x 10⁴ células foram colocadas em cada poço de uma placa de cultura celular de 96 poços (Costar, EUA) em um volume total de 100 µL. As células foram deixadas durante a noite para aderir à placa e, em seguida, foram tratadas com diferentes concentrações de OMC. Após 24 h de incubação, o meio foi removido e 50 µL de resazurina (Sigma-Aldrich, Alemanha) 0,01% w/v em DMEM, foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C durante 3 horas.

A fluorescência foi medida num leitor de placas Biotek Sinergia H1 (Biotek, Winooski, VT) utilizando um comprimento de onda de excitação de 530 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. As células não tratadas constituíram o controle negativo (células viáveis), e as células tratadas com doxorrubicina, a 100 nmol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) constituíram o controle positivo (células mortas). Todos os testes foram realizados em três ensaios independentes.

Os valores de IC₅₀ foram calculados a partir de uma curva de calibração por curvas de regressão usando o *software Microsoft Excel*.

5. RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados

A quantidade de tensoativo presente no sistema foi definida variando sua concentração de 1,0 a 5,0% e analisando os resultados de diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta. Os resultados são apresentados na Tabela 4 e as características visuais dos sistemas na Figura 13.



Figura 13. Aspecto macroscópico das formulações mostrando a variação na concentração do tensoativo Tween[®] 80 de 1,0% a 5,0%, da esquerda para a direita.

Tabela 4. Variação do diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta em função da concentração de tensoativo Tween[®] 80 (\pm DP).

Concentração Tween [®] 80(%)	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade	Potencial zeta
1,0	132,9 \pm 0,66	0,220 \pm 0,00	-33,0 \pm 1,70
2,0	131,3 \pm 3,02	0,219 \pm 0,01	-33,7 \pm 1,53
3,0	174,5 \pm 2,48	0,349 \pm 0,03	-12,9 \pm 0,51
4,0	140,0 \pm 9,48	0,395 \pm 0,06	-12,1 \pm 0,72
5,0	48,49 \pm 7,19	0,424 \pm 0,07	-9,69 \pm 0,97

A concentração de 1,0% incorporada foi considerada ideal uma vez que não houve grande alteração quando utilizada uma concentração de 2,0%. Além disso, um alto valor de potencial zeta é requerido para o sistema, uma vez que confere maior quantidade de carga e, portanto, maior repulsão das partículas indicando menor propensão à instabilidade e decantação (MULLER *et al.*, 2000).

A Tabela 5 apresenta as concentrações dos componentes utilizados nos sistemas.

Tabela 5. Formulações desenvolvidas e concentração dos componentes utilizados.

	Concentração (%)						
	MM	TACC	T80	FS	OR	OMC	H ₂ O
F1	2,0	0,1	1,0	-	-	-	qsp*
F2	2,0	0,1	1,0	1,0	-	-	qsp*
F3	2,0	0,1	1,0	-	0,88	-	qsp*
F1.OMC	2,0	0,1	1,0	-	-	1,0	qsp*
F2.OMC	2,0	0,1	1,0	1,0	-	1,0	qsp*
F3.OMC	2,0	0,1	1,0	-	0,88	1,0	qsp*

*qsp – quantidade suficiente para atingir 100% de formulação.

As formulações finais são apresentadas nas Figuras 14 e 15. Após preparação, os sistemas foram acondicionados em vidro âmbar e armazenados em geladeira (<10 °C), pois o armazenamento em temperaturas elevadas (i.e. 37 °C) pode oferecer energia ao sistema levando a agregação das partículas e conseqüente aumento do diâmetro médio observado (MEHNERT; MÄDER, 2001).

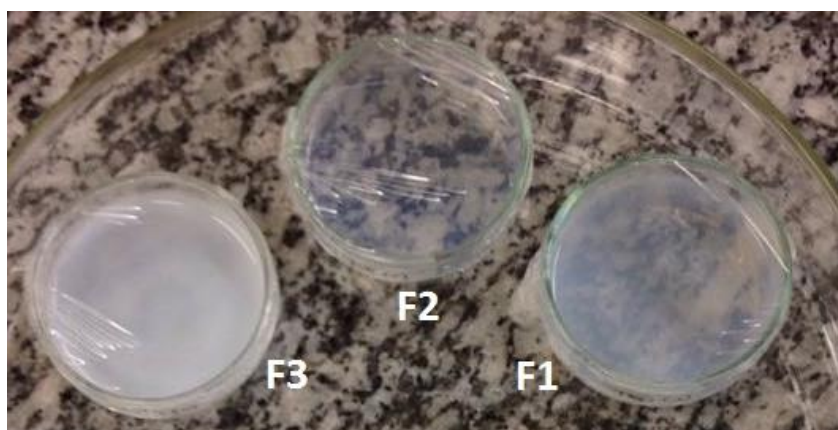


Figura 14. Aspecto macroscópico das três formulações (F1, F2 e F3) desenvolvidas contendo carreadores lipídicos estruturados (NLCs) livres.



Figura 15. Aspecto macroscópico das três formulações (F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC) contendo *p*-metoxicinamato de octila (OMC).

5.2 Caracterização físico-química

5.2.1 Determinação do diâmetro médio

A técnica de correlação de fótons utiliza o espalhamento dinâmico de luz (*light scattering*) e nos fornece a variação da intensidade da luz dispersa a partir do movimento das partículas presentes no sistema. Esta técnica representa uma ótima ferramenta para a caracterização de nanopartículas de até cerca de 3 μm ; porém, não representa uma medida direta do tamanho da partícula e sim uma dispersão da luz que supõe o diâmetro médio e, por esse motivo, pode causar incertezas em relação ao seu formato esférico (MULLER, 2000). Os resultados das análises das formulações, a partir de 24 horas após a preparação, são expressos na Figura 16.



Figura 16. Média e desvio padrão do diâmetro médio (nm) dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) livres e carregados com OMC no período de 60 dias.

Observou-se que a incorporação de fosfatidilcolina de soja causou uma diminuição no tamanho médio das partículas, tanto nos CLNs livres quanto nos carregados e a adição de óleo de rícino apresentou um aumento no diâmetro médio dos CLN livres e carregados de OMC. Além

disso, foi reportado que o diâmetro médio depende da quantidade de lipídeo líquido adicionado à formulação. Concentrações de até 20% prometem aumentar o tamanho das nanopartículas; porém, essa influência depende da estrutura química dos lipídeos utilizados e de suas interações (LIN *et al.*, 2007). Em todos os casos não houve grande alteração quando incorporado OMC nas formulações. Este resultado pode ser explicado considerando a característica oleosa do filtro solar que reduz a viscosidade da mistura de lipídeos diminuindo a tensão superficial e, portanto, formando partículas com dimensões menores em comparação com as vazias (PUGLIA *et al.*, 2014). De acordo com Jennings *et al.* (2000), tanto a composição quanto a viscosidade da matriz lipídica podem influenciar no tamanho das partículas, pois a formação de diferentes estruturas cristalinas é acompanhada por modificações na agregação das partículas. Além disso, essas mudanças também podem afetar a estabilidade da formulação, a liberação e a penetração pela pele (SOUTO, 2005).

Estudos conduzidos por Puglia *et al.* (2014) com OMC (1,0%) em sistemas compostos por compritol 888, TACC e poloxamer 188, obtiveram resultados de tamanho de partículas de $318 \pm 25,4$ nm para CLN e $190,6 \pm 20,1$ para nanoemulsão, com índice de polidispersidade de $0,25 \pm 0,02$ e $0,26 \pm 0,02$, respectivamente. Da mesma forma, Nikolic *et al.* (2011) desenvolveram CLNs com OMC obtendo valores de diâmetro médio de 177,7 nm e 192,3 nm com polidispersidade de 0,13 e 0,14, respectivamente. Portanto, os resultados de diâmetro médio encontrados neste estudo se aproximam dos valores encontrados na literatura para o OMC em sistemas nanoestruturados.

A homogeneidade nos resultados de diâmetro médio é dada pelo índice de polidispersidade das partículas, os quais são expressos na Tabela 6.

Tabela 6. Polidispersidade das formulações em relação ao tempo em dias (\pm DP).

Formulação	Tempo				
	t1	t7	t15	t30	t60
F1	$0,19 \pm 0,02^{a,b}$	$0,23 \pm 0,07^{b,c}$	$0,18 \pm 0,01^a$	$0,26 \pm 0,07^c$	$0,24 \pm 0,03^c$
F2	$0,12 \pm 0,04^d$	$0,19 \pm 0,03^e$	$0,11 \pm 0,02^d$	$0,14 \pm 0,04^{d,f}$	$0,14 \pm 0,01^d$
F3	$0,19 \pm 0,05^{g,h}$	$0,21 \pm 0,09^g$	$0,17 \pm 0,01^{g,h}$	$0,20 \pm 0,09^{g,h}$	$0,15 \pm 0,01^h$
F1.OMC	$0,13 \pm 0,01^i$	$0,13 \pm 0,01^i$	$0,12 \pm 0,01^i$	$0,11 \pm 0,02^i$	$0,13 \pm 0,01^i$
F2.OMC	$0,09 \pm 0,02^j$	$0,09 \pm 0,01^j$	$0,09 \pm 0,02^j$	$0,10 \pm 0,02^j$	$0,09 \pm 0,02^j$
F3.OMC	$0,14 \pm 0,01^k$	$0,15 \pm 0,02^k$	$0,14 \pm 0,01^k$	$0,14 \pm 0,02^k$	$0,15 \pm 0,01^k$

Símbolos iguais indicam valores sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Segundo Sapra (2016) o valor médio do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas não deve variar mais que 20%, enquanto que um índice de polidispersidade superior a 0,5 é relatado como má estabilidade da suspensão podendo levar a agregação e/ou sedimentação. As formulações apresentaram índice de polidispersidade entre 0,09 e 0,26 indicando boa estabilidade e confiança

nos resultados de diâmetro médio apresentados. Além disso, a incorporação de FS no sistema levou à melhora do índice de polidispersidade, enquanto o OR não causou alteração aparente. Por sua vez, a incorporação de OMC nos CLNs diminuiu a polidispersidade em todos os casos, não demonstrando diferença estatística entre os tempos, até 60 dias, e corroborando com uma melhor estabilidade dos sistemas.

5.2.2 Análise do potencial zeta

O potencial zeta é a medida de carga elétrica presente na superfície das partículas indicando a estabilidade física dos sistemas coloidais. Com isto, podemos obter informações sobre a estabilidade da formulação durante o seu armazenamento. Geralmente, há uma menor probabilidade de aglomeração das partículas quando estas estão carregadas, provocando alta repulsão elétrica (MULLER, 1996). É relatado que um valor de potencial zeta referente a $|20 \text{ mV}|$ indica boa estabilidade de suspensões ao longo do tempo (HUNTER, 1981; GONZALEZ-MIRA *et al.*, 2010). A Tabela 7 apresenta os valores de potencial zeta das formulações em função do tempo.

Tabela 7. Potencial zeta das formulações em relação ao tempo (\pm DP).

Formulação	Tempo				
	t1	t7	t15	t30	t60
F1	$-27,3 \pm 8,36^a$	$-15,6 \pm 1,09^b$	$-17,5 \pm 3,11^{b,c}$	$-20,2 \pm 3,64^{b,c}$	$-19,7 \pm 1,04^{b,c}$
F2	$-16,5 \pm 5,58^{d,f}$	$-10,4 \pm 2,35^e$	$-12,3 \pm 4,22^{d,e}$	$-17,0 \pm 4,95^{d,f}$	$-18,8 \pm 4,05^f$
F3	$-15,5 \pm 0,50^g$	$-21,0 \pm 3,71^g$	$-17,7 \pm 1,58^g$	$-21,9 \pm 4,98^g$	$-18,6 \pm 1,33^g$
F1.OMC	$-17,4 \pm 3,08^h$	$-17,2 \pm 3,68^h$	$-14,2 \pm 2,13^i$	$-17,4 \pm 1,07^h$	$-17,0 \pm 1,19^h$
F2.OMC	$-16,9 \pm 3,91^j$	$-15,8 \pm 2,44^j$	$-19,7 \pm 4,53^j$	$-16,7 \pm 5,00^j$	$-20,3 \pm 6,16^j$
F3.OMC	$-16,2 \pm 1,04^k$	$-19,1 \pm 2,56^k$	$-18,7 \pm 2,66^k$	$-19,6 \pm 2,91^k$	$-16,3 \pm 1,75^k$

Símbolos iguais indicam valores sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Em geral, os sistemas apresentaram valores de potencial zeta variando de $-10,4$ até $-27,3$. Não houve grande alteração nos resultados após adição de FS e OR, mantendo os valores de potencial zeta quando incorporado OMC. Valores semelhantes foram encontrados em estudo realizado por Puglia *et al.* (2014) com OMC observando resultado de potencial zeta de $-26,5 \pm 1,8$ para CLN e $-13,3 \pm 0,5$ para nanoemulsão.

As formulações contendo OMC não apresentaram diferença estatística significativa no valor de potencial zeta, durante o armazenamento, demonstrando que esses sistemas são capazes de manter o valor de potencial zeta durante 60 dias.

5.2.3 Calorimetria diferencial exploratória

A calorimetria diferencial exploratória é geralmente utilizada para a análise do estado sólido das nanopartículas e nos dá informações sobre o estado de agregação do núcleo lipídico apresentando como resultado um pico de fusão, o qual pode ser relacionado à temperatura de fusão do componente puro ou de uma mistura deles. Diferentes modificações lipídicas possuem diferentes entalpias e pontos de fusão, sendo possível monitorar a estabilidade do sistema através da mudança desses valores. Geralmente o pico obtido na análise de nanopartículas é mais baixo que o esperado, devido provavelmente ao tamanho da estrutura cristalina (MONTENEGRO 2011; MULLER *et al.*, 2000; MEHNERT E MÄDER, 2001; WESTESEN E BUNJES, 1995).

Os resultados das leituras dos CLN livres são apresentados na Figura 16. As curvas de DSC das formulações F1, F2 e F3 obtiveram comportamento semelhante e temperaturas de fusão de 36,55°C; 36,94°C e 37,07°C respectivamente. Todas as amostras apresentaram um pico referente ao miristato de miristila, o qual possui temperatura de fusão na faixa de 37 – 39°C. A incorporação de FS e OR praticamente não apresentaram variação na temperatura de fusão.

Além disso, a partir desta análise, observou-se diminuição nos valores de entalpia, conforme esperado. Quando adicionado 1,0% de FS (F2) ou 0,88% de OR (F3) ocorre uma diminuição relativa da concentração de lipídeo sólido presente na formulação, conforme observados pelos valores de entalpia de 60,24 J/g e 54,11 J/g, respectivamente, mostrados na Figura 17. Segundo Lin (2007) cristais menos ordenados necessitam de menor energia para derretimento, por esse motivo baixos valores de entalpia de fusão indicam arranjos menos ordenados.

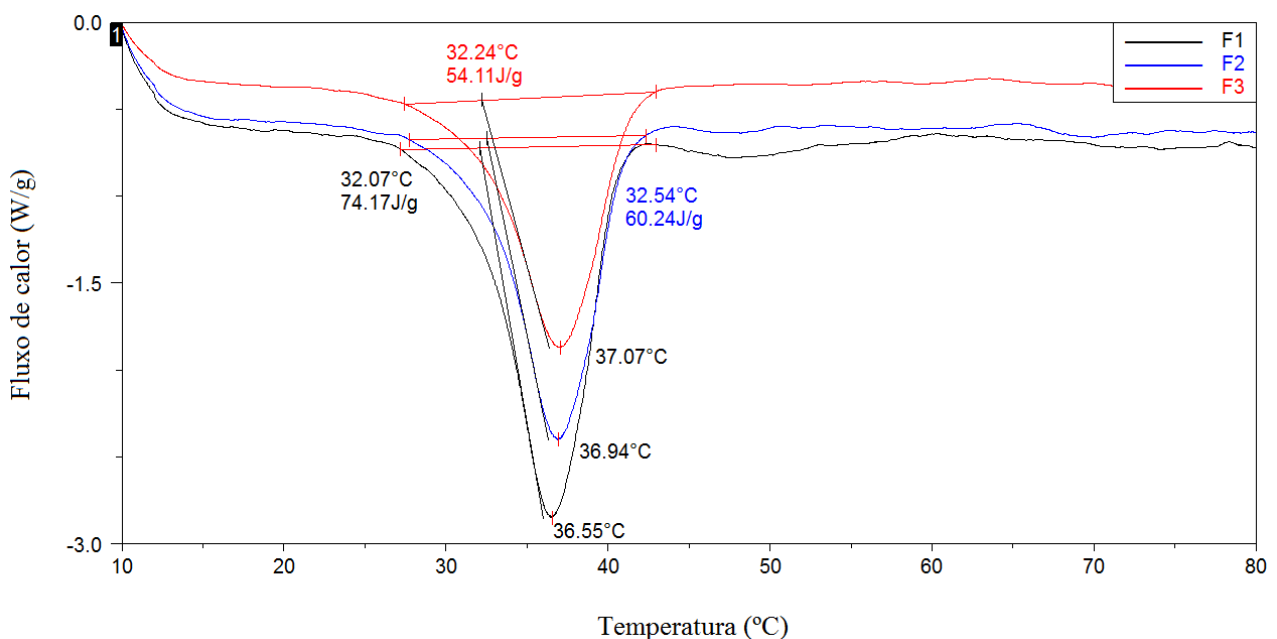


Figura 17. Curvas de DSC das formulações F1, F2 e F3 e suas respectivas entalpias.

Em todos os casos, a adição de OMC ao sistema alterou a estrutura dos CLN causando deslocamento no pico de fusão. A formulação F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC quando acrescidas de OMC apresentaram pico de fusão em 65,07°C; 63,41°C e 61,69°C, respectivamente, conforme observado na Figura 18. A entalpia do sistema (69,60J/g) também diminuiu com o acréscimo das substâncias FS (45,85J/g) e OR (51,13J/g).

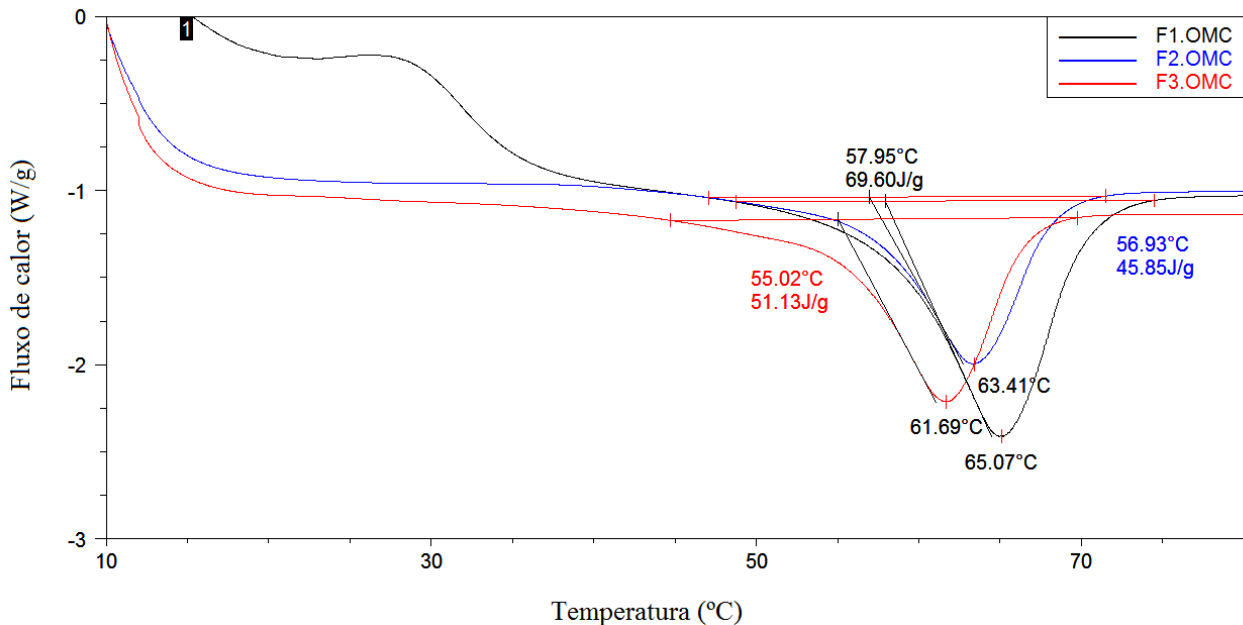


Figura 18. Curvas de DSC das formulações F1, F2 e F3 livres e acrescida de OMC (F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC).

Resultados semelhantes em CLN foram encontrados por Puglia *et al.* (2012), apresentando ponto de fusão em 64°C após incorporação do OMC em CLN, porém, relatando picos de fusão em temperaturas mais baixas em comparação com as partículas vazias (71°C). Isso ocorre devido ao uso de diferentes componentes, principalmente o lipídeo sólido, representado pelo behenato de glicerol (PF 74°C). Além disso, estudos anteriores relataram o papel do OMC na modificação da estrutura e a estabilização da matriz, evidenciando a diminuição da cooperatividade dos lipídeos (MONTENEGRO *et al.*, 2011; PUGLIA *et al.*, 2012).

5.2.4 Análise microscópica

A microscopia eletrônica, tais como microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia de força atômica (AFM), são amplamente utilizados para caracterizar nanopartículas lipídicas em relação ao seu tamanho e forma (IQBAL *et al.*, 2012).

5.2.4.1 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (AFM) é utilizada para obter informações de morfologia e topografia dos materiais e demonstrou ser uma ótima ferramenta para a análise de partículas em nanoescala (STETTER *et al.*, 2015). A primeira metodologia realizada apresentou, para a formulação F1, a formação de um filme com partículas de aproximadamente 30 a 50 nm e uma altura máxima de 2 nm podendo ser observada na Figura 19.

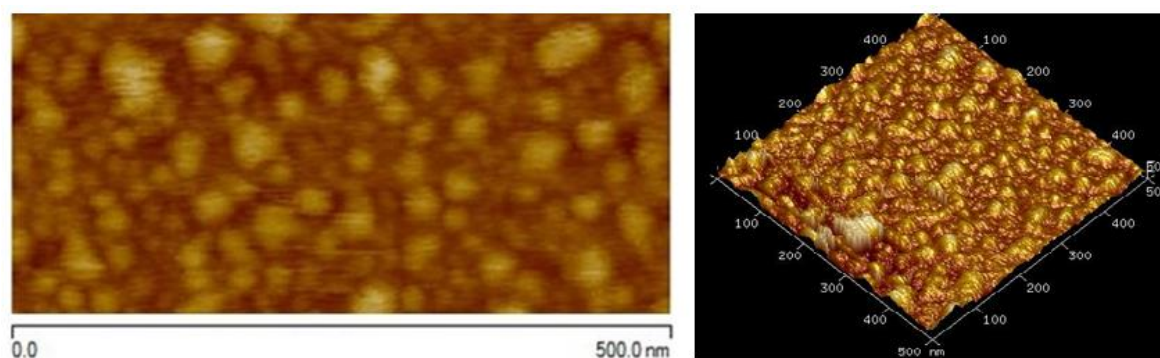


Figura 19. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F1.

Uma vez que a AFM representa uma microscopia de contato e analisa somente a superfície do material, é necessária delicada preparação da amostra. As formulações F2, F3 e os CLN carregados com OMC não apresentaram resultados satisfatórios, pois aparentemente os sistemas são altamente oleosos para que a leitura da sonda seja realizada, ocorrendo, portanto, deslizamento da sonda pela amostra e conseqüentemente prejudicando o resultado da análise. Dessa forma, as amostras foram diluídas (1:100 v/v) com o intuito de melhorar este resultado.

Na análise da formulação F2 foram encontradas poucas partículas apresentando uma média de tamanhos entre 100 e 150 nm e altura máxima de 37 nm (Figura 20).

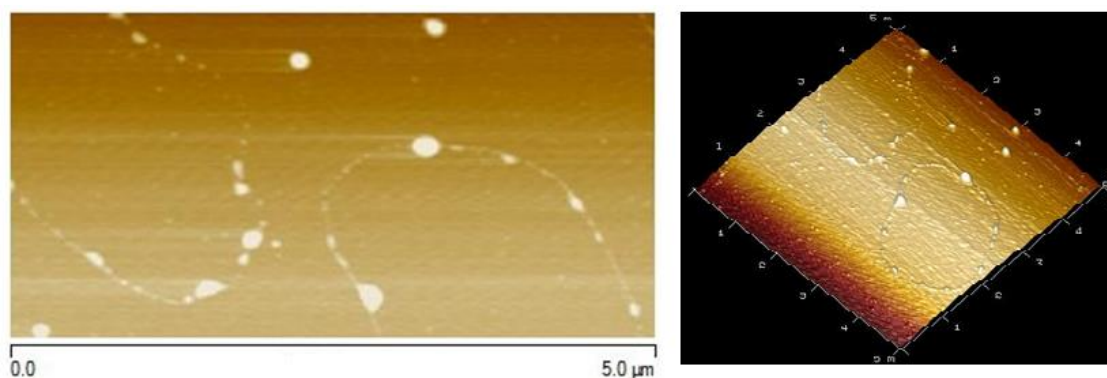


Figura 20. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F2 diluída.

Por sua vez, a formulação F2.OMC foi analisada apresentando também poucas partículas na faixa de 300 a 500 nm e altura máxima de 55 nm, conforme observado na Figura 21.

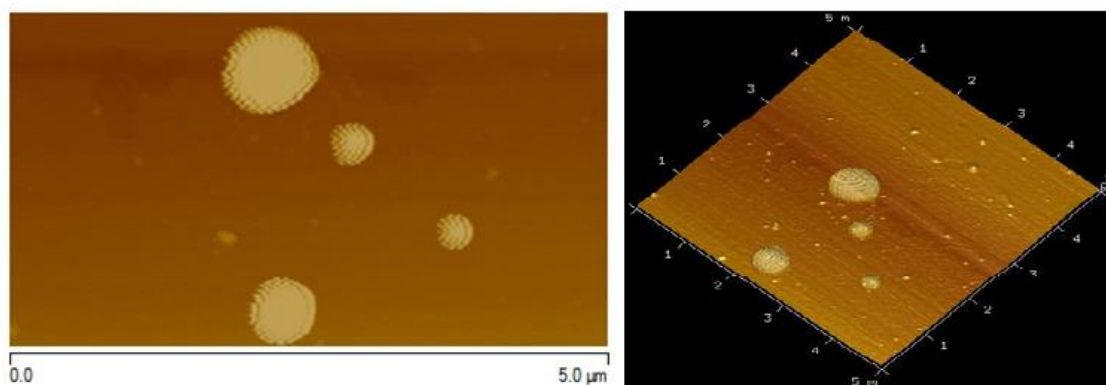


Figura 21. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F2.OMC diluída.

Ainda assim, não foi possível analisar todas as formulações. Por este fator, foi aplicada uma adaptação da técnica conhecida como *dipcoating*, onde o substrato é mergulhado na amostra, ao invés da mesma ser gotejada no substrato (WU *et al.*, 2015). Dessa forma, a mica foi mergulhada na amostra diluída permanecendo por 30 minutos, a fim de aumentar a interação dos CLN com esse substrato.

A análise da formulação F1 mostrou uma pequena quantidade de partículas com tamanho entre 150 e 350 nm. A análise topográfica da formulação F1 mostrou uma altura máxima de 4 nm (Figura 22).

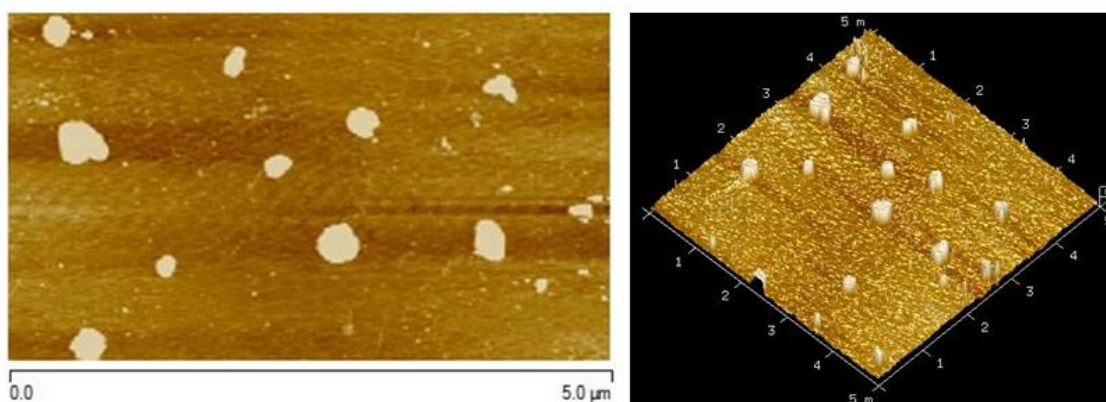


Figura 22. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F1 após diluição e *dipcoating*.

A formulação F2 também pôde ser analisada após diluição e aplicação da técnica de *dipcoating*. Os resultados demonstraram tamanhos de partícula entre 40 e 80 nm e altura menor que 1 nm, apresentada na Figura 23.

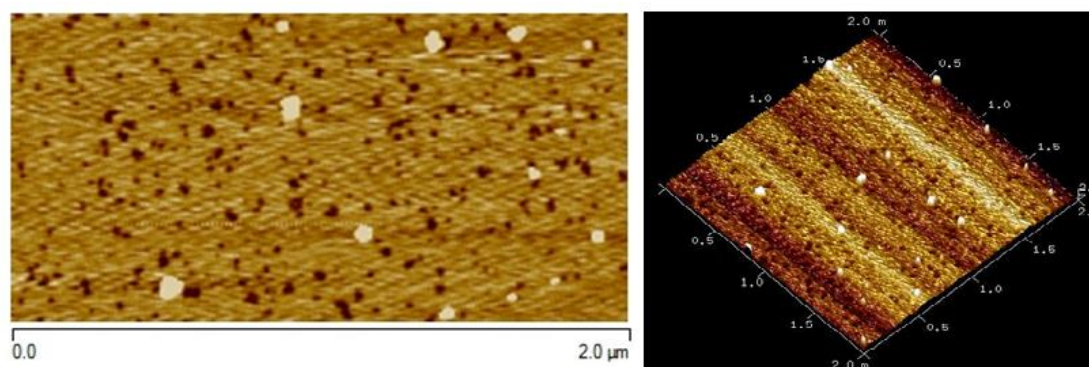


Figura 23. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F2 após diluição e *dipcoating*.

Utilizando a mesma técnica, a amostra F1.OMC foi analisada encontrando partículas de aproximadamente 200 nm e altura de 4,6 nm observado na Figura 24.

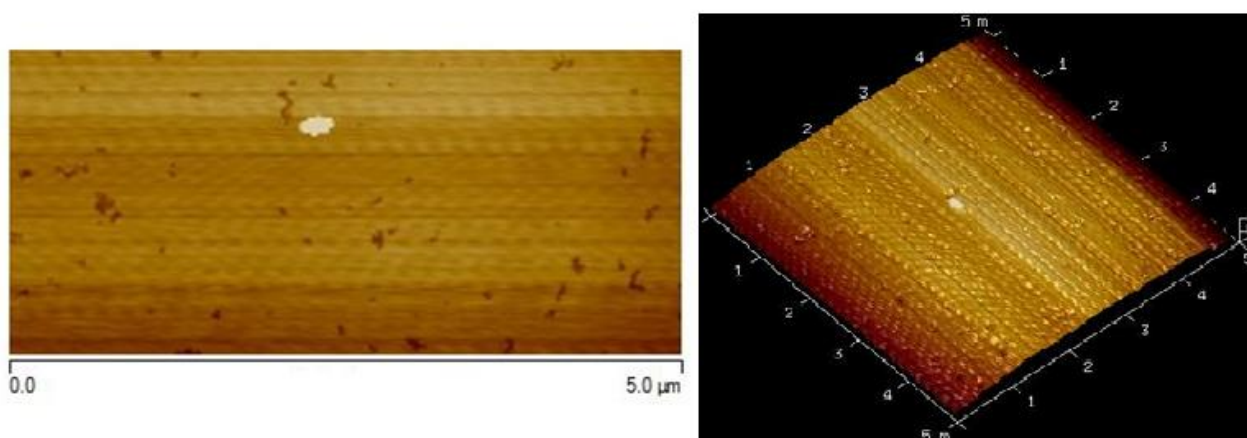


Figura 24. Fotomicrografia bidimensional e tridimensional da formulação F1.OMC após diluição e *dipcoating*.

Sabe-se que a remoção do solvente no momento de preparação da amostra pode causar alterações influenciando a forma das partículas. É necessária, portanto, a perfeita imobilização dos CLN para que seja possível a avaliação da sua morfologia pela minúscula ponta do microscópio de força atômica (SATO, 1998; MULLER *et al.*, 2000).

A baixa adesão das partículas ao substrato pode ser explicada pelo fato do mesmo ser constituído por mica, material altamente hidrofílico e carregado negativamente, não apresentando compatibilidade com as características dos CLNs desenvolvidos. Uma possibilidade de resolver esse problema é formando um filme ou uma bicamada lipídica na superfície da mica, recobrando-a com algum material que tenha mais afinidade com a matriz lipídica (LEONENKO *et al.*, 2000; STETTER *et al.*, 2015).

5.2.4.2 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilita a visualização da estrutura e organização das nanopartículas, bem como a homogeneidade da superfície e/ou rearranjo formado após a retirada da água do sistema (KOO *et al.*, 2003). As formulações F1 e F3 puderam ser analisadas apresentando aglomerados. A escala apresenta um tamanho de 1 μ m conforme observado na Figura 25.

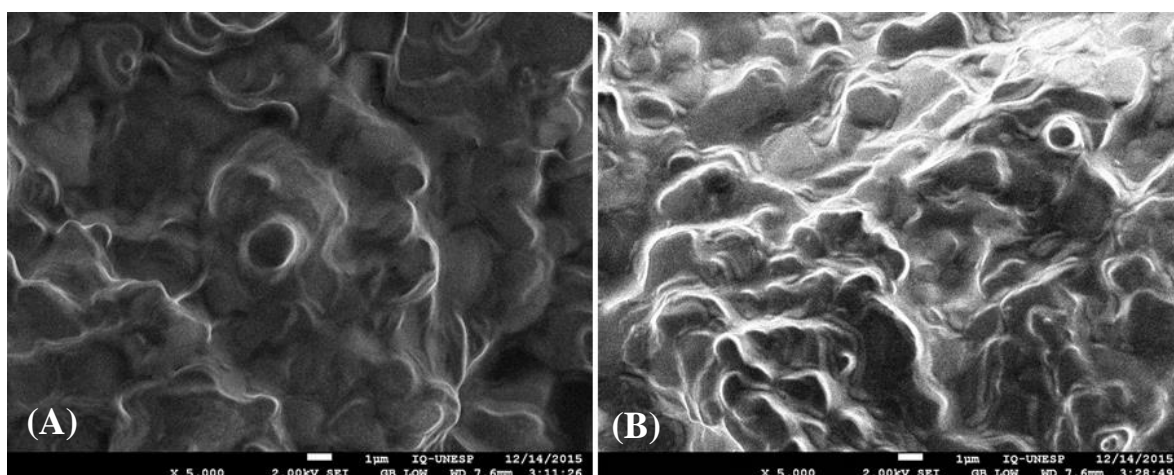


Figura 25. Fotomicrografias das formulações F1 (A) e F3 (B).

As formulações acrescidas de OMC foram analisadas e apresentaram aglomeração das nanopartículas e formação de um filme, não sendo possível analisar o tamanho das estruturas formadas. A escala apresentada tem o tamanho de 10 μ m conforme observado na Figura 26.

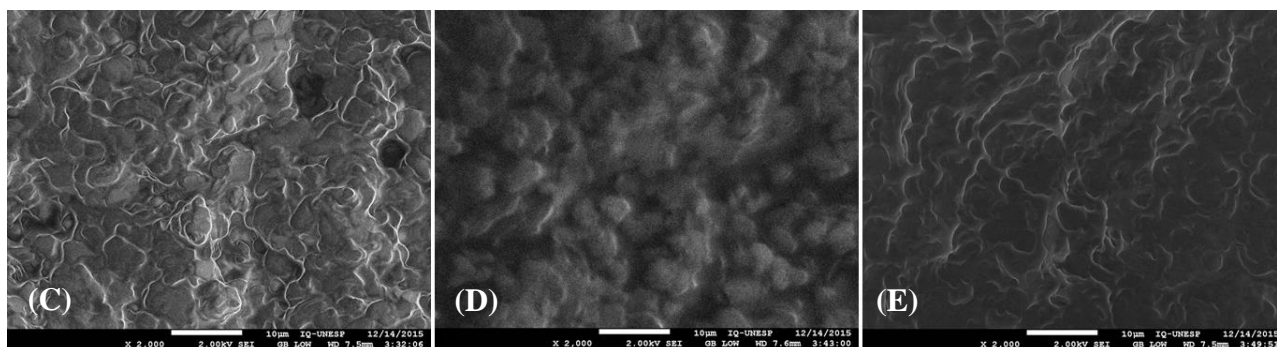


Figura 26. Fotomicrografias das formulações F1.OMC (C), F2.OMC (D) e F3.OMC (E).

Acredita-se que ao retirar toda a água da formulação há uma desestruturação do sistema havendo junção da fase oleosa e consequentemente aglomeração dos CLNs. Além disso, o feixe que incide diretamente na amostra causa imediatamente a degasagem de componentes da formulação formando furos/buracos.

Na tentativa de separar as nanopartículas, as amostras foram diluídas (1:100) em água e o processo para leitura foi repetido. Dessa forma, as formulações F2 e F2.OMC puderam ser

analisadas e além disso, foi possível captar o exato momento da degasagem dos componentes da matriz lipídica, conforme observado na Figura 27.

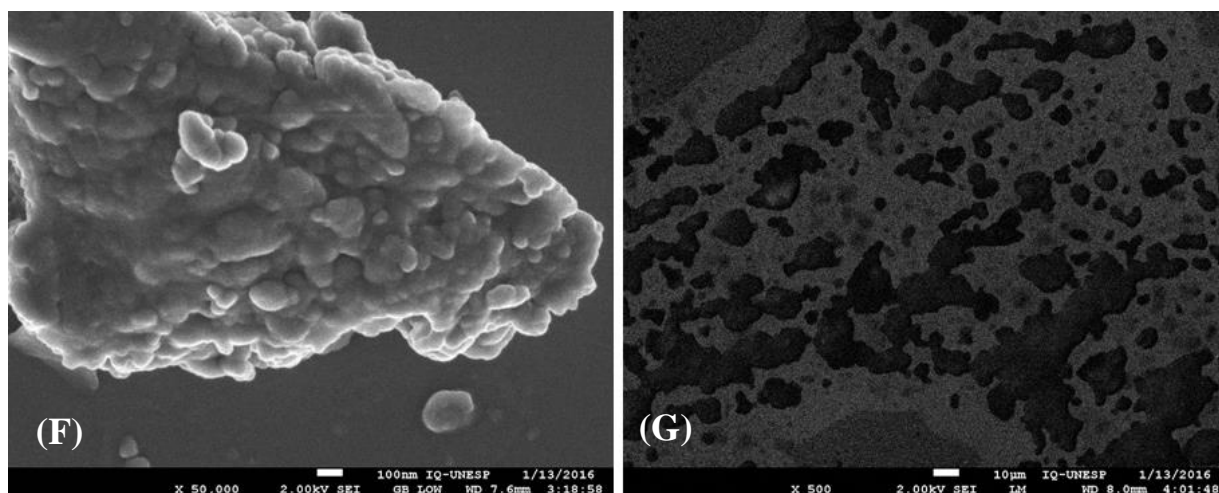


Figura 27. Fotomicrografias das formulações F2 (F) e F2.OMC (G).

5.3 Fator de proteção solar

Segundo Garcia *et al.* (1991) diferentes filtros solares orgânicos com absorção em radiação UVB, quando incorporados em diferentes formulações resultam em valores de FPS que podem ser correlacionados com a concentração do filtro solar utilizada e fornece importantes informações sobre o desenvolvimento da formulação. Sabe-se que as próprias nanopartículas podem proteger a pele da radiação UV a partir da formação de uma barreira física, conduzindo assim a um efeito sinérgico com o filtro solar adicionado (WISSING; MULLER, 2002a; CENGIZ *et al.*, 2006). O fator de proteção solar das formulações foi medido em espectrofotômetro de ultravioleta e calculado a partir da técnica de Mansur (1986). Os carreadores livres foram analisados e não apresentaram fator de proteção, portanto, não influenciam nos resultados encontrados para os CLN carregados de OMC. Uma solução de OMC 0,2 mg/mL (controle) em isopropanol também foi analisada em relação ao seu FPS encontrando valor igual a 41. Quando incorporado OMC observou-se FPS de aproximadamente 40. Os resultados encontrados em cada tempo são apresentados na tabela 9.

Tabela 8. Resultados de FPS das formulações obtidos através da técnica de Mansur (\pm DP).

Formulação	FPS			
	t1	t7	t15	t30
F1.OMC	41,0 \pm 1,73	39,6 \pm 0,57	41,3 \pm 0,57	38,0 \pm 0,00
F2.OMC	41,3 \pm 2,08	39,3 \pm 1,15	41,0 \pm 0,00	38,3 \pm 0,57
F3.OMC	40,6 \pm 1,52	39,0 \pm 1,00	41,3 \pm 0,57	38,0 \pm 0,00

Estudos utilizando a técnica de Mansur foram realizados por Santos *et al.* (1999) com OMC em loção, apresentando valor de FPS de $4,6 \pm 0,05$ quando utilizada concentração equivalente a 2,0%. Outra formulação apresentou valor de FPS de $9,9 \pm 0,01$ utilizando 4,5% de OMC. Já a concentração de 7,5% obteve resultado de FPS de $15,3 \pm 0,002$. Da mesma forma, Borghetti e Knorst (2006) encontraram resultado de FPS de $9,9 \pm 0,03$ utilizando concentração de OMC de 6,0%. Já Silva *et al.* (2013) analisaram nanoemulsões contendo OMC e obtiveram valores de $3,10 \pm 0,57$ para 1,0% de OMC, $7,47 \pm 1,05$ para 3,0% de OMC e $14,92 \pm 1,96$ para 7,0% de OMC.

Os resultados deste estudo sugerem que a inclusão do OMC, na concentração de 1%, em CLN apresentou valores de FPS maiores que os encontrados na literatura para sistemas convencionais e nanoestruturados. Esse alto valor de FPS pode ser explicado pela encapsulação do OMC aumentando a força de proteção solar da formulação e conseqüentemente sua eficácia. Resultados semelhantes foram encontrados por Nicolae *et al.* (2012), indicando que CLNs oferecem maior absorção da radiação UV em comparação com emulsões contendo filtros solares livres. Além disso, apresentam maior capacidade de absorver essa radiação quando comparadas com NLS, devido à sua estrutura menos organizada que favorece a acomodação do filtro solar na matriz lipídica. Estudos utilizando TACC em NLCs observaram maior perfil de absorção comparado com nanoemulsões. Isto acontece devido ao núcleo sólido dos carreadores capazes de espalhar e refletir a radiação UV, o que não ocorre no caso das gotículas apresentadas em nanoemulsões (SCALIA; MEZZENA, 2009).

5.4 Quantificação de OMC por UPLC

Um novo método simples e efetivo foi desenvolvido e validado seguindo as normas descritas na RDC 899 (29 de maio de 2003) para a quantificação do OMC. Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação e robustez.

Os cromatogramas obtidos são apresentados nas figuras abaixo. O branco é representado pelo solvente isopropanol, apresentado na figura 28, e o cromatograma exposto na figura 29 representa uma solução de OMC em isopropanol na concentração de 100 µg/mL.

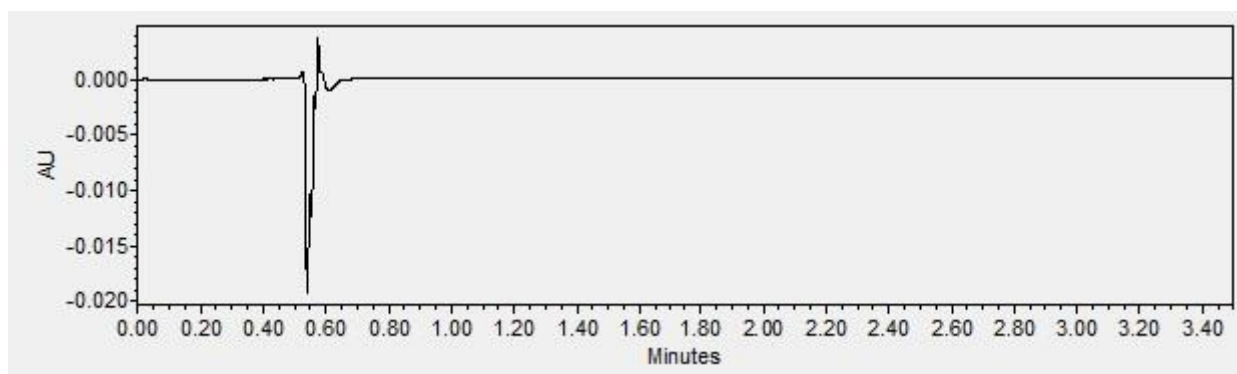


Figura 28. Cromatograma do isopropanol utilizado como branco na quantificação do OMC.

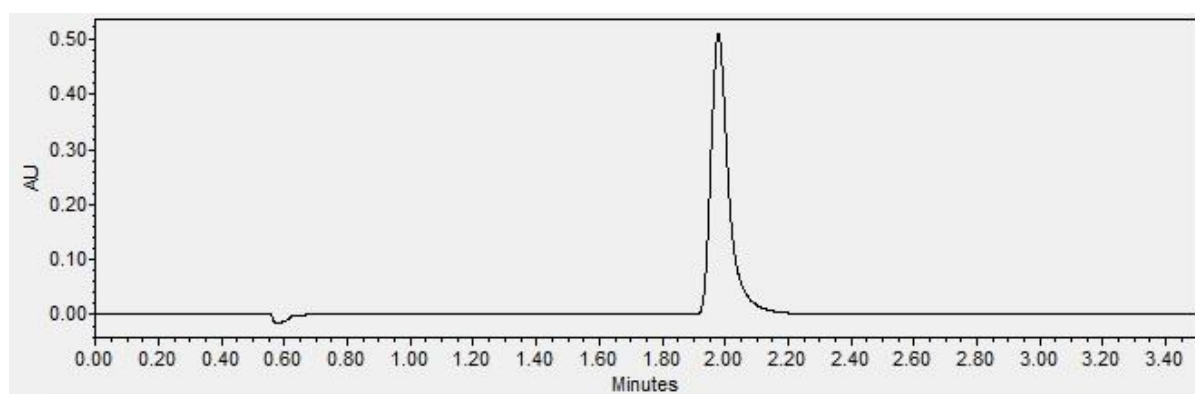


Figura 29. Cromatograma do OMC 100 µg/ml em isopropanol.

Pôde-se observar que o tempo de retenção encontrado foi de 2,0 minutos correspondendo ao pico do filtro solar OMC. Resultado aproximado foi obtido por Lee (2008) utilizando UPLC.

5.4.1 Condições cromatográficas

O sistema cromatográfico foi definido como:

- ❖ UPLC® ACQUITY Waters (H Class).
- ❖ Coluna ACQUITY UPLC® HSS C18 SB 1.8µm (2.1x100mm);
- ❖ Detector UV operando em 310 nm;
- ❖ Fase móvel 80:20 acetonitrila e água acidificada (ácido fórmico 0,1%);
- ❖ Fluxo de 0,5 mL/min;
- ❖ Tempo de corrida: 3,5 min
- ❖ Volume de injeção: 2,0 µL.

5.4.2 Validação do método analítico

5.4.2.1 Linearidade

A figura 30 apresenta as curvas analíticas obtidas a partir do método desenvolvido. A curva analítica em isopropanol foi construída utilizando 6 pontos (7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125 e 250 µg/mL) e a curva analítica em solução receptora utilizando 7 pontos (0,25; 0,5; 0,75; 1,5; 3,12; 6,25; 12,5µg/mL).

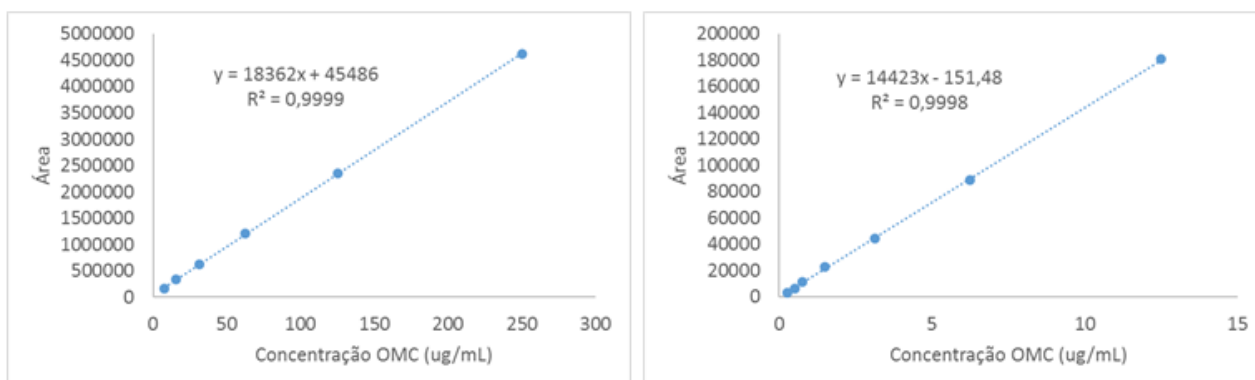


Figura 30. Curvas analíticas do OMC em isopropanol e em solução receptora, respectivamente.

5.4.2.2 Precisão e exatidão

Os controles de qualidade definidos como baixo, médio e alto foram de 15,6; 62,5 e 250 µg/mL, respectivamente, para o OMC em isopropanol. Para o OMC em solução receptora, os controles de qualidade baixo, médio e alto foram definidos como 0,5; 6,25; 12,5 µg/mL, respectivamente.

Nas tabelas 10 e 11 são apresentados os valores de precisão referentes as curvas analíticas em isopropanol e em solução receptora, respectivamente. A precisão pode ser expressa como coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (ANVISA, 2014). Os resultados de precisão e exatidão indicaram valores de CV adequados, demonstrando repetibilidade e reprodutibilidade satisfatórias para a aplicação do método.

Tabela 9. Precisão intracorrida e intercorridas em isopropanol.

Concentração teórica (µg/mL)	Intracorrida			Intercorridas	
	Coefficiente de variação (%)	Exatidão (%)	Concentração teórica (µg/mL)	Coefficiente de variação (%)	Exatidão (%)
250	0,71	99,7	200	1,04	100,9
62,5	0,27	101,0	62,5	0,18	100,4
15,6	0,38	99,6	15,6	0,40	94,3
7,8	1,35	85,0	7,8	0,97	81,1

Tabela 10. Precisão intra e inter-corridas em solução receptora.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Intracorrída		Intercorrídas		
	Coefficiente de variação (%)	Exatidão (%)	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Coefficiente de variação (%)	Exatidão (%)
12,5	3,87	100,1	10	2,97	110,9
6,25	1,16	98,3	5,0	4,29	109,9
0,5	1,20	83,7	0,5	4,75	116,9
0,25	2,94	88,1	0,25	2,76	119,2

5.4.2.3 Limites de detecção e quantificação

Segundo a Anvisa (2014) o LD é a relação de 2 ou 3 vezes o ruído da linha de base e o LQ representa a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Dessa forma, foram definidos os valores de 7,8 $\mu\text{g/mL}$ e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ como limites de quantificação (LIQ), e 3,9 $\mu\text{g/mL}$ e 0,12 $\mu\text{g/mL}$ como limites de detecção (LD) para as curvas em isopropanol e solução receptora, respectivamente.

5.4.2.4 Robustez

A robustez avalia a capacidade do método de permanecer inalterado quando ocorrem pequenas alterações nas condições cromatográficas (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014). Desta forma, os fatores podem influenciar significativamente na resposta do método. Para este estudo, as análises foram realizadas utilizando a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ em isopropanol e alterando os seguintes parâmetros: fluxo, fase móvel, pH da fase móvel, tipo da coluna e temperatura da coluna e da amostra. Os valores obtidos são mostrados na Tabela 12.

Tabela 11. Robustez do método com pequenas alterações nas condições cromatográficas.

Condições cromatográficas	Concentração (µg/mL)	Exatidão (%)	Precisão (%)
Temperatura da coluna			
22°C	198,61	99,30	0,07
26°C	198,44	99,22	0,90
Temperatura da amostra			
21°C	197,02	98,51	0,58
25°C	196,95	98,47	0,94
Fluxo			
0,4 mL/min	248,11	124,05	0,28
0,6 mL/min	163,15	81,57	0,13
Fase móvel			
78% ACN/22% H ₂ O	197,12	98,56	0,26
82% ACN/18% H ₂ O	195,89	97,94	0,18
pH fase móvel			
pH 2,8	200,80	100,40	0,32
pH 3,2	201,71	100,85	0,39
Coluna			
HSS C18 SB (2,1x50 mm)	199,99	99,99	0,32

Pode-se observar que as pequenas alterações nas condições cromatográficas demonstraram exatidão e precisão aceitáveis. Dessa forma, o método foi robusto, exceto para a alteração do fluxo para 0,4mL/min, que apresentou exatidão de 124,05%, valor acima do aceitável pelas resoluções (80-120%).

5.5 Eficiência de encapsulação

A capacidade de encapsulação é geralmente expressa pela porcentagem do ativo incorporado na fase lipídica, podendo variar bastante dependendo de fatores como solubilidade do ativo na fase lipídica, miscibilidade do ativo no lipídeo, estrutura dos lipídeos utilizados e polimorfismo dos lipídeos. Um pré-requisito para obter uma alta capacidade de encapsulação é a alta solubilidade do ativo no lipídeo fundido (MULLER *et al.*, 2000). Além disso, uma baixa capacidade de encapsulação pode ser relacionada ao pequeno tamanho das nanopartículas (GILBERT *et al.*, 2016). A eficiência de encapsulação das formulações é expressa na Tabela 8.

Tabela 12. Resultados da eficiência de encapsulação das formulações em porcentagem.

Formulações	EE (%)
F1.OMC	61
F2.OMC	60
F3.OMC	45

A maior eficiência de encapsulação foi representada pela formulação F1.OMC (61%), demonstrando maior capacidade de incorporação do OMC na matriz lipídica. Porém, através da análise estatística verificou-se que não existe diferença estatística significativa entre os valores obtidos para as formulações.

5.6 Ensaio *in vitro*

Os estudos *in vitro* são valiosos e determinam o comportamento de formulações de uso tópico. Através dos dados pode-se compreender eventos como a aplicação na pele, liberação do fármaco, permeação e retenção cutânea (NOKHODCHI *et al.*, 2003).

5.6.1 Liberação *in vitro*

A liberação de uma substância ativa pode ocorrer de forma imediata ou contínua. Os sistemas de liberação imediata apresentam um reservatório que vai liberar o conteúdo no momento da ruptura do seu envoltório. Esse rompimento pode ser por pressão mecânica ou osmótica, variação de temperatura e/ou pH ou, ainda, degradação enzimática. Já nos sistemas de liberação contínua ou sustentada, essa liberação ocorre por difusão da substância através da matriz por erosão, dissolução, degradação ou permeabilidade da matriz, também podendo ocorrer pela associação destes mecanismos (BAKAN, 1973; BRANNON-PEPPAS, 1993; LACERDA, 2009).

O estudo de liberação *in vitro* do OMC (%), representado pela Figura 31, mostrou que o OMC obteve uma liberação de 55,74% após 12 horas quando incorporado na formulação F2.OMC, representando o maior valor de OMC liberado. A formulação F3.OMC liberou 38,37% do OMC incorporado no sistema. Já a formulação F1.OMC representou a que liberou menos filtro solar, representado pelo valor de 30,57%. Portanto, a formulação contendo fosfatidilcolina de soja (F2.OMC) proporcionou maior liberação de OMC. Através da análise estatística, verificou-se que existe diferença estatística significativa entre os valores obtidos para as formulações. Em todos os casos foi observada uma liberação inicial lenta seguida por uma liberação instantânea no tempo de 4 horas. Segundo Alvarez-Roman (2001) uma taxa de difusão inicial lenta sugere que o OMC foi encapsulado e não adsorvido na superfície externa das nanopartículas.

A fosfatidilcolina de soja, como um fosfolípido, representa um emulsionante fraco e sua incorporação promete aumentar a rigidez na interface, produzir uma formulação mais estável e retardar a liberação do fármaco (PATLOLLA; VOBALABOINA, 2015; PRABHAKAR *et al.*, 2013). Porém, no presente estudo, apesar de conferir maior estabilidade ao sistema, a formulação F2.OMC permitiu maior liberação do OMC quando comparado com os outros sistemas. Já os triglicerídeos, como óleo de rícino, apresentam interação com o tensoativo por meio de ligações

hidrofóbicas, podendo diminuir a difusão do OMC e, conseqüentemente, a sua liberação (PUGLIA *et al.*, 2012).

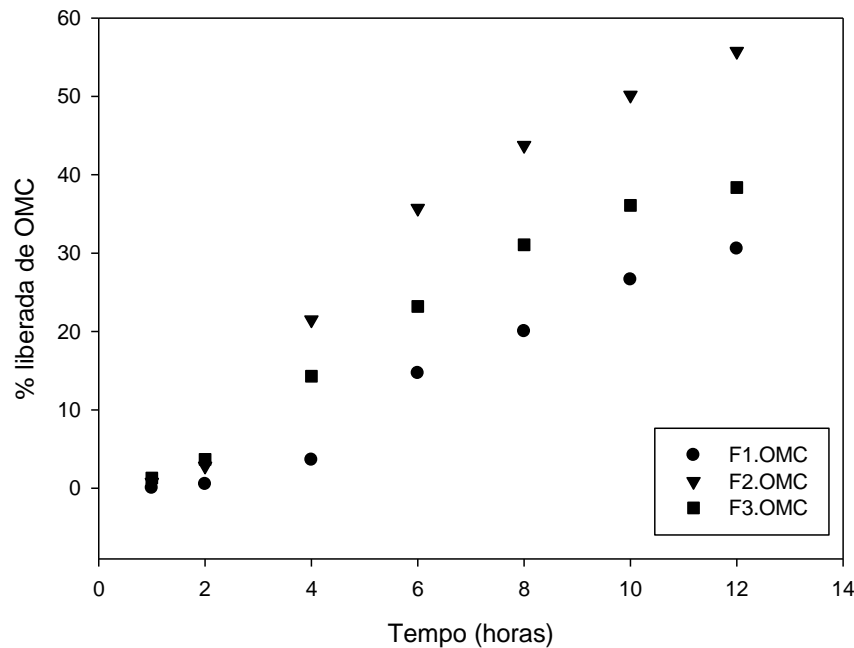


Figura 31. Perfil de liberação in vitro (%) do p-metoxicinamato de octila (OMC) incorporado em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) em três diferentes formulações (F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC) pelo período de 12 horas.

Os resultados de r^2 dos modelos matemáticos utilizados para estudar a cinética de liberação são apresentados na Tabela 13 e demonstram que todas as formulações seguem o modelo proposto por Peppas. Este modelo relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo (Equação 3) onde o mecanismo que prevalece é representado por uma combinação da difusão do ativo e do transporte (KORSMEYER; PEPPAS, 1983; LOPES, LOBO & COSTA, 2015; PAPADOPOULOU *et al.*, 2006; SIEPMANN; PEPPAS *et al.*, 2000).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n \quad (3)$$

onde: a é a constante cinética de liberação controlada, n é o expoente de liberação e M_t/M_∞ é a fração do ativo liberado ao longo do tempo.

A equação 3 apresenta a lei da potência, que pode ser aplicada para sistemas com geometrias planas, cilíndricas ou esféricas (MEDEIROS, 2013). O modelo descreve o processo de difusão do ativo a partir dos sistemas nanoestruturados. Assim, o perfil de liberação das formulações é influenciado por vários fatores, incluindo o tipo de sistema lipídico, sólido ou líquido, a polaridade e a concentração do ativo (BADEA *et al.*, 2015).

Tabela 13. Coeficiente de liberação *in vitro* do OMC obtido pelos diferentes modelos matemáticos para as formulações F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC.

Modelos matemáticos	Valor de r quadrado (r^2)		
	F1.OMC	F2.OMC	F3.OMC
Peppas	0,9838	0,9768	0,9838
Higuchi	0,8232	0,8909	0,8998
Primeira ordem	0,9519	0,9752	0,9853
Baker-Lonsdale	0,8131	0,8707	0,8868

5.6.2 Permeação e retenção cutânea *in vitro*

O estudo de permeação cutânea é importante para otimizar formulações de liberação dérmica e transdérmica (LEVEQUE *et al.*, 2003). Para formulações tópicas, no caso de filtros solares, o acúmulo na pele com permeação mínima é desejado enquanto que para formulações sistêmicas, o oposto é preferido (TOUITOU; MEIDAN; HORWITZ, 1998). O método mais comum para a avaliação da permeação cutânea *in vitro* é a utilização de células de difusão como as células de Franz. Diversos estudos confirmam o desempenho deste experimento, porém, não fornece informações sobre os efeitos do fluxo sanguíneo na permeação, uma vez que as condições de imersão *in vivo* não podem ser completamente reproduzidas (BARTOZOVA, 2012; BRAIN, 2002).

Os resultados de permeação cutânea *in vitro* são apresentados na Figura 32. A formulação F3.OMC apresentou menor permeação cutânea do OMC (18%) após 12 horas de experimento. Este resultado foi seguido pela formulação F1.OMC (35%) e por fim, pela formulação F2.OMC (37%) que apresentou a maior quantidade de OMC permeado (Figura 32).

O estudo demonstrou que, a partir da formulação inicial, a incorporação de fosfatidilcolina de soja (fosfolipídeos) aumentou a permeação cutânea do OMC, enquanto a incorporação de óleo de rícino (triglicerídeos) foi responsável pela diminuição da mesma. Além disso, os resultados demonstraram que o OMC foi capaz de penetrar na pele, apesar da sua elevada afinidade pelo estrato córneo (MONTEIRO *et al.*, 2012).

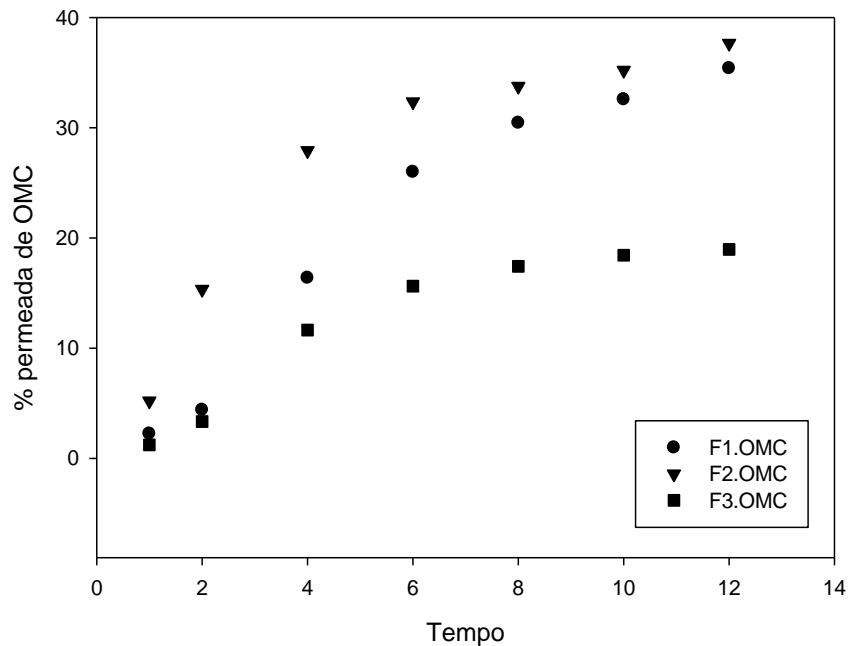


Figura 32. Permeação cutânea in vitro das formulações F1.OMC, F2.OMC e F3.OMC durante o tempo de 12 horas.

A técnica do *tape stripping* é um método simples e eficiente que permite avaliar a eficácia de formulações dermatológicas. Após realizada a aplicação e os ensaios de permeação cutânea, o estrato córneo da área de contato é retirado utilizando fitas adesivas, onde permanece retida a formulação e, esta é quantificada por métodos analíticos (LADEMANN *et al.*, 2009). O ideal é que filtros solares fiquem impregnados no estrato córneo formando uma barreira aos raios UV, sem que penetrem em tecidos mais profundos (VARVARESOU, 2005).

A determinação da quantidade retida no estrato córneo tem a vantagem de apresentar a real localização do filtro, uma vez que representa o seu local de ação. Isso acontece porque o estrato córneo pode ser separado da epiderme + derme e desse modo é possível apresentar resultados mais refinados, aplicando diversas formas de extração do fármaco nas diferentes camadas de pele. Porém, a técnica de determinação na pele total também apresenta vantagem por ser de fácil e rápida realização (ANTONIO, 2007).

Os dados de retenção cutânea são apresentados na Tabela 14. Conforme observado, a formulação que mais reteve no estrato córneo foi a F2.OMC. A formulação F1.OMC apresentou o maior valor de retenção dérmica do OMC; porém, também foi responsável pela mais baixa concentração no estrato córneo. Já a formulação F3.OMC apresentou a menor retenção dérmica. Porém, os resultados não apresentaram diferença estatística significativa.

Tabela 14. Retenção cutânea no estrato córneo e retenção dérmica das formulações (\pm DP).

Formulação	OMC retido no estrato córneo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	OMC retido na epiderme + derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%
F1.OMC	1,17 \pm 0,77	0,05	4,82 \pm 3,92	0,21
F2.OMC	3,90 \pm 2,15	0,17	3,66 \pm 3,17	0,16
F3.OMC	2,17 \pm 2,23	0,09	1,23 \pm 2,31	0,08

Acredita-se, portanto, que a formulação F2.OMC, por conter fosfatidilcolina de soja, fosfolipídio semelhante aos constituintes do estrato córneo, tenha maior afinidade com os componentes da pele promovendo maior retenção do OMC no estrato córneo e permeação cutânea quando comparada com os outros sistemas (MERTINS *et al*, 2008). Porém, todos os resultados de retenção cutânea foram considerados baixos em relação aos estimados para a retenção do filtro solar nas camadas mais externas da pele. Acredita-se, portanto, que o método de extração não tenha sido totalmente eficaz para detectar o OMC presente nestes locais.

Como perspectivas, sugere-se a realização de experimentos *in vivo*, os quais apresentariam as vantagens da geração de uma cinética sistêmica e informações sobre o metabolismo (CHIEN, 2001), além de indicar a penetração real da substância, sua distribuição e excreção (EPA, 1992), parâmetros que seriam importantes para predizer a segurança de tais formulações.

5.6.3 Citotoxicidade *in vitro*

Os valores de IC_{50} representam as concentrações de amostras necessárias para inibir 50% da proliferação celular. Apesar da biocompatibilidade das substâncias utilizadas, as células HaCaT tratadas com as formulações apresentaram resultados de IC_{50} entre 0,08 e 0,004%, evidenciando que todas as formulações desenvolvidas apresentam citotoxicidade nos valores acima aos estabelecidos pelo IC_{50} neste modelo experimental. Porém, para aplicação do sistema, os nanocarreadores serão incorporados em hidrogéis biocompatíveis, não sendo, portanto, utilizados nas concentrações empregadas nos ensaios.

Tabela 15. Valores de IC_{50} para células HaCat tratadas com as formulações.

Formulações	IC_{50} (%)
F1	0,08
F2	0,03
F3	0,04
F1.OMC	0,012
F2.OMC	0,04
F3.OMC	0,025

Resultados e Discussão

Segundo os resultados, apresentados na Figura 33, as formulações foram diluídas pelo menos 4 vezes para que pudessem ser encontrados valores responsáveis por uma menor porcentagem de morte celular. Os dados mostram as diluições realizadas e as concentrações testadas até ser encontrado o valor de IC₅₀ de cada formulação.

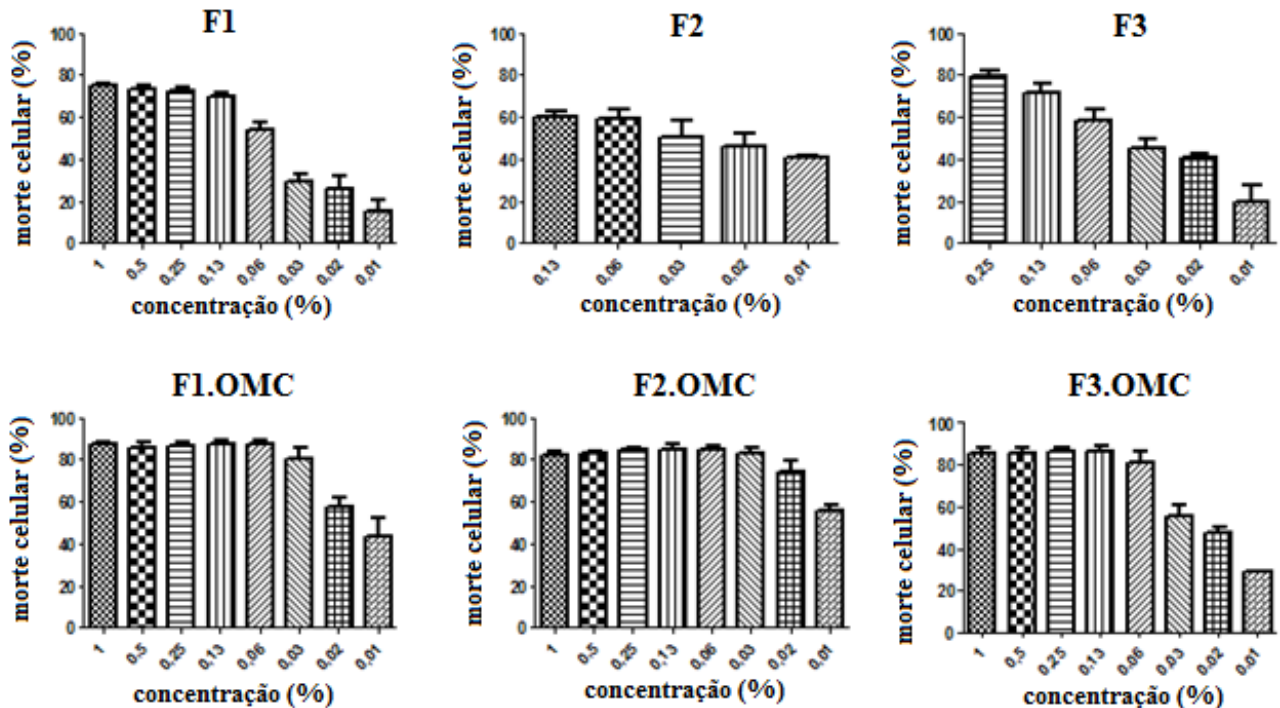


Figura 33. Ensaio de viabilidade em células HaCaT após o tratamento com diferentes concentrações de OMC.

Os resultados de toxicidade podem estar relacionados à limitação da técnica de ensaios *in vitro*, uma vez que quando as formulações entraram em contato com o meio de cultura ocorreu o aumento da viscosidade do meio, o que provavelmente acarretou a redução de trocas gasosas entre célula e ambiente. Por fim, sugere-se que demais testes de citotoxicidade sejam realizados com a intenção de comprovar e reavaliar as formulações em questão.

6. CONCLUSÃO

- ❖ Os sistemas foram obtidos com sucesso uma vez que o OMC foi incorporado nos carreadores lipídicos nanoestruturados nas três formulações desenvolvidas.
- ❖ O método desenvolvido analítico atendeu aos requisitos necessários para ser aplicado na quantificação do filtro solar em questão, sendo linear, preciso, exato e sensível.
- ❖ Sugere-se a determinação do fator de proteção solar e da citotoxicidade *in vitro* através de outras técnicas, com a intenção de confirmar os resultados obtidos.
- ❖ Nos ensaios *in vitro*, a formulação F1.OMC obteve o menor valor de liberação do filtro solar. A formulação F2.OMC, sistema acrescido de fosfatidilcolina de soja, obteve maior liberação, permeação e retenção cutânea. E, por fim, a formulação F3.OMC, sistema acrescido de óleo de rícino, apresentou o menor valor de permeação cutânea.
- ❖ Conclui-se, portanto, que a formulação F3.OMC apresenta potencial aplicação para incorporação de OMC objetivando seu uso em formulações fotoprotetoras.

REFERÊNCIAS

- AGAYAN, R.R. et al. Optical manipulation of metal-silica hybrid nanoparticles. **Proc. of SPIE**, v. 5514, p. 502-513, 2004.
- ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R. H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 191-195, set. 2001.
- ALVES E SILVA, A.R. **Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos deftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas**. 123 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Resolução RDC N° 30, DE 1 DE JUNHO DE 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF: ANVISA, 2012. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030_01_06_2012.pdf. Acesso em: 3 de nov. 2012.
- AXELSTAD, M.; BOBERG, J.; HOUGAARD, K. S.; CHRISTIANSEN, S.; JACOBSEN, P. R.; MANDRUP, K. R.; NELLEMAN, C. Effects of pre- and postnatal exposure to the UV-filter OctylMethoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 250, p. 278-290, 2010.
- AZZINI, R. G. **Desenvolvimento e avaliação “in vitro” e “in vivo” de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**. São Paulo, 1999. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1999.
- BACH, A. C.; BABAYAN, K. Medium-chain triglycerides: an update. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 36, n. 5, p. 950–962, 1982.
- BADEA, G.; LACATUSU, I.; OTT, C.; BADEA, N.; GRAFU, I.; MEGHEA, A. Integrative approach in prevention and therapy of basal cellular carcinoma by association of three actives loaded into lipid nanocarriers. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 147, p. 1–8. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.03.007
- BAILLO, V. P.; LIMA, A. C. Nanotecnologia aplicada à fotoproteção. **Nanotechnology Applied to Photoprotection**, v. 93, n. 3, p. 271–278, 2012.
- BECKER, L. C.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; HILL, R. A.; KLAASSEN, C. D.; MARKS JR, J. G.; ANDERSEN, A. Final Report of the Amended Safety Assessment of Myristic Acid and Its Salts and Esters as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 1625–1865, 2010. doi:TO1177/I091581810374127
- BELOQUI, A.; SOLINÍS, M. Á.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; ALMEIDA, A. J.; PRÉAT, V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–61, 2016. doi:10.1016/j.nano.2015.09.004
- BROWN, H.; WILLIAMS, J.; KIRWAN, M. Packaged Product Quality and Shelf Life. In: COLES, R.; KIRWAN, M. (Ed.). **Food and Beverage Packaging Technology**, 2nd.ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2011.
- BRULS, W.A.G; SLAPER, H.; VAN DER LEUN, J.C.; BERRENS, L. Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. **Photochemistry and Photobiology**, v.40, p. 485, 1984.
- BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S. A. T. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35 n. 9, p. 1827-1840, 2012.
- CABRAL, L. D. S.; PEREIRA, S. O.; PARTATA, A. K. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v. 4, n. 3, jul. 2011.
- CENGIZ, E.; WISSING, S.A.; MULLER, R.H.; YAZAN, Y. Sunblocking efficiency of various TiO₂-loaded solid lipid nanoparticle formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, p.371–378, 2006.

Referências Bibliográficas

- CHEN, H. B.; CHANG, X. L.; DU, D. R.; LIU, W.; LIU, J.; WENG, T.; YANG, Y. J.; ET AL. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting, **Journal of Controlled Release**, v. 110, n.2, p. 296-306, 2006.
- CHISVERT, A.; LEÓN-GONZÁLEZ, Z.; TARAZONA, I.; SALVADOR, A.; GIOKAS, D. An overview of the analytical methods for the determination of organic ultraviolet filters in biological fluids and tissues. **Analytica Chimica Acta**, v. 752, p. 11-29, 2012.
- CHISVERT, A.; PASCUAL-MART, M. C.; SALVADOR, A. Determination of the UV filters worldwide authorised in sunscreens by high-performance liquid chromatography Use of cyclodextrins as mobile phase modifier. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 207-215, 2001.
- CHORILLI, M. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo**, 2007. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Disponível em: <<http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>>. Acesso em: 5 de maio de 2014.
- CORREA, M.P. **Índice ultravioleta: avaliações e aplicações**. 2003. 217f. Tese (Doutorado em Ciências Atmosféricas) Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2003.
- DEBUYS, H. V.; LEVY, S. B.; MURRAY, J. C.; MADEY, D. L.; PINNELL, S. R. Modern Approaches To Photoprotection. **Dermatologic Clinics**, v. 18, n. 4, p. 577-590, out. 2000.
- DÉVÉHAT, F.L.; LEGOUINA, B.; COUTEAUB, C.; BOUSTIEA, J.; COIFFARDB, L. Lichenic extracts and metabolites as UV filters. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.120, p.17-28, 2013.
- DI SALVO, R.M. Controlando o Surgimento da Celulite. **Cosmetics & Toiletries**, (ed. Port.), v. 8, n. 4, p. 56-62, 1996.
- DRAELOS, Z. D. Compliance and Sunscreens. **Dermatologic Clinics**, v. 24, p. 101-104, 2006.
- DUARTE, R.A. **Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR7531) tratadas com alcalóides isolados de Pterogyne nitens**. 2010. 153f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2010.
- DUMMER R, MAIER T. UV protection and skin cancer. **Recent Results Cancer Research**, v. 160, p. 7-12, 2002.
- R. DUNCAN, R. GASPAR, Nanomedicine(s) under the microscope, **Molecular Pharmacology**, v. 8, p. 2101 – 2141, 2011.
- EMAZE. Amazing Presentations. FETEC. Disponível em: [https://www.emaze.com/@AOQWWTFL/FETEC-\(1\).pptx](https://www.emaze.com/@AOQWWTFL/FETEC-(1).pptx). Acesso em: 6 de maio de 2016.
- FERREIRA, V. S.; JÚNIOR, J. B. G.; OLIVEIRA, C. M. S. C.; TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L.; TRINDADE, M. A. G. Voltammetric analysis of sun-block preparations containing octocrylene and its association with 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyl methoxycinnamate. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 378–383, 2013. doi:10.1016/j.microc.2012.10.002.
- GHERCA, D.; PUI, A.; CORNEI, N.; et al. Synthesis, characterization and magnetic properties of MFe₂O₄ (M=Co, Mg, Mn, Ni) nanoparticles using ricin oil as capping agent. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 22, p. 3906–3911, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304885312005409>>. Acesso em: 4 de dezembro de 2015.
- GRIFFIN, W. C. Classification of surface active agents by HLB. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311–326, 1949.

Referências Bibliográficas

- GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 6, p. 614–26, 2008. doi:10.1016/j.clindermatol.2007.09.010
- HELGASON, T.; AWAD, T. S.; KRISTBERGSSON, K.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN), **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 334, n. 1, p. 75-81, 2009.
- HERZOG, B.; WEHRLE, M.; QUASS, K. Photostability of UV Absorber Systems in Sunscreens. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 869–878, 2009.
- HIPPALGAONKAR, K.; MAJUMDAR, S.; KANSARA, V. Injectable lipid emulsions-advancements, opportunities and challenges **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 1526–1540, 2010.
- HUNTER, J.; EDDY, C.R. Dielectric properties of some long-chain esters in the solid state. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 44, 6, p. 341-413, 1967.
- HUONG, S. P.; ANDRIEU, V.; BUN, H.; REYNIER, J.; ROCHER, E.; FOURNERON, J. The photoisomerization of the sunscreen ethylhexyl *p*-methoxycinnamate and its influence on the sun protection factor. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 186, n. 1, p. 65-70, 2007.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Câncer de Pele**. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/acoef/programa-nacional-de-combate-ao-cancer-da-pele/> Acesso em: 6/5/2016.
- JANJUA, N.R.; MOGENSEN, B.; ANDERSSON, A. M.; PETERSEN, J. H.; HENRIKSEN, M.; SKAKKEBAEK, N. E.; WULF, H. C. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octylmethoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after wholebody topical application and reproductive hormone levels in humans. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, p. 57–61, 2004.
- JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octylmethoxycinnamate. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 272, n. 1-2, p. 45-55, 2004.
- JONES, S. E.; SARAIYA, M.; MIYAMOTO, J.; BERKOWITZ, Z. Trends in sunscreen use among U.S. High School Students: 1999-2009. **Journal of Adolescent Health**, v. 50, p. 304-307, 2012.
- KARAGEORGOU, E.; SAMANIDOU, V. Youden test application in robustness assays during method validation. **Journal of chromatography. A**, v. 1353, p. 131–9, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967314001320>>. Acesso em: 7/12/2015.
- KIKUCHI, A.; YAGI, M. Direct observation of the intermolecular triplet–triplet energy transfer from UV-A absorber 4-tert-butyl-40-methoxydibenzoylmethane to UV-B absorber octylmethoxycinnamate. **Chemical Physics Letters**, v. 513, p. 63-66, 2011.
- KOCKLER, J.; OELGEMÖLLER, M.; ROBERTSON, S.; GLASS, B.D. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 91-110, mar. 2012.
- KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.
- KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 6, p. 937-958, jun. 2005.
- LACATUSU, I.; BADEA, N.; MURARIU, A.; MEGHEA, A. The encapsulation effect of UV molecular absorbers into biocompatible lipid nanoparticles. **Nanoscale Res. Lett**, v. 6, p. 73, 2011.
- LACERDA, S.P. **Carreador lipídico nanoestruturado à base de cera de carnauba: desenvolvimento, caracterização e uso na encapsulação de benzofenona-3**. 2009. 188f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Ciências Farmacêuticas, 2009.

Referências Bibliográficas

- LACY, K.; ALWAN, W. Skin cancer. **Medicine**, v.41, p.402-405, 2013.
- LEE, S.; JEONG, H.; CHANG, I. H. S. Determination and validation of six sunscreen agents in sun care products by UPLC and HPLC. **Journal of Cosmetic Science**, v. 59, n. December, p. 469–480, 2008.
- LENGRUBER, R.; VOLPATO, N. M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida e ação dos tensoativos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 164-172, 2002.
- LEONARDI, G.R. Cosmetologia Aplicada. São Paulo: Medfarma, 2004. p. 13-186.
- LEONENKO, Z.; CARNINI, A.; CRAMB, D. Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1509, n. 1-2, p. 131–147, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273600002881>>. Acesso em: 4/12/2015.
- LIM, S. J. et al. Altered chemical and biological activities of all-*trans* retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 53–61, 2004.
- LIN, X.; LI, X.; ZHENG, L.; YU, L.; ZHANG, Q.; LIU, W. Preparation and characterization of monocaprato nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 311, n. 1-3, p. 106–111, 2007. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.06.003
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.
- MANCEBO, S. E., HU, J. Y., & WANG, S. Q. Sunscreens: a review of health benefits, regulations, and controversies. **Dermatologic Clinics**, 32(3), 427–38, 2014. x. doi:10.1016/j.det.2014.03.011
- MANSUR J. S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.61, n.4, p.121-124, 1986.
- MARCATO, P.D.; CAVERZAN, J.; ROSSI-BERGMANN, B.; PINTO, E.F.; MACHADO, D.; SILVA, R.A.; JUSTO, G.Z.; FERREIRA, C.V.; DURÁN, N. Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreen. Biological effects and skin permeation. **Journal of Nanoscience Nanotechnology** v. 11, n. 3, p. 1880–1886, 2011.
- MARTEN, B., PFEUFFER, M., & SCHREZENMEIR, J. (2006). Medium-chain triglycerides. **International Dairy Journal**, 16(11), 1374–1382. doi:10.1016/j.idairyj.2006.06.015
- MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 298-308, 2004.
- MEDEIROS, G. R. **Modelagem matemática da liberação de compostos hidrofílicos incorporados por dupla emulsão em micropartículas de PLGA**. 2013. 99f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, 2013.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advance Drug Delivery Review**, v. 47, n. 2-3, pag. 165-96, 2001.
- MERTINS, O.; SEBEN, M.; HENRIQUE SCHNEIDER, P.; POHLMANN, A. R.; SILVEIRA, N. P. DA. Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de ¹H e de ³¹P. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1856–1859, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000700043&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 27 de novembro de 2015.
- MESTRES, J.; DURACHER, L.; BAUX, C.; VIAN, L.; MARTI-MESTRES, G. Benzophenone-3 entrapped in solid lipid microspheres: formulation and in vitro skin evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, n. 1-2, p. 1–7, 2010. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.07.028
- MONTEIRO, E. O. Filtros solares e fotoproteção. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 5–18, 2010.
- MONTEIRO, M. S. S. B.; et al. Evaluation of octyl p-methoxycinnamate included in liposomes and cyclodextrins in anti-solar preparations: preparations, characterizations and in vitro penetration studies. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p.3045-3058, 2012.

Referências Bibliográficas

- MONTENEGRO, L.; LAI, F.; OFFERTA, A.; SARPIETRO, M. G.; MICICCHÈ, L.; MACCIONI, A. M.; FADDA, A. M. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 100–112, 2015. doi:10.1016/j.jddst.2015.10.003
- MONTENEGRO, L.; SARPIETRO, M. G.; OTTIMO, S.; PUGLISI, G.; CASTELLI, F. Differential scanning calorimetry studies on sunscreen loaded solid lipid nanoparticles prepared by the phase inversion temperature method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, n. 1-2, p. 301–6, 2011. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.076
- MORAIS, S. F. A.; SILVA, M. G. A. DA; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R. Colloids based on gold nanoparticles dispersed in castor oil: Synthesis parameters and the effect of the free fatty acid content. **Comptes Rendus Chimie**, v. 18, n. 4, p. 410–421, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631074814001921>>. Acesso em: 4/12/2015.
- MÜLLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.
- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. 131-155, 2002.
- MÜLLER, R.H.; PETERSEN, R.D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, n.6, p.522-530, 2007.
- MÜLLER, R.H.; SHEGOKAR, R.; KECK, C.M. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. **Current Drug Discovery Technologies**, v.8, n.3, p.207-227, 2011.
- NAIR, B. Final report on the safety assesment of cetyl esters. **International Journal of Toxicology**, v. 16, n.1, p.123-130, 1997.
- NICULAE, G.; LACATUSU, I.; BADEA, N.; MEGHEA, A. Lipid nanoparticles based on butyl-methoxydibenzoylmethane: in vitro UVA blocking effect. **Nanotechnology**, v. 23, n.31, 315704, 2012. doi:10.1088/0957-4484/23/31/315704.
- NIKOLIĆ, S.; KECK, C. M.; ANSELMI, C.; MÜLLER, R. H. Skin photoprotection improvement: Synergistic interaction between lipid nanoparticles and organic UV filters. **International Journal of Pharmaceutics**, 414(1-2), 276–284, 2011. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.010.
- OLIVEIRA, D. N.; DELAFIORI, J.; FERREIRA, M. S.; CATHARINO, R. R. In vitro evaluation of Sun Protection Factor and stability of commercial sunscreens using mass spectrometry. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 988, p. 13–9, 2015. doi:10.1016/j.jchromb.2015.02.018
- OMS. Organização Mundial da Saúde. **Ultravioletradiation**. Disponível em: <http://www.who.int/uv/en/> Acesso em: 5 de agosto de 2013.
- PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MASCHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 44-50, 2006.
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MUELLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**. n. 366, p.170–184, 2009.
- PATTANAARGSON, S.; LIMPHONG, P. Stability of octylmethoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 23, n. 3, p. 153–160, jun. 2001.
- PATLOLLA RR, VOBALABOINA V. Pharmacokinetics and tissue distribution of etoposide delivered in parenteral emulsion. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.94, p.437–445, 2005.

Referências Bibliográficas

- PENG, L.; WANG, B. C.; REN, P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.45, p.108-111, 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-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, n. 1-2, p. 37-45, out. 2002.
- PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, Biologia Geral e Biologia da Pele**. São Paulo: Ed. Andrei, 1998. p. 39-43.
- PRABHAKAR, K.; AFZAL, S. M.; SURENDER, G.; KISHAN, V. Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 5, p. 345–353, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383513000774>>. Acesso em: 7/12/2015.
- PRADO, A. H. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido-cristalinos contendo p-metoxicinamato de octila: uma avaliação da permeação e retenção cutânea in vitro**. 2013. 62f. Iniciação Científica (FAPESP) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2013.
- PRESTON, J. Pearlescent shampoo. 1984. **Google Patents**. Retrieved from <https://www.google.com/patents/US4438096>
- PRIMO, F.L.; BENTLEY, M.V.L.B.; TEDESCO, A.C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of foscan /nanoemulsion (NE) applicable to PDT skin cancer treatment. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.8, p.340-347, 2008.
- PUGLIA, C.; BONINA, F.; RIZZA, L.; BLASI, P.; SCHOUBBEN, A.; PERROTTA, R.; TARICO M.S.; DAMIANI, E. Lipid nanoparticles as carrier for octyl-methoxycinnamate: in vitro percutaneous absorption and photostability studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 1, p. 301–311, jan. 2012.
- PUGLIA, C.; DAMIANI, E.; OFFERTA, A.; RIZZA, L.; TIRENDI, G. G.; TARICO, M. S.; PERROTTA, R. E. Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: characterization, in vitro penetration and photostability studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v.51,p.211–217, 2014. doi:10.1016/j.ejps.2013.09.023
- ROSA, F.S.; TEDESCO, A.C.; LOPEZ, R.F.V.; PIERRE, M.B.R.; LANGE, N.; ROTTA, J.C.G.; MARCHETTI, J.M.; BENTLEY, M.V.L.B. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v.89, n.2, p.261-269, 2003.
- SANAD, R.A.; ABDELMALAK, N.S.; ELBAYOOMY, T.S.; BADAWI, A.A. Formulation of a novel oxybenzone-Loaded nanostructured lipid carriers (NLCs). **AAPS PharmSciTech**. v. 4, p. 1684–1694, 2010.
- SANTANA, M.H.A.; MARTINS, F.; ALVES, G.P. Nanotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos. **Revista FÁRMACOS & MEDICAMENTOS**, v. 1, p. 44–50, 2008.
- SANTOS, E.; FREITAS, Z.; SOUZA, K.; GARCIA, S. 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, F. K. **Desenvolvimento e caracterização de carreadores lipídios nanoestruturados contendo praziquantel**. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Paulista, 2011.
- SAPRA, M.; PAWAR, A. A.; VENKATARAMAN, C. A single-step aerosol process for in-situ surface modification of nanoparticles: Preparation of stable aqueous nanoparticle suspensions. **Journal of colloid and interface science**, v. 464, p. 167–174, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979715303295>>. Acesso em: 30 de novembro de 2015.
- SATO, K. Crystallization of fats and fatty acids, In: GARTI, K.(Eds.). **Crystal- lization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids**. Surfactant Science Series. New York: Marcel Dekker, 1988. p. 267–303.

Referências Bibliográficas

- SCALIA, S.; M. MEZZENA. Incorporation in lipid microparticles of the UVA filter, butyl methoxydibenzoylmethane combined with the UVB filter, octocrylene: Effect on photostability. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, p. 384–390, 2009.
- SCHALKA, S.; REIS, V.M.S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n.3, 507–515, 2011.
- SCHLUMPF, M.; KYPKE, K.; VÖKT, C. C.; BIRCHLER, M.; DURRER, S.; FAASS, O.; EHNES, C.; FUETSCH, M.; GAILLE, C.; HENSELER, M.; HOFKAMP, L.; MAERKEL, K.; REOLON, S.; ZENKER, A.; TIMMS, B.; TRESGUERRES, J. A. F.; LICHTENSTEIGER, W. Endocrine active UV filters: developmental toxicity and exposure through breast milk. **Chimia Internacional Journal for Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 345-351, maio. 2008.
- SEVERINO, P.; PINHO, S. C.; SOUTO, E. B.; SANTANA, M. H. A. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 125-130, 2011.
- SHAHZAD, Y.; LOUW, R.; GERBER, M.; DU PLESSIS, J. Breaching the skin barrier through temperature modulations. **Journal of Controlled Release**, v. 202, p. 1 – 13, 2015.
- SHI, L.; SHAN, J.; JU, Y.; AIKENS, P.; PRUD'HOMME, R. K. Nanoparticles as delivery vehicles for sunscreen agents. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 396, p. 122-129, 2012.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Review**, v. 48, p. 139-157, 2001.
- SILVA, F. F. F.; RICCI-JÚNIOR, E.; MANSUR, C. R. E. Nanoemulsions containing octyl methoxycinnamate and solid particles of TiO₂: preparation, characterization and in vitro evaluation of the solar protection factor. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.39, n.9, p. 1378–88, 2013. doi:10.3109/03639045.2012.718787
- SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v.34, p.1762-1769, 2011.
- STETTER, F. W. S.; HYUN, S.-H.; BRANDER, S.; et al. Nanomechanical characterization of lipid bilayers with AFM-based methods. **Polymer**, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386115303943>>. Acesso em: 4/12/2015.
- TEERANACHAIDEEKUL, V.; BOONME, P.; SOUTO, E. B.; MUELLER, R. H.; JUNYAPRASERT, V. B. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC, **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 2, p. 134-141, 2008.
- TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, 56(1-3), 7–21, 1998. doi:10.1016/S0168-3659(98)00060-1
- VIGLIOGLIA, P.A. **Cosmiatria II**. Buenos Aires: Americana de Publicaciones, 1989. p. 303-313.
- VILELA, F. M. P.; FONSECA, Y. M.; JABOR, J. R.; VICENTINI, F. T. M. C.; FONSECA, M. J. V. Effect of ultraviolet filters on skin superoxide dismutase activity in hairless mice after a single dose of ultraviolet radiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 387-392, 2012.
- VELASCO, M. V.; BALOGH, T.; PEDRIALI, C.; SARRUF, F.; PINTO, C. A. S.; KANEKO, T.; BABY, A. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) – revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p. 27–34, 2011.
- WADE, A.; WELLER, P. J. (Ed.). **Handbook of pharmaceutical excipients**. 2nd. ed. London: The Pharmaceutical Press, 1994. p. 375-378, 448-450.
- WANG, J.-J.; LIU, K.-S.; SUNG, K. C.; TSAI, C.-Y.; FANG, J.-Y. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v.

Referências Bibliográficas

38, n. 2, p. 138–146, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098709001845>>. Acesso em: 5 de novembro de 2015.

WENDER, H.; DE OLIVEIRA, L. F.; FEIL, A. F.; et al. Synthesis of gold nanoparticles in a biocompatible fluid from sputtering deposition onto castor oil. **Chemical communications** (Cambridge, England), v. 46, n. 37, p. 7019–21, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20737077>>. Acesso em: 9 de dezembro de 2015.

WESTESEN, K.; BUNJES, H. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 115, n. 1, p. 129–131, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517394003478>>. Acesso em: 3/12/2015.

WHARTON, M.; GEARY, M.; O'CONNOR, N.; MURPHY, B. A rapid High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) method for the simultaneous determination of seven UV filters found in sunscreen and cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 2, p. 164–70, 2011. doi:10.1111/j.1468-2494.2010.00607.x

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration, **Journal of Controlled Release**, v. 81, n. 3, p. 225–233, jun. 2002.

WU, X.; WYMAN, I.; ZHANG, G.; et al. Preparation of superamphiphobic polymer-based coatings via spray- and dip-coating strategies. **Progress in Organic Coatings**, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300944015300771>>. Acesso em: 13/10/2015.

YAMAMOTO, T.; KURASAWA, M.; HATTORI, T.; MAEDA, T.; NAKANO, H.; SASAKI, H. Relationship between expression of tight junction-related molecules and perturbed epidermal barrier function in UVB-irradiated hairless mice. **Archives of Dermatologic Research**, v. 300, n. 2, p. 61–68, 2008.

ZAHID HUSSAIN, M.; KHAN, R.; ALI, R.; KHAN, Y. Optical properties of laser ablated ZnO nanoparticles prepared with Tween-80. **Materials Letters**, v. 122, p. 147–150, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X14002341>>. Acesso em: 7/12/2015.

ZAMBON, A.P.L.B. **Influência da associação de filtros solares sobre a estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea do p-metoxicinamato de octila em formulações fotoprotetoras**. 2011. 102f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. 2011.