

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de
benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana

NATALY MACHADO SIQUEIRA

PORTO ALEGRE, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de
benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana

Dissertação apresentada por **Nataly Machado
Siqueira** para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 15.04.2008, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Adriana Raffin Pohlmann
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Nádyá Pesce da Silveira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck
Universidade Federal de Santa Maria

S618d Siqueira, Nataly Machado
Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana / Nataly Machado Siqueira – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xxii, 106 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Benzofenona-3. 2. Penetração cutânea. 3. Nanocápsulas. 4. Quitosana. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. II. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, e contou com apoio financeiro da Rede Nanocosméticos MCT/CNPq e CAPES.

Aos meus pais, Ronaldo e Érica, e à maninha, Lissa.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Sílvia Guterres, pela oportunidade ímpar em participar de seu grupo de pesquisa. Obrigada pela confiança, orientação e amizade. À Prof^a. Adriana Pohlmann, pelas fantásticas aulas, incentivo, amizade e paciência.

Aos meus pais, Ronaldo e Érica, e minha irmã, Lissa, pela força e incentivo em todos os momentos, carinho, compreensão, confiança e por estarem sempre por perto, apesar da distância. À minha família gaúcha, Vó Eufrázia, Tia Marilena e Tio Élio, pelo incentivo e por me acolherem sempre com muito carinho; e minha família maranhense, Dim, Vó Teresinha e Tio Marco, pelo carinho, força e incentivo.

Aos meus colegas de laboratório: Letícia Colomé, Letícia Cruz, Franceline Reynaud, Renata Raffin, Alessandra Badejo, Scheila Schaffazik, Lali Ronsoni, Gislane Domingues, Bibiana Araújo, Vitória Berg, Sandra Haas, Daniela Conrado, Cristófer Faria, Cristiane, Laura Oliveira, Flávia Uchoa, Denise Jornada, Cristiane Hoffmeister, Ludmila Pinheiro, Ângelo Zanotto, Thatiana Terroso, Bruna Donida, Evelise Assumpção, Manuel Ortiz, Irene Kulkamp, Ana Luísa Maurer, Marta Alves, Valéria Weiss, Daniel Fasolo, Michele Fraga e Giovanni Zorzi, por todo apoio e companheirismo ao longo destes dois anos. Em especial, aos “nano-colegas” Karina Paese, Manuela França, Eliézer Jäger, Alessandro Jäger, Fernanda Poletto, Letícia Sias, Renata Contri, Luana Fiel e Cris Venturini e aos “PK’s”, Rodrigo Freddo, Moacyr Kaiser, Fran Johansson, Patrícia Severino, Cândice Filippi, Clarissa Bettoni e Leandro Tasso. Muito obrigada por todo apoio, pelos inesquecíveis momentos de descontração, pela companhia e, principalmente, por nossa amizade.

Às amigas Giovanna Bergamini e Karina Paese, e ao amigo Murilo Vianna, pela força, pela eterna amizade, companhia e pelos bons momentos.

Ao Abatedouro Araldi (Nova Roma do Sul – RS), pela gentileza em ceder a pele suína, ferramenta fundamental na condução deste trabalho.

À Rede Nanocosméticos MCT/CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro que permitiu o desenvolvimento deste projeto.

À UFRGS e ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade na construção do meu conhecimento.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
2 OBJETIVOS	6
2.1 Geral	8
2.2 Específicos	8
3 REVISÃO DE LITERATURA	9
3.1 Fotoproteção e cuidados com a pele	11
3.2 Benzofenona-3	16
3.3 A pele como barreira biológica e via de administração tópica	18
3.3.1 Nanopartículas poliméricas para aplicação tópica	20
3.4 Nanopartículas com superfície catiônica: alteração do tempo de permanência sobre tecidos biológicos	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Materiais	33
4.1.1 Matérias-primas	33
4.1.2 Aparelhos e equipamentos	33
4.1.3 Solventes e outros materiais	34
4.2 Métodos	36

4.2.1	Preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas	36
4.2.2	Caracterização das suspensões de nanocápsulas poliméricas	37
4.2.2.1	Doseamento da benzofenona-3 nas suspensões de nanocápsulas	37
4.2.2.2	Determinação das taxas de associação da benzofenona-3 às nanocápsulas	38
4.2.2.3	Determinação do pH	38
4.2.2.4	Determinação do diâmetro médio das partículas e polidispersão	39
4.2.2.5	Determinação do potencial zeta	39
4.2.2.6	Análise em Turbiscan LAb [®]	39
4.2.2.7	Análise morfológica	40
4.2.2.8	Reologia e determinação da viscosidade das suspensões de nanocápsulas	40
4.2.2.9	Análise estatística	40
4.2.3	Preparação da base semi-sólida contendo nanocápsulas de benzofenona-3	40
4.2.4	Caracterização das bases semi-sólidas contendo nanocápsulas de benzofenona-3	41
4.2.4.1	Doseamento de benzofenona-3 nas bases semi-sólidas	41
4.2.4.2	Análise em Turbiscan LAb [®]	41
4.2.4.3	Análise morfológica das nanocápsulas após incorporação na base semi-sólida	41

4.2.4.4 Determinação do diâmetro das nanocápsulas após incorporação nos hidrogéis	42
4.2.4.5 Determinação do potencial zeta dos hidrogéis após incorporação das nanocápsulas	42
4.2.4.6 Reologia dos géis contendo nanocápsulas de benzofenona-3 revestidas e não revestidas com quitosana	42
4.2.5 Avaliação da penetração cutânea in vitro de benzofenona-3 a partir dos géis contendo nanocápsulas revestidas e não revestidas com quitosana	43
4.2.5.1 Preparação e estocagem da membrana	43
4.2.5.2 Células de difusão do tipo Franz, <i>in vitro</i>	43
4.2.5.3 Técnica do <i>tape stripping</i> – retenção no estrato córneo	44
4.2.5.4 Técnica de retenção cutânea	44
4.2.5.5 Análise estatística da penetração cutânea in vitro de benzofenona-3 a partir dos géis contendo nanocápsulas de benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana	45
4.2.6 Descarte de resíduos	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana	48
5.1.1 Determinação dos diâmetros médios, polidispersão, potencial zeta, pH, taxa de associação e doseamento das nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana	48
5.1.2 Caracterização morfológica das nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana	53

5.1.3 Caracterização reológica e determinação da viscosidade das suspensões de nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana	54
5.1.4 Análise em Turbiscan LAb [®]	55
5.2 Preparação e caracterização da base semi-sólida contendo nanocápsulas de benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana	57
5.2.1 Análise reológica dos hidrogéis preparados com benzofenona-3 livre e a partir das suspensões de nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana	58
5.2.2 Doseamento de benzofenona-3 nanoencapsulada presente nas bases semi-sólidas, determinação do diâmetro das nanocápsulas após incorporação nos hidrogéis e do potencial zeta dos hidrogéis após incorporação das nanocápsulas	61
5.2.3 Análise morfológica das nanocápsulas após incorporação na base semi-sólida	63
5.2.4 Análise em Turbiscan LAb [®]	64
5.3 Avaliação da penetração cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir dos géis contendo nanocápsulas de benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana	65
6 CONCLUSÕES	73
7 REFERÊNCIAS	77
8 ANEXOS	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da benzofenona-3	17
Figura 2	Distribuição de íons em torno do colóide carregado – potencial zeta	26
Figura 3	Estrutura da quitosana	27
Figura 4	Fotomicrografias das suspensões de nanocápsulas por microscopia eletrônica de transmissão	54
Figura 5	Reogramas representando o comportamento newtoniano das suspensões de nanocápsulas	55
Figura 6	Gráficos de retroespalhamento e transmissão de luz das suspensões de nanocápsulas (Turbiscan LAb [®])	57
Figura 7	Reograma representando o comportamento pseudoplástico dos hidrogéis de Natrosol [®] contendo benzofenona-3 livre e nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana	60
Figura 8	Gráficos da determinação do diâmetro das nanocápsulas após incorporação nos hidrogéis	63
Figura 9	Fotomicrografias das nanocápsulas após incorporação nos hidrogéis, por microscopia eletrônica de transmissão	64
Figura 10	Gráficos de retroespalhamento e transmissão de luz dos hidrogéis contendo nanocápsulas revestidas ou não com quitosana (Turbiscan LAb [®])	65
Figura 11	Gráficos da distribuição de benzofenona-3 nas camadas da pele e meio receptor, através da penetração cutânea <i>in vitro</i> em células de Franz por tempos de coleta.	70
Figura 12	Gráficos da distribuição da benzofenona-3 no estrato córneo da pele, através da técnica do <i>tape stripping</i> .	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos fototipos da pele	14
Tabela 2	Composição das nanocápsulas poliméricas	37
Tabela 3	Características físico-químicas de nanocápsulas revestidas com diferentes concentrações de quitosana	48
Tabela 4	Características físico-químicas de nanocápsulas revestidas com diferentes concentrações de quitosana	49
Tabela 5	Características das nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana	52
Tabela 6	Índices de escoamento (n) e consistência (K) dos hidrogéis	61
Tabela 7	Concentrações de benzofenona-3 no compartimento doador, nas diferentes camadas da pele e no meio receptor	67

LISTA DE ABREVIATURAS

UV - Ultravioleta

UVA – Ultravioleta A

UVB – Ultravioleta B

UVC – Ultravioleta C

ERO – Espécies reativas de oxigênio

PSPT – *Physician diagnosed skin phototype*

FPS – Fator de proteção solar

PPD – *Persistent pigment darkening*

MCO – metoxicinamato de octila

O/A – óleo/água

A/O – água/óleo

CF – carboxifluoresceína

EHL – Equilíbrio Hidrófilo/Lipófilo

HEC – hidrogel branco de Natrosol[®]

HEC-B3 – hidrogel de Natrosol[®] contendo benzofenona-3 livre

HEC-NC-B3 – hidrogel Natrosol[®] contendo nanocápsulas de benzofenona-3 não revestidas

HEC-NC-Q-B3 – hidrogel Natrosol[®] contendo nanocápsulas de benzofenona-3 revestidas com quitosana

NC-S – nanocápsulas vazias preparadas com Span 60[®]

NC-S-B3 – nanocápsulas contendo benzofenona-3 preparadas com Span 60[®]

NC-S-Q-B3 – nanocápsulas contendo benzofenona-3 preparadas com Span 60[®] e revestidas com quitosana

NC-E – nanocápsulas vazias preparadas com Epikuron 170[®]

NC-E-B3 – nanocápsulas contendo benzofenona-3 preparadas com Epikuron 170[®]

NC-E-Q-B3 – nanocápsulas contendo benzofenona-3 preparadas com Epikuron 170[®] e revestidas com quitosana

RESUMO

As nanocápsulas poliméricas têm sido alvo de grande interesse por permitirem alterações no tempo de permanência das substâncias no estrato córneo da pele. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da carga de superfície positiva das nanocápsulas revestidas com quitosana sobre as características físico-químicas e avaliar a penetração cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir destas nanocápsulas incorporadas em hidrogéis. As nanocápsulas preparadas com Span 60[®] (NC-S: 234 nm; NC-S-B3: 260 nm; NC-Q-S-B3: 295 nm) apresentaram diâmetros médios maiores do que as preparadas com Epikuron 170[®] (NC-E: 174 nm; NC-E-B3: 175; NC-Q-E-B3: 202 nm), e todas apresentaram baixos valores de polidispersão (< 0,2), o que foi confirmado por de microscopia eletrônica de transmissão. O revestimento de quitosana conduziu a um potencial de superfície positivo (NC-Q-S-B3: 21 mV, NC-Q-E-B3: 21 mV), enquanto nas nanocápsulas não revestidas esses foram negativos (NC-S-B3: -12 mV, NC-E-B3: -8 mV). O teor de benzofenona-3 e as taxas de associação foram de aproximadamente 100 % para todas as amostras após preparação e após 30 dias de armazenamento. Análises em Turbiscan LAb[®] mostraram que as nanocápsulas sem revestimento de quitosana preparadas com Span 60[®] (NC-S-B3) apresentaram tendência à coalescência. As nanocápsulas incorporadas em hidrogéis de Natrosol[®] em total substituição à água não alteraram o comportamento pseudoplástico originalmente conferido ao Natrosol[®]. Análises em Turbiscan LAb[®] dos hidrogéis mostraram que não há tendência à desestabilização para todas as formulações. Estudos de penetração cutânea usando células de difusão de Franz demonstraram que as nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas com quitosana foram eficazes em prolongar o tempo de residência do filtro solar sobre o estrato córneo da pele e, também, em reduzir a sua chegada ao meio receptor das células de Franz. Em conclusão, o conjunto de resultados indica que as nanocápsulas contendo benzofenona-3 e revestidas com quitosana são sistemas promissores para aplicação cutânea da benzofenona-3.

Palavras-chave: nanocápsulas, quitosana, benzofenona-3, penetração cutânea.

ABSTRACT

Polymeric nanocapsules have been considered to be of great interest because of their ability to promote variation in time-residence of substances on the skin *stratum corneum*. The aim of this work was to evaluate either the positive charged surface, due to chitosan coating, plays any influence in the nanocapsules physico-chemical properties and to evaluate the *in vitro* skin penetration of benzophenone-3 from these nanocapsules after incorporation in hydrogels. The nanocapsules prepared with Span 60[®] (NC-S: 234 nm; NC-S-B3: 260 nm; NC-Q-S-B3: 295 nm) presented higher average diameter than the ones prepared with Epikuron 170[®] (NC-E: 174 nm; NC-E-B3: 175; NC-Q-E-B3: 202 nm), and all of them presented low polydispersity values (under 0,2), results that were confirmed by transmission electronic microscopy. The chitosan coating led to a positive zeta potential (NC-Q-S-B3: 21 mV, NC-Q-E-B3: 21 mV) while the uncoated nanocapsules presented negative zeta potential (NC-S-B3: -12 mV, NC-E-B3: -8 mV). All the samples showed an amount of benzophenone-3 of 100 % after preparation and 30 days of storage. The drug entrapment was 100 % for all formulations. Turbiscan LAb[®] analyses demonstrated that the uncoated nanocapsules, prepared with Span 60[®], have the tendency to coalescence. The incorporation of the nanocapsules in Natrosol[®] hydrogels, by substitution of the water for the nanocapsules suspension, did not cause any alteration in the originally observed pseudoplastic rheological behavior of Natrosol[®]. Turbiscan LAb[®] analyses have also shown no tendency to destabilization for all hydrogel formulations. Skin penetration studies using Franz diffusion cells, have shown that the chitosan coated nanocapsules containing benzophenone-3 were considered to be efficient in prolonging the time-residence of the sunscreen in the *stratum corneum* and also in reducing its presence in the receptor medium of the Franz cells. In conclusion, the results indicate that the chitosan coated nanocapsules containing benzophenone-3 are promising systems for cutaneous application of the referred sunscreen.

Key-words: nanocapsules, chitosan, benzophenone-3, skin penetration.

Os raios UVA e UVB, presentes na radiação solar, são os principais responsáveis por causar danos estruturais à pele, tais como alteração da pigmentação cutânea, enrugamento e envelhecimento precoce, bem como diferentes tipos de cânceres, de acordo com a proporção e tempo de exposição ao sol (JIMÉNEZ *et al.*, 2002; LOWE *et al.*, 1997). A fim de proteger a pele e prevenir estes danos, a estratégia mais utilizada é o uso de formulações cosméticas contendo filtros solares. Uma das substâncias mais empregadas é a benzofenona-3, um filtro solar químico de amplo espectro, também conhecido como oxibenzona, que auxilia na proteção por absorver a radiação ultravioleta (LOWE *et al.*, 1997; GONZALEZ *et al.*, 2006).

Uma formulação contendo um filtro solar requer que o ativo penetre pouco profundamente e permaneça localizado próximo à superfície da pele por um período prolongado (KURUL *et al.*, 2001). Entretanto, o risco de absorção sistêmica deve ser levado em consideração quando se utilizam filtros solares de amplo espectro. Estudos de absorção *in vivo* demonstraram que a benzofenona-3 é absorvida através da pele e excretada na urina, por até 48 horas após uma única aplicação (GONZALEZ *et al.*, 2006; HAYDEN *et al.*, 1997; SARVEIYA *et al.*, 2004).

Considerando a aplicação de formulações tópicas, alguns fatores são capazes de governar a liberação de fármacos e cosméticos na pele, dentre eles a massa molar e a lipofilia da substância, o tipo de formulação, a presença de promotores de penetração, o estado físico da formulação (VERMA *et al.*, 2003) e o grau de hidratação do estrato córneo (MORGANTI *et al.*, 2001).

Um filtro solar ideal deveria apresentar maior alcance na proteção em baixos níveis de penetração transdérmica. Isto pode ser alcançado por modificação química dos filtros ou usando diferentes tipos de veículos (TREFFEL *et al.*, 1996; MONTI *et al.*, 1993).

Os sistemas de liberação controlada, tais como lipossomas, micropartículas, nanopartículas poliméricas, emulsões submicrométricas e complexos lipídicos, permitem a otimização da velocidade de liberação e do regime de dosagem das substâncias, distribuindo-as em sítios de ação

específicos, sendo por isso alvos de grande interesse como carreadores de fármacos e ativos cosméticos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis são sistemas carreadores de substâncias que apresentam diâmetros inferiores a 1 μm , e podem se apresentar sob duas formas: nanocápsulas ou nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanocápsulas consistem de um sistema reservatório oleoso envolvido por uma parede polimérica, podendo o fármaco ou ativo cosmético estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (BARRATT, 2000; SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Por sua vez, as nanoesferas não apresentam núcleo oleoso em sua composição, sendo formadas por uma matriz polimérica, na qual a substância pode estar retida ou adsorvida (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanopartículas podem, também, ser constituídas por um sistema emulsionado, consistindo de uma fase dispersa (óleo) em uma fase contínua (água) estabilizada por tensoativos, apresentando-se, assim, sob a forma de nanoemulsão (KAN *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa têm conduzido estudos utilizando nanopartículas com o propósito de melhorar a eficácia (permanência ou controle da liberação) de fármacos e ativos cosméticos aplicados sobre a pele (JENNING *et al.*, 2000; ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; WISSING e MÜLLER, 2003; JIMÉNEZ *et al.*, 2004; MÜLLER-GOYMANN, 2004; ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2007). Neste contexto, as nanocápsulas poliméricas estão sendo introduzidas como uma nova geração de carreadores para cosméticos, especialmente para bloqueadores UV, com o propósito de prolongar o tempo de permanência dos filtros solares no estrato córneo (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; JIMÉNEZ *et al.*, 2004).

Uma vez que a maioria das formulações nanoestruturadas possuem carga de superfície negativa, uma nova abordagem tem sido revesti-las com materiais que promovam carga de superfície positiva com o propósito de melhorar a interação dos nanocarreadores com superfícies biológicas

negativamente carregadas. Nanopartículas com carga de superfície catiônica também têm apresentado ação eficiente sobre a alteração do seu tempo de permanência na superfície de mucosas carregadas negativamente (CALVO *et al.*, 1997b; DE CAMPOS *et al.*, 2001; DE CAMPOS *et al.*, 2003; AGNIHOTRI *et al.*, 2004), como é o caso da superfície cutânea. No entanto, até o presente momento, o uso de revestimento catiônico de nanoestruturas para aplicação cutânea não foi descrito.

A quitosana é um biopolímero policatiônico que tem sido muito estudado em nanotecnologia como material de revestimento aplicado a sistemas de liberação controlada de fármacos, especialmente devido às suas características únicas como mucoadesividade, biodegradabilidade e excelente propriedade formadora de filme. Devido à boa propriedade bioadesiva e a capacidade de sustentar a liberação de substâncias ativas, a quitosana também tem sido usada em sistemas de liberação tópica (PREGO *et al.*, 2005; AGNIHOTRI *et al.*, 2004).

Considerando o exposto, o presente trabalho propõe-se a realizar um estudo comparativo inédito sobre as características físico-químicas e de penetração cutânea *in vitro* de duas formulações de nanocápsulas poliméricas contendo o filtro solar de amplo espectro benzofenona-3, incorporadas em hidrogéis. As formulações de nanocápsulas diferirão entre si quanto à carga de superfície das partículas: a primeira terá como parede polimérica a poli(ϵ -caprolactona), com conseqüente potencial zeta negativo, e a segunda, será constituída por poli(ϵ -caprolactona) revestida com quitosana, apresentando potencial zeta positivo. Devido à propriedade bioadesiva e à carga positiva conferida às nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas com quitosana, este novo sistema poderá aumentar o tempo de residência do filtro solar no estrato córneo da epiderme.

Objetivos

2.1 Geral

Avaliar a influência da carga de superfície das partículas sobre as características físico-químicas e a penetração cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas incorporadas em hidrogéis.

2.2 Específicos

- Preparar através do método de nanoprecipitação e caracterizar nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas com quitosana e sem revestimento;
- Incorporar as formulações de nanocápsulas contendo benzofenona-3 em hidrogéis e caracterizar as formulações semi-sólidas;
- Avaliar comparativamente a penetração *in vitro* da benzofenona-3 a partir das nanocápsulas revestidas ou não, incorporadas nos hidrogéis.

3.1 Fotoproteção e cuidados com a pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 16 % do peso total corporal podendo representar nos adultos de 1,2 a 2,3 m² da superfície externa. É composta por duas camadas principais, sendo elas: a epiderme, de origem ectodérmica, e a derme, de origem mesodérmica, compondo a pele propriamente dita. Há ainda a hipoderme ou tecido subcutâneo, um tecido conjuntivo frouxo que contém um preenchimento de células adiposas, o panículo adiposo, que atua como ligante da pele aos tecidos subjacentes (JUNQUEIRA *et al.*, 1999).

A epiderme é a camada mais externa da pele e encontra-se em contato direto com o meio ambiente, desta forma, funcionando como uma barreira protetora do organismo contra agressões externas, dentre elas a proteção contra as radiações ultra-violeta (UV), emitidas pelos raios solares, através da produção e armazenamento de melanina nas células epidérmicas. A exposição à radiação solar pode ter efeitos benéficos ou prejudiciais sobre o corpo humano, dependendo da duração e frequência de exposição, intensidade da luz solar e sensibilidade do indivíduo (WILKINSON & MOORE, 1990). A proteção epidérmica contra a radiação UV é realizada pelo sistema melanocitário, cujas células, oriundas da crista neural, produzem o pigmento melânico e transmitem-no aos queratinócitos vizinhos, formando assim, uma mancha pigmentada contínua capaz de absorver parcialmente a energia fotônica UV. Pode-se considerar também como agente de proteção natural da pele a forma *trans* do ácido urocânico, presente no suor. O ácido urocânico atua nas camadas mais superficiais da epiderme, a partir da qual produz respostas imunomoduladoras, captando os fótons e realizando um mecanismo de proteção ao impedir que a energia captada como fóton seja transformada ou degradada a nível de energia térmica, o que caracteriza a queimadura solar (FINLAY-JONES *et al.*, 1998). A espessura do estrato córneo da epiderme também é outro fator importante no processo de proteção da pele contra a radiação solar (VIGLIOGLIA *et al.*, 1979; JUNQUEIRA *et al.*, 1999).

A exposição moderada ao sol produz, psicologicamente e fisiologicamente, uma sensação de saúde, sossego mental e bem-estar geral, apresentando também certos efeitos sobre a saúde como o estímulo à circulação sanguínea, promovendo

redução da pressão arterial, ou atuando na prevenção e tratamento do raquitismo, produzindo vitamina D (através da ativação do 7-deidrocolesterol – pró-vitamina D₃) que auxilia na absorção de cálcio do intestino, ou ainda no tratamento de doenças da pele como psoríase e diminuição da sensibilidade de alguns indivíduos a determinadas infecções. Entretanto, a radiação solar também pode causar prejuízos estéticos, estruturais e de funcionamento à pele, em curto ou longo prazo (WILKINSON & MOORE, 1990).

O componente ultravioleta, que forma aproximadamente 5 % da radiação solar terrestre, é o principal responsável pelos efeitos deletérios associados à exposição ao sol. Em particular, os comprimentos de onda curtos da radiação ultravioleta terrestre (UVB: 290-320) são especialmente danosos. A luz ultravioleta é dividida em UVC (comprimentos de onda abaixo de 290 nm, que não alcançam a superfície da terra), UVB (290 a 320 nm) e UVA, que é sub-dividida em UVA I (320 a 340 nm) e UVA II (340 a 400 nm) representando aproximadamente 95 % da radiação ultravioleta à qual estamos expostos. A radiação UVB possui o comprimento de onda mais ativo na superfície terrestre, capaz de causar danos fotoquímicos mais diretos como as queimaduras solares, e principalmente ao DNA, a partir do qual surgem mutações genéticas e sendo, por isso, claramente, o fator dominante na formação de células escamosas, com um importante papel no desenvolvimento de câncer de células basais (LEYDEN *et al.*, 2002; LIM *et al.*, 2001). Diferente da radiação UVB, a radiação UVA, que é responsável pelo “bronzado” da pele, pode ter mais efeitos indiretos sobre o DNA via produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), realizando um papel importante na patogênese do melanoma, uma vez que apresenta-se como principal responsável do dano solar causado a longo prazo (LEYDEN *et al.*, 2002; LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2007).

Algumas medidas estão disponíveis a fim de diminuir o efeito deletério das radiações UV sobre a pele. Dentre elas, evitar completamente a exposição ao sol, preferir a sombra nos horários em que os comprimentos de onda causadores de danos são mais intensos, usar roupas que protejam contra a penetração da radiação ultravioleta e, principalmente, usar protetores solares tópicos para prevenir ou

reduzir o dano celular induzido pelas radiações UV ao mínimo (WULF *et al.*, 2004; LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2007).

Como resultado do aumento da consciência das pessoas sobre os efeitos prejudiciais da radiação solar sobre a pele e comprovação de que a incidência do câncer de pele está relacionada à exposição solar, a frequência do uso de protetores solares tópicos tem aumentado com o passar dos anos (BRONAUGH *et al.*, 2002). Além disso, vários estudos tem mostrado uma redução no número de queratoses actínicas e carcinomas celulares escamosos, em usuários regulares de protetor solar (NAYLOR *et al.*, 1995; GREEN *et al.*, 1999; DARLINGTON *et al.*, 2003).

Por estas razões, na atualidade é usual a prática por parte dos produtores de incluírem filtros solares em diversos produtos cosméticos tradicionais, como por exemplo, batons, *shampoos*, cremes anti-idade e outros tipos de maquiagem (BRONAUGH *et al.*, 2002). Na maioria dos casos, é permitido o uso de filtros solares nas formulações em concentrações de até 10 %, podendo variar de acordo com o composto específico ou com a determinação da agência reguladora de cada país (GIOKAS *et al.*, 2007). De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), no Brasil é permitido o uso de alguns filtros químicos em concentrações entre 3 e 15 %, dependendo da natureza da substância, e para filtros físicos (como óxido de zinco e dióxido de titânio) é permitido até 25 % da substância em produtos indicados com ação fotoprotetora (BRASIL, 2006).

Todos os fenótipos sofrem os efeitos da radiação UV, sendo que as peles claras estão mais sujeitas aos danos de curto prazo como as queimaduras. A análise clínica da cor e fotosensibilidade da pele inclui uma escala de diagnóstico desenvolvida inicialmente por Fitzpatrick, em 1988, denominada *physician-diagnosed skin phototype (PSPT)*, que admite a análise visual da pigmentação como um indicador da resposta da pele ao efeito da luz solar. Originalmente, esta classificação enquadrava as respostas da pele à exposição UV nos tipos I, II, III e IV (iniciando com as peles mais claras); entretanto, revisões subseqüentes classificaram os tipos de peles mais pigmentadas em V e VI (GONZALEZ, 2006). Tendo em vista que a (ANVISA) não desenvolveu qualquer metodologia específica, ela determina que sejam utilizadas estritamente as metodologias de determinação

do FPS (fator de proteção solar) indicadas pela FDA ou pela COLIPA (BRASIL, 2006).

Tabela 1. Classificação do fototipo de acordo com FITZPATRICK (GONZALEZ, 2006a)

Fototipo	Cabelos	Pigmentação	Sardas	Queimaduras	Bronzeado
0	Branco	Albinos	0	Sempre	0
I	Ruivos	Leitosa	Numerosas	Sempre	0
II	Louro	Clara	Bastante	Sempre	Leve
III	Castanho	Clara/parda	Poucas	Freqüente	Claro médio
IV	Escuro	Parda	0	Rara	Escuro
V	Escuro	Morena	0	Excepcional	Muito escuro
VI	Negro	Negra	0	Ausente	Negro

Uma formulação fotoprotetora com um alto FPS (relacionado principalmente à proteção UVB) deve conter igualmente uma proteção UVA adequada, por isso as proteções contra as radiações UVA e UVB devem estar interligadas. O grau de proteção promovido por um filtro solar é representado por seu FPS. O FPS pode ser compreendido como “a quantidade mínima de energia UV necessária para desenvolver o mínimo eritema sobre a pele protegida com filtro solar, comparada à quantidade de energia necessária para produzir o mesmo eritema na pele desprotegida”. Peles menos pigmentadas necessitam de maior proteção, sendo portanto indicados produtos com FPS igual ou maior que 15 (FINLAY-JONES *et al.*, 1998; CHAN *et al.*, 2005). O FPS e a eficácia do filtro solar dependem da adequada distribuição do produto na pele (SCHULZ *et al.*, 2002; DIFFEY, 2001). Todavia, a determinação do FPS é uma técnica que avalia a eficácia dos filtros solares com relação exclusivamente à radiação UVB do espectro eletromagnético (DIFFEY *et al.*, 2000)

A crescente preocupação em relação aos efeitos deletérios da radiação UVA desperta a necessidade do desenvolvimento de um método padrão para avaliar formulações fotoprotetoras com relação ao nível de proteção contra os raios UVA.

Com essa finalidade alguns métodos baseados em técnicas *in vivo* e *in vitro* têm sido propostos, como por exemplo o método PPD (*Persistent Pigment Darkening*) que é preconizado pela Associação de Indústrias Cosméticas Japonesa (JCIA). O método baseia-se na relação entre a dose mínima de radiação UVA necessária para induzir um escurecimento persistente dos pigmentos na pele protegida por protetor solar (MDPp – mínima dose pele protegida) e a dose mínima de radiação UVA que é necessária para induzir um escurecimento persistente dos pigmentos na mesma pele, quando desprotegida (MDPd – mínima dose pele desprotegida) (Equação 1) (MOYAL *et al.*, 2000) .

$$FP - UVA = \frac{MDPp}{MDPd} \quad (1)$$

Onde a MDPp e MDPd são visualmente determinados e definidos como a quantidade de radiação UVA necessárias para evidenciar a primeira reação de pigmentação (MOYAL *et al.*, 2006). Para este teste, são utilizados indivíduos de ambos os sexos com fototipos II, III e IV, conforme a classificação de FITZPATRICK. Indivíduos com pele clara (fototipo I) são excluídos, já que estes desenvolvem eritema ao invés de PPD. Em contrapartida, indivíduos com pele escura (fototipos V e VI) são excluídos da determinação, devido à perda do contraste entre a pigmentação induzida e a pele normal (MOYAL *et al.*, 2000).

Com a necessidade de um ensaio *in vitro* que apresentasse correlação com o método de PPD *in vivo*, a COLIPA desenvolveu um método *in vitro* validado para a determinação do fator de proteção UVA (FP-UVA) em formulações fotoprotetoras. Essa técnica baseia-se na medida da transmitância na região UV através de um filme delgado de uma amostra do produto teste sobre um substrato irregular. A medida é realizada antes e após a exposição da amostra a uma dose de radiação UV controlada, fornecida por uma fonte UV definida, a qual emite radiação em toda a extensão do espectro UVA e UVB (290 a 400 nm). São calculados o FPS *in vitro* e determinado seu coeficiente de ajuste (que corresponde ao fator de correção do espectro UV inicial com a finalidade de obter um FPS *in vitro* = FPS rotulado (*in vivo*), e é calculado o FP-UVA dos substratos individuais após a irradiação UV da

amostra. Após ajuste matemático do segundo Espectro de Absorção $[A(\lambda)]$ a partir do Coeficiente C, é estabelecida uma correlação do FP-UVA determinado *in vitro* com os valores de PPD *in vivo* (COLIPA, 2007).

A princípio, os filtros solares são destinados às aplicações na camada mais externa da superfície da pele, onde deve estar garantida a eficácia constante da substância durante todo período de exposição à luz UV proveniente do sol (CHATELAIN & GABARD, 2001). Durante a irradiação, em contato com a pele, intermediários reativos de filtros solares fotoinstáveis podem se comportar como foto-oxidantes ou podem também promover dermatites de contato fotoalérgicas ou fototóxicas. As indicações de que estes produtos podem causar efeitos colaterais dermatológicos e de que podem penetrar à superfície da pele, têm instigado vários estudos toxicológicos (CAMBON *et al.*, 2001; GERHARD *et al.*, 2001; GIOKAS *et al.*, 2007), que até o momento indicam significativas atividades estrogênica e anti-androgênica (SCHLUMPF *et al.*, 2001; SCHLUMPF *et al.*, 2004; SCHMUTZLER *et al.*, 2004; MOROHOSHI *et al.*, 2005) e carcinogênica (RHODES *et al.*, 2007) a partir do uso desta classe de compostos.

3.2 Benzofenona-3

A benzofenona-3, também conhecida como oxibenzona ou 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona é o filtro solar químico mais amplamente empregado em formulações cosméticas em todo o mundo, uma vez que atua absorvendo ambas as radiações UVA e UVB presentes na luz solar (FELIX *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2003; VIDAL *et al.*, 2007). Mais especificamente, os filtros químicos UV atuam absorvendo fótons (os elétrons situados no orbital molecular ocupado de mais alta energia são excitados para o orbital desocupado de mais baixa energia) e, ao retornarem ao seu estado fundamental, emitem energia térmica através de uma série de transições vibracionais (relaxação vibracional). Não havendo degradação do filtro solar, ele poderá absorver fótons adicionais e repetir o processo, portanto protegendo a pele contra as radiações UV (FLOR *et al.*, 2007; GIOKAS *et al.*, 2007).

A benzofenona-3 é caracterizada por uma massa molar relativamente baixa (228.5 g.mol^{-1}), com ponto de fusão de $63 \text{ }^\circ\text{C}$ e Log P de 3,58. Estas propriedades

físicas sugerem que a benzofenona-3 pode ser uma boa candidata à penetração cutânea (TREFFEL *et al.*, 1996; FERNANDEZ *et al.*, 2002; YENER *et al.*, 2003). As benzofenonas em geral são fotoquimicamente estáveis frente às radiações UVA e UVB, entretanto, sua estabilidade têm sido questionada quanto à oxidação da benzofenona-3 em presença da luz UV, com subsequente formação de intermediários reativos (MAIER *et al.*, 2001; HAYWOOD *et al.*, 2003; MAIER *et al.*, 2005). Embora a atividade de foto-absorção da benzofenona-3 ocorra na superfície da pele, este filtro pode também ser absorvido e acumular-se no organismo, onde passa pelos rins, é metabolizado, e excretado em traços na urina (FELIX *et al.*, 1998). Fernandez e colaboradores (2002) concluíram, após estudos *in vivo* através da técnica de *tape stripping*, que cerca de 35 % de benzofenona-3 aplicada sobre a pele pode atravessá-la. Estudos recentes têm confirmado a presença de benzofenona-3 e seus metabólitos na urina de humanos, até 48 horas após aplicação tópica de cosméticos (HAYDEN *et al.*, 1997; GUSTAVSSON-GONZALEZ *et al.*, 2002 ; SARVEYIA *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2007).

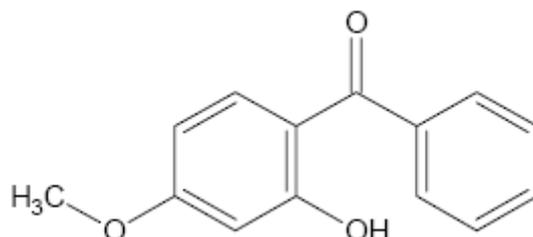


Figura 1. Estrutura química da benzofenona-3 (Adaptado de GUPTA *et al.*, 1999).

A benzofenona-3 sofre intenso processo de metabolização. Diante disso, Okereke e colaboradores (1993) mostraram que o citocromo P-450 metaboliza a benzofenona-3 à 2,4-dihidroxi-benzofenona, também conhecida como benzofenona-1. Outro estudo realizado por Gonzalez e colaboradores (2006b), investigou a quantidade de benzofenona-3 excretada na urina após várias aplicações de um protetor solar no corpo de voluntários, com subsequente exposição à radiação UV, e verificou que grande parte da benzofenona-3 detectada na urina estava na sua

forma conjugada. É importante notar que estudos acerca da atividade estrogênica de uma série de filtros solares, sugerem que todos os derivados de benzofenonas que contém grupamentos hidroxila na posição 4, são prováveis agonistas estrogênicos. Adicionalmente, um grupamento hidroxila na posição 2 realça a atividade agonista, como é o caso da benzofenona-1 (KAWAMURA *et al.*, 2003). O metabolismo da benzofenona-3 também foi relatado em estudo utilizando hepatócitos isolados de ratos, os quais produziram benzofenona-1, entre outras benzofenonas altamente hidroxiladas (NAKAGAWA e SUZUKI, 2000) e ainda, a benzofenona-1 foi detectada na urina de humanos previamente expostos à benzofenona-3 (FELIX *et al.*, 1998).

3.3. A pele como barreira biológica e via de administração tópica

A administração tópica de fármacos ou ativos cosméticos possui vantagens como baixíssimos efeitos sistêmicos e vetorização das substâncias à área lesada (GUTERRES *et al.*, 2007). A pele funciona como um interligante entre o ambiente externo e o corpo humano, evitando a perda excessiva de água e atuando como “seletor” ao evitar que moléculas indesejáveis atravessem a barreira epitelial. Um dos principais desafios tem sido determinar a maneira precisa de como as substâncias penetram através da pele e como as formulações podem afetar este mecanismo (HANDGRAFT, 2001; MORGANTI *et al.*, 2001).

O fato da pele ser uma das melhores barreiras biológicas se deve principalmente à camada mais externa da epiderme, o estrato córneo. Nos últimos 10 anos, estudos têm mostrado que o estrato córneo não é uma camada inerte, como acreditava-se no passado, mas sim uma “parede mecânica ativa” opondo-se à penetração de moléculas indesejáveis (MORGANTI *et al.*, 2001; CEVC, 2004). A pele é um órgão complexo que possui a maior variedade de tipos de células no corpo. Mais de 90 % de todas as células no estrato córneo são corneócitos, produtos finais da diferenciação de queratinócitos que são células microscopicamente achatadas e rigorosamente empilhadas que se direcionam perpendicularmente à superfície da pele. Nas junções intercelulares existem envelopes lipídicos de corneócitos e desmossomos (estruturas especializadas para a adesão entre células) (CEVC, 2004). O estrato córneo consiste, então, de 10 a 15 camadas de corneócitos

apresentando uma espessura entre 10 e 20 μm (FOLDVARI, 2000). Desta forma, o estrato córneo e suas estruturas compactas são os principais obstáculos para a penetração de substâncias administradas sobre a pele (GUTERRES *et al.*, 2007; HANDGRAFT, 2001; MORGANTI *et al.*, 2001; TING *et al.*, 2004).

Uma vez que o mecanismo de transporte é difusional, a atuação do estrato córneo como barreira é limitada pelo seu grau de hidratação. Portanto, um aumento no conteúdo hídrico da pele corresponde a um aumento na permeabilidade de substâncias aplicadas topicamente. Na verdade, o estado de hidratação do estrato córneo é um dos fatores mais importantes na determinação da taxa de absorção percutânea de um dado soluto (MORGANTI *et al.*, 2001; GUTERRES *et al.*, 2007). A hidratação do estrato córneo amplia o ambiente e aumenta consideravelmente seu caráter hidrofílico, o que leva a uma diminuição do coeficiente de partição entre epiderme viável-estrato córneo e a substância penetrante. Portanto, o coeficiente de partição entre o veículo e o estrato córneo é crucialmente importante no estabelecimento de uma alta concentração inicial da substância que se difunde nas primeiras camadas da pele. A eficácia de produtos cosméticos, então, pode ser determinada pela relação estabelecida entre o coeficiente de permeabilidade do estrato córneo e as características estruturais dos penetrantes, como os carreadores cosméticos e os principais ativos usados. Na verdade, o coeficiente de permeabilidade é influenciado pela hidrofobicidade e tamanho das partículas penetrantes, e naturalmente pela presença ou ausência de cargas elétricas e a outros fatores devido às características da área de aplicação (MORGANTI *et al.*, 2001).

Para produtos destinados à pele, o tipo de veículo empregado exerce maior influência do que em qualquer outro tipo de membrana. Com o auxílio do veículo, a substância ativa é liberada para o local de aplicação ou órgão alvo, onde o efeito desejado é obtido. De fundamental importância é, portanto, o tipo de veículo utilizado. Em termos de absorção percutânea, o interesse primário é liberar a substância a partir do veículo após aplicação na superfície da pele. Além disso, a evaporação de componentes voláteis, como a água, na superfície da pele a partir de aplicações tópicas influencia significativamente a difusão da substância ativa no estrato córneo (VALENTA, 2004; MORGANTI *et al.*, 2001). Por isso, quando se trata

de produtos cosméticos deve ser feita uma escolha cuidadosa do tipo de carreador a ser usado para uma determinada substância ativa. Por exemplo, substâncias funcionais como filtros UV são usualmente aplicadas superficialmente em grandes áreas da pele e ali devem permanecer sobre a superfície. Caso ocorra penetração, estas substâncias podem alcançar locais muito além do seu sítio de ação, e do ponto de vista funcional, isto não é desejado para esta classe de compostos. Neste ponto de vista, a melhor forma de aumentar a performance de um ativo em uma formulação cosmética é o desenvolvimento de sistemas de liberação apropriados (MORGANTI *et al.*, 2001).

3.3.1. Nanopartículas poliméricas para aplicação tópica

Carreadores coloidais de fármacos, incluindo as nanoemulsões, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos, têm atraído um crescente interesse nos últimos 20 anos no uso como veículos para administração tópica de fármacos lipofílicos por permitirem a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; VERMA *et al.*, 2003; SHIM *et al.*, 2004; CEVC, 2004). Tanto a liberação imediata, como a liberação sustentada têm sido relatadas para os sistemas nanoestruturados. Para as aplicações tópicas, ambas as características são interessantes, a liberação imediata pode ser útil para melhorar a penetração de uma substância e a liberação sustentada é importante para substâncias ativas potencialmente irritantes em concentrações elevadas ou que devam suprir a pele por um período prolongado de tempo (JENNING *et al.*, 2000).

As nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis, possuem vantagens com relação aos lipossomas devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade *in vivo* e durante o armazenamento (KAN *et al.*, 1999). Estas nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetros inferiores a 1 μm , e podem se apresentar sob duas formas: nanocápsulas ou nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanocápsulas consistem de um sistema reservatório oleoso envolvido por uma parede polimérica, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (BARRATT, 2000;

SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Por sua vez, as nanoesferas, não apresentam núcleo oleoso em sua composição, sendo formadas por uma matriz polimérica, na qual o fármaco ou ativo cosmético pode estar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanopartículas possuem algumas características vantajosas que fazem delas carreadores promissores para aplicações cosméticas: (a) capacidade de proteção a compostos lábeis contra degradação química, (b) possibilidade de controle da liberação da substância ativa, (c) atuam como agentes oclusivos e (d) apresentam potencial bloqueador das radiações ultra-violeta, atuando como filtros físicos, podendo estar combinados a filtros químicos com o propósito de melhorar a fotoproteção (WISSING e MÜLLER, 2003).

Na última década, estudos têm sido conduzidos a fim de se compreender a influência da nanoencapsulação de fármacos e ativos cosméticos sobre sua capacidade em atravessar a pele. Filtros UV, por exemplo, são destinados a permanecer mais tempo sobre a superfície da pele. A principal aplicação de nanopartículas poliméricas está focada no desenvolvimento de novas formulações contendo filtro solares, uma vez que estas nanopartículas são capazes de carrear substâncias altamente lipofílicas e por sua capacidade em alterar e/ou mascarar as propriedades físico-químicas de fármacos ou ativos cosméticos encapsulados (OLVERA-MARTINEZ *et al.*, 2005; GUTERRES *et al.*, 2007). Alvarez-Román e colaboradores (2001), avaliando o perfil de liberação de nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila (MCO) incorporadas em um gel, observaram que a formulação contendo nanocápsulas com MCO, comparada à formulação contendo MCO não encapsulado, apresentou perfil de liberação moderado. Este fenômeno pode ser devido à alta hidrofobicidade e cristalinidade do polímero usado poli(ϵ -caprolactona) e pela alta lipofilia do ativo (MCO) que previne sua difusão para o meio receptor. Esta baixa difusão sugere que o MCO encontra-se totalmente encapsulado e não adsorvido na superfície externa das nanocápsulas. Além disso, o gel contendo nanocápsulas com MCO apresentou maior eficiência na proteção contra o eritema induzido por radiação UV do que o gel contendo MCO não encapsulado.

Outro estudo realizado por Jiménez e colaboradores (2004) verificou a influência da encapsulação sobre a absorção percutânea *in vitro* do MCO. Para tanto, foi empregado o modelo de difusão através de células de Franz utilizando pele de porco como membrana biológica. Os resultados demonstraram que as nanocápsulas contendo MCO diminuíram a sua penetração no estrato córneo quando comparadas às mesmas emulsões O/A e A/O contendo o ativo livre, portanto, evidenciando a importância do efeito da encapsulação sobre a penetração na pele. A aplicação tópica de emulsões contendo nanocápsulas de MCO pode ser mais efetiva provavelmente devido à formação de um filme de nanocápsulas sobre a pele.

Por sua vez, Weiss e colaboradores (2007) estudaram a penetração cutânea do MCO incorporado em nanocápsulas poliméricas. O estudo de penetração cutânea *in vitro* realizado através de células de Franz e utilizando hidrogéis de hidróxi-etil-celulose como veículo para as nanocápsulas, permitiu observar que após 3 h quase da dose total do filtro solar aplicada estava presente nas camadas mais superficiais da pele (doador e estrato córneo), enquanto cerca de 1,5 % havia penetrado nas camadas viáveis da pele. Já após 6 h de experimento, a quantidade de filtro solar nas camadas viáveis aumentou cerca de 4 vezes e a quantidade detectada no compartimento doador diminuiu entre 3 h e 6 h, enquanto no estrato córneo houve aumento na concentração de MCO.

Ao avaliar a penetração cutânea de micropartículas com diferentes diâmetros, Schaefer e colaboradores (1990) demonstraram que partículas com diâmetros em torno de 3 a 10 μm penetraram seletivamente nos ductos foliculares, enquanto partículas maiores que 10 μm permaneceram sobre a superfície da pele. As microesferas menores que 3 μm foram aleatoriamente distribuídas nos folículos pilosos e no estrato córneo.

Sob outra perspectiva, Verma e colaboradores (2003) investigaram a influência do tamanho de lipossomas sobre o transporte de um composto fluorescente hidrofílico/lipofílico, a carboxifluoresceína (CF) na pele humana, utilizando células de difusão de Franz para estudo da permeação e microscopia confocal laser, para o rastreamento das partículas na pele. Para este estudo, foram preparados lipossomas de diferentes tamanhos (120 nm, 191 nm, 377 nm e 810

nm). Os resultados observados demonstraram que os lipossomas de menor tamanho melhoraram a penetração da CF na pele, comparados aos lipossomas de maior tamanho. As partículas de menor tamanho mostraram acumulação máxima de CF no estrato córneo, nas camadas mais profundas da pele e também no compartimento receptor da célula de difusão de Franz, comparadas às partículas maiores. Os dados levaram a conclusão de que as partículas maiores não apresentam boa penetração nas camadas mais profundas da pele e permanecem sobre/no estrato córneo formando uma camada lipídica após sua secagem.

Baseados nesta análise, Alvarez-Román e colaboradores (2004) observaram a influência do tamanho da partícula sobre a deposição e/ou permeação na pele, usando para este estudo, nanopartículas com diâmetros médios de 20 e 200 nm. Os resultados deixaram claro a acumulação preferencial de nanopartículas de menor diâmetro (20 nm) pelos folículos pilosos da pele, fenômeno que pode ser devido à alta área específica da superfície das nanopartículas.

Em trabalho semelhante, Shim e colaboradores (2004) discutiram os mecanismos de permeação de nanopartículas contendo minoxidil e o efeito do tamanho das nanopartículas sobre a taxa de permeação do minoxidil na pele. Foram preparadas nanopartículas com diâmetros médios de 40 e 130 nm, que foram aplicadas, em estudo *in vitro*, sobre a pele de animais com e sem pêlos. Os resultados indicaram que as partículas de menor tamanho facilitaram amplamente a penetração do minoxidil para o compartimento receptor das células de Franz, e que a quantidade de fármaco retido na superfície da pele não foi dependente do tamanho da partícula.

Luengo e colaboradores (2006) prepararam e caracterizaram nanopartículas de ácido poli (lático-co-glicólico) contendo ácido flufenâmico e as incorporaram em hidrogéis de Natrosol[®] (hidroxi-etil-celulose) com o objetivo de avaliar o transporte do fármaco através de pele. A capacidade de passagem do ácido flufenâmico foi analisada através de um experimento de penetração, onde foi utilizado o modelo de Saarbrücken, e outro experimento de permeação, no qual foi utilizado o modelo de células de difusão de Franz. Através de microscopia de força atômica os pesquisadores demonstraram que a incorporação das nanopartículas contendo ácido flufenâmico (diâmetro médio de 328 nm, com baixa polidispersão) ao hidrogel

de Natrosol® não exerceu influência sobre a forma e a distribuição do tamanho das partículas, confirmando que o hidrogel continha as nanopartículas intactas. O ensaio de liberação *in vitro* apresentou perfis muito semelhantes tanto para o hidrogel contendo fármaco livre como para o hidrogel contendo o fármaco associado às nanopartículas. Já os ensaios de penetração não apresentaram diferenças significativas na quantidade de ácido flufenâmico acumulado no estrato córneo, em todos os tempos de incubação (30 min, 3, 6 e 24 horas). Nas camadas mais profundas da pele houveram diferenças estatisticamente significativas entre as duas formulações observadas nos tempos de 3 e 24 horas. Curiosamente, após 3 horas de incubação, maiores níveis de ácido flufenâmico foram detectados a partir da formulação contendo fármaco livre do que da formulação contendo nanopartículas. Ao contrário, após 24 horas, esta relação foi invertida, ou seja, níveis consideráveis do fármaco foram detectados a partir da formulação contendo nanopartículas. Nos experimentos de permeação foram utilizados os mesmos tempos de incubação determinados para os ensaios de penetração, e foi observado que para os menores tempos de incubação (< 12 horas) não houve diferença estatisticamente significativa nas quantidades de fármaco permeado, embora os níveis de fármaco livre tendessem a um leve aumento. Entretanto, para os maiores tempos de incubação, houve inversão estatisticamente significativa na quantidade de fármaco permeado, ou seja, mais fármaco permeou a partir da formulação de ácido flufenâmico encapsulado do que a partir daquela contendo fármaco livre. Isto sugere que a nanoencapsulação causou um leve decaimento no transporte do fármaco nos menores tempos de incubação, enquanto, em longos períodos de incubação (> 12 horas) o resultado foi invertido aumentando cerca de 50 % a quantidade de fármaco transportado para as camadas mais profundas da pele.

Alves e colaboradores (2006) avaliaram a permeação cutânea *in vitro* do antiinflamatório nimesulida incorporado em nanocápsulas e nanoesferas, preparadas com poli(ϵ -caprolactona), triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (apenas no preparo das nanocápsulas), monoestearato de sorbitano e polissorbato 80, e nanoemulsões, partindo da mesma composição porém sem adição da poli(ϵ -caprolactona), usando o modelo de células de Franz e a técnica do *tape stripping*. Os diferentes sistemas foram incorporados em hidrogéis de Carbopol 940® e, então, foram avaliadas a capacidade de liberação e permeação da nimesulida através da

pele humana. Os resultados demonstraram que os hidrogéis contendo nanocápsulas liberaram a nimesulida no estrato córneo, mas também apresentaram penetração de nimesulida significativamente maior (ANOVA, $P < 0,05$) que os hidrogéis contendo nanoesferas e nanoemulsão em uma camada mais profunda da pele. Da mesma forma que para as nanocápsulas, a nimesulida incorporada nas nanoesferas foi detectada no estrato córneo. Por sua vez, a nimesulida incorporada na nanoemulsão e veiculada no hidrogel não foi detectada no estrato córneo, uma vez que o antiinflamatório permeou direto para a derme. Nas camadas mais profundas da pele, a nimesulida oriunda das nanoesferas e da nanoemulsão apresentou quantidades estatisticamente similares (ANOVA, $P < 0,05$). Estes dados indicam a influência do tipo de sistema utilizado sobre a penetração/permeação cutânea de fármacos, o que evidencia a grande importância da escolha do sistema adequado para vetorização de substâncias na pele.

3.4. Nanopartículas com superfície catiônica: alteração do tempo de permanência sobre tecidos biológicos

Alterações na superfície de nanopartículas podem ser medidas pela estimativa do potencial de superfície, densidade de grupos funcionais ou um aumento na hidrofília da superfície. Um dos métodos usados para medir essas mudanças é a determinação do potencial zeta (ξ) de suspensões aquosas contendo nanopartículas (SOPPIMATH, 2001).

O potencial zeta pode ser compreendido através do modelo da “camada dupla” que permite visualizar a atmosfera iônica nas proximidades do colóide carregado e explicar como atuam as forças elétricas de repulsão, como pode ser acompanhado através da figura 2.

A atração do colóide negativo permite que alguns íons positivos formem uma camada rígida bem próxima, ao redor da superfície do colóide, denominada **camada de Stern**. Além disso, outros íons adicionais são também atraídos pelo colóide negativo, porém são afastados pela camada de Stern bem como por outros íons positivos que tentam se aproximar da partícula. Este equilíbrio dinâmico resulta no surgimento de uma **camada difusa** de contra-íons, que pode ser visualizada como

uma atmosfera carregada em torno do colóide. Próximo à superfície, estes contra-íons estão altamente concentrados, entretanto, tendem a diminuir a concentração ao se afastarem do colóide até que alcancem então um equilíbrio na solução. Os contra-íons da camada de Stern e da camada difusa são os que juntos denominamos de **camada dupla**. O colóide negativo e sua atmosfera carregada positivamente produzem um potencial elétrico relativo à solução, o qual possui um valor máximo na superfície e diminui gradualmente ao se afastar, aproximando-se de zero fora da camada difusa. A diminuição do potencial e a distância a partir do colóide são indicadores da força repulsiva entre os colóides. O ponto onde se unem a camada difusa e a camada de Stern é conhecido como **potencial zeta**, que indica mudanças no potencial de superfície e nas forças de repulsão entre os colóides, e pode ser medido de forma simples enquanto que a carga de superfície e seu potencial não podem ser medidos (Zeta-Meter Inc., 2006).

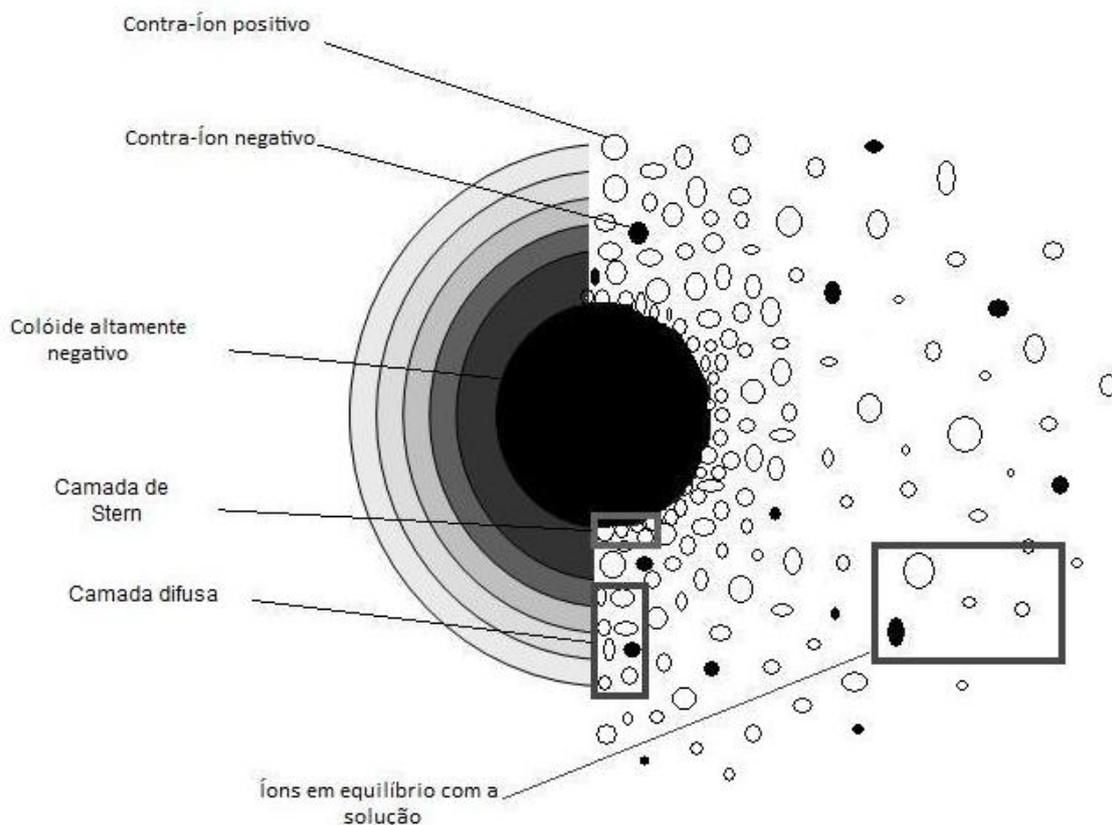


Figura 2. Distribuição dos íons em torno do colóide carregado e mudança na densidade das cargas ao redor do colóide (Adaptado de Zeta-Meter Inc., 2006).

O potencial zeta de uma partícula pode ser positivo ou negativo, dependendo da natureza do polímero ou material usado para modificar a superfície. Geralmente este efeito é obtido através de dois métodos: (a) revestimento da superfície com polímeros/tensoativos hidrofílicos; e (b) desenvolvimento de copolímeros biodegradáveis com segmentos hidrofílicos (SOPPIMATH, 2001).

Desde a descoberta de polissacarídeos na superfície de células e a alta afinidade da quitosana por membranas celulares, vários pesquisadores têm utilizado a quitosana e seus derivados como materiais de revestimento para sistemas nanoestruturados (JANES *et al.*, 2001). A quitosana é um polímero biodegradável policatiônico, com excelente propriedade de formação de filme e, por isso, é utilizada como material de revestimento em aplicações para *drug delivery*. Obtida a partir da desacetilação da quitina, é um polissacarídeo biocompatível e abundante na natureza, presente principalmente na carapaça de crustáceos marinhos. Estruturalmente é similar à celulose, originada por ligações monossacarídicas lineares β (1 \rightarrow 4) e composta por unidades 2-amino-2-deoxi- β -D-glucano combinadas a ligações glicosídicas. Os grupamentos amino primários conferem propriedades especiais à quitosana tais como carga positiva e mucoadesividade (AGNIHOTRI, 2004).

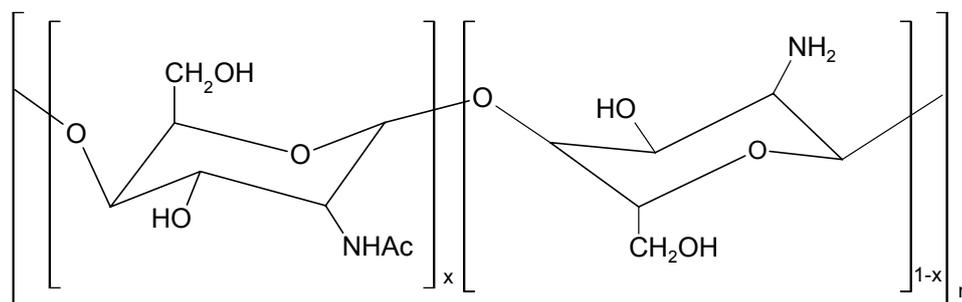


Figura 3. Estrutura química do polímero quitosana, onde x = grau de acetilação e n = número de unidades por polímero (Adaptado de RINAUDO, 2006).

A quitosana e seus derivados têm sido utilizados com sucesso como agentes de revestimento para lipossomas com diâmetros na ordem de nanômetros criando um sistema híbrido denominado de quitossoma (MERTINS *et al.*, 2005; MERTINS *et al.*, 2006; MARÓN *et al.*, 2007). Lipossomas com carga de superfície negativa são capazes de adsorver fortemente quitosana solúvel por incubação, mudando significativamente as propriedades de superfície da partícula e a estabilidade da suspensão (MERTINS *et al.*, 2006; JANES *et al.*, 2001). Também micropartículas revestidas por quitosana oferecem muitas vantagens, como uma melhora no aumento da carga de fármacos, propriedade bioadesiva e vantagens na liberação prolongada de fármacos em comparação com as partículas não revestidas (AGNIHOTRI, *et al.*, 2004).

Uma abordagem distinta foi adotada por Calvo e colaboradores (1997a) para o desenvolvimento de nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsões revestidas por quitosana, baseando-se em metodologias bem conhecidas como a técnica do deslocamento de solvente e da evaporação de solvente. Os autores adicionaram a estas técnicas uma estratégia chave: a incorporação de quitosana à fase aquosa das formulações, na qual ocorre a formação das estruturas coloidais. Desta forma, os pesquisadores desenvolveram estudos acerca da produção de nanoemulsões revestidas por quitosana, nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas por quitosana e nanoesferas de poli(ácido lático-co-glicólico) revestidas por quitosana. No caso das nanoesferas, as moléculas de quitosana se apóiam na superfície das partículas devido a enredamentos entre as cadeias poliméricas, resultando então em uma estrutura nuclear revestida. Já no caso das nanocápsulas e nanoemulsões, há uma adsorção da quitosana às nanoestruturas fortemente mediada por interação iônica com moléculas fosfolipídicas situadas na superfície destes sistemas coloidais (CALVO *et al.*, 1997a; JANES *et al.*, 2001; VILA *et al.*, 2002; DE CAMPOS *et al.*, 2003).

Diferentes polímeros vêm sendo usados como promotores da penetração através de pele e mucosas. Sais de quitosana e trimetilquitosana são capazes de aumentar a permeabilidade paracelular do epitélio de mucosas como a mucosa intestinal, nasal e bucal por abertura das *tight junctions*, desta forma, aumentando a absorção paracelular de fármacos macromoleculares e hidrofílicos. Nos últimos anos

provou-se que as *tight junctions* também ocorrem na camada granular da epiderme sendo possível, portanto, que a quitosana também promova penetração percutânea pelo mesmo mecanismo (VALENTA, 2004).

Calvo e colaboradores (1997b) realizaram um estudo com o propósito de avaliar o potencial dos novos sistemas coloidais, nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) positivamente carregadas, como carreadores de fármacos oculares. Uma vez que o epitélio ocular é negativamente carregado, dois tipos de nanocápsulas contendo indometacina foram preparadas usando como polímero a poli(ϵ -caprolactona), uma revestida com quitosana e a outra com poli-L-lisina, ambas possuindo carga de superfície positiva, e uma terceira formulação de nanocápsulas sem revestimento contendo indometacina, apresentando carga de superfície negativa. A análise do tamanho das partículas indicou que o diâmetro foi afetado pela natureza do revestimento, variando então entre 238 nm (nanocápsulas não revestidas), 251 nm (nanocápsulas revestidas com poli-L-lisina) e 384 nm (nanocápsulas revestidas com quitosana). Estudos *in vivo* realizados na córnea de coelhos demonstraram que estes sistemas aumentaram significativamente a quantidade de indometacina na córnea e no humor aquoso, comparados a um colírio comercial. Entretanto, a capacidade em melhorar a penetração da indometacina na córnea foi substancialmente diferente entre as formulações desenvolvidas: o revestimento de quitosana proporcionou uma penetração duas vezes maior, enquanto o revestimento por poli-L-lisina foi ineficaz no aumento da biodisponibilidade ocular da indometacina quando comparadas às nanopartículas não revestidas. Diante disso, foi concluído que o fator responsável pelo aumento na penetração através da mucosa ocular não seria a carga de superfície, mas sim a natureza específica da quitosana que propicia mucoadesão ao epitélio córneo e o efeito da mesma sobre as *tight junctions* do epitélio córneo.

A influência da característica da superfície de carreadores coloidais de fármacos na interação com diferentes superfícies biológicas tem se tornado cada vez mais evidente. Por isso, De Campos e colaboradores (2003), a fim de investigar a importância destas características sobre a interação com a mucosa ocular, desenvolveram três tipos de nanocápsulas que se diferenciavam nas propriedades de superfície: nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona), nanocápsulas de poli(ϵ -

caprolactona) revestidas com quitosana e nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com poli(etileno-glicol), todas encapsulando o corante fluorescente rodamina e preparadas a partir do método da deposição interfacial do polímero pré-formado. Pode-se observar que as propriedades físico-químicas das partículas foram afetadas fortemente pelo tipo de revestimento. As partículas revestidas por quitosana apresentaram aumento no diâmetro médio e levaram à inversão do potencial de superfície (de negativo para positivo). Por outro lado, o potencial de superfície daquelas revestidas por poli(etileno-glicol) e as sem revestimento não apresentaram diferenças significativas, enquanto o diâmetro médio das partículas foi menor para aquelas revestidas com poli(etileno-glicol). Com o objetivo de avaliar a capacidade do sistema desenvolvido em melhorar a penetração de moléculas bioativas no epitélio córneo, um estudo *ex vivo* foi conduzido utilizando espécies córneas de coelhos que foram examinadas por microscopia confocal de varredura a laser. O transporte de rodamina ao longo da córnea foi significativamente aumentado pela presença física das nanocápsulas revestidas por quitosana, sugerindo que estes sistemas possuem propriedades que melhoram a absorção e podem atuar como carreadores oculares.

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- *Substância ativa:*

Benzofenona-3 (Delaware, Brasil).

- *Polímero biodegradável:*

Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) $\overline{M}_w = 65000 \text{ g.mol}^{-1}$ (Aldrich, França).

- *Tensoativos:*

Lipofílico: Span 60[®] (Monoestearato de sorbitano) (Sigma-Aldrich, Brasil);

Epikuron 170[®] (fosfatidilcolina de soja, 70%) (Lucas Meyer, França).

Hidrofílico: Tween 80[®] (Polissorbato 80) (Delaware, Brasil).

- *Fase oleosa:*

Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (Brasquim, Brasil).

- *Revestimento da parede polimérica:*

Quitosana - grau de desacetilação 85,3 % (Polymar, Brasil).

4.1.2 Aparelhos e Equipamentos

- Evaporador rotatório (Büchi - Alemanha);
- Bomba de vácuo V-500 (Büchi Vac[®] - Alemanha);
- Potenciômetro B474 (Micronal - Brasil);
- Agitador Certomat MV (Vitaris – Alemanha);

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Central Analítica 1 - Faculdade de Farmácia - UFRGS):
 - Injetor S-200 (Perkin-Elmer – EUA);
 - Detector UV-VIS S-200 (Perkin-Elmer – EUA);
 - Bomba S-200 (Perkin-Elmer – EUA);
- Espectrômetro de auto-correlação laser - Zetasizer nanoseries - modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments – Reino Unido);
- Banho Termostatizado (Ika - Brasil);
- Banho de ultrassom TransSonic T460 (Elma - Brasil);
- Centrífuga 5804 (Eppendorf - Brasil);
- Turbiscan LAb (Formulaction - França);
- Viscosímetro Brookfield LV-DV-II+Pro;
 - Spindles ULA e SC4-25.
- Celula de difusão de Franz (fabricação própria);
- Medidor de espessura (Mitutoyo - China).

4.1.3 Solventes e outros materiais

- Acetonitrila grau CLAE (Omnisolv, EUA);
- Acetona (Nuclear e Quimex, Brasil);
- Água destilada;
- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli-Q[®] - Millipore, EUA);
- Ácido acético (Synth, Brasil);

- Metanol grau CLAE (Merck, Brasil);
- Membrana 0,45 μm (Millipore, EUA);
- Pré-coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (Merck, Alemanha);
- Coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (Merck, Alemanha);
- Perclorato de tetrabutilamônio (Akros, EUA);
- Natrosol[®] (Hidroxi-etil-celulose) (DEG, Brasil);
- Pele de abdômen de porcos fêmeas (Abatedouro Araldi, Nova Roma do Sul – Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas

Foram preparadas duas formulações de suspensão de nanocápsulas: a primeira contendo poli(ϵ -caprolactona) como parede polimérica e a segunda, apresentando revestimento da parede polimérica com quitosana, ambas obtidas através do método de deposição interfacial de um polímero pré-formado (nanoprecipitação), desenvolvido por Fessi e colaboradores (1989).

A obtenção das suspensões de nanocápsulas iniciou-se com a preparação da fase orgânica, dissolvendo-se a benzofenona-3, a poli(ϵ -caprolactona), os triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico e o tensoativo de baixo EHL (Span 60[®] ou Epikuron[®]) em acetona, sob aquecimento em banho-maria a 37° C; e da fase aquosa, dissolvendo-se o Tween 80 em água MilliQ[®], à temperatura ambiente. Em seguida, a fase orgânica foi vertida lentamente e sob agitação moderada, à temperatura ambiente, através de um funil estreito, sobre a fase aquosa. Após a formação imediata das nanocápsulas, a suspensão foi mantida sob agitação moderada durante 10 minutos. Em seguida procedeu-se em evaporador rotatório sob pressão reduzida, a eliminação do solvente orgânico e parte da água para ajuste da concentração final da benzofenona-3 em 3 mg/mL. As suspensões foram armazenadas em frascos de vidro âmbar. O revestimento catiônico se deu através de incubação de uma solução de quitosana à suspensão de nanocápsulas previamente obtida, sendo deixadas posteriormente sob agitação magnética por 1 hora.

Um estudo foi realizado para a escolha da concentração adequada de quitosana a ser utilizada no revestimento. Com base na literatura (CALVO *et al.*, 1997; DE CAMPOS *et al.*, 2003; CUI *et al.*, 2006), foram selecionadas para os testes as soluções de quitosana em ácido acético 1 % nas concentrações de 1, 2 e 3 % (p/v).

A tabela 2 apresenta a composição quali-quantitativa das formulações de nanocápsulas (NC) preparadas utilizando Span 60[®] (S) ou Epikuron 170[®] (E) e solução de quitosana a 2 % (Q) para o revestimento catiônico.

Tabela 2. Composição das nanocápsulas poliméricas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana.

Componentes	Formulações			
	NC-S-B3 ^a	NC-Q-S-B3 ^b	NC-E-B3 ^c	NC-Q-E-B3 ^d
Fase Orgânica				
Poli(ε-caprolactona)	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
Trig. Ác. Cáprico/capríl.	0,33 mL	0,33 mL	0,33 mL	0,33 mL
Benzofenona-3	30 mg	30 mg	30 mg	30 mg
Span 60 [®]	77 mg	77 mg		
Epikuron 170 [®]			77 mg	77 mg
Acetona	27 mL	27 mL	27 mL	27 mL
Fase Aquosa				
Água MilliQ	53 mL	53 mL	53 mL	53 mL
Tween 80	77 mg	77 mg	77 mg	77 mg
Sol. Quitosana 2%	-	1 mL	-	1 mL

^a NC-S-B3 (nanocápsulas preparadas com Span 60[®] e benzofenona-3); ^b NC-Q-S-B3 (nanocápsulas com revestimento catiônico de quitosana, preparadas com Span 60[®] e benzofenona-3); ^c NC-E-B3 (nanocápsulas preparadas com Epikuron 170[®] e benzofenona-3); ^d NC-Q-E-B3 (nanocápsulas com revestimento catiônico de quitosana, preparadas com Epikuron 170[®] e benzofenona-3).

* Valores correspondentes a um volume final de 10 mL.

4.2.2 Caracterização das suspensões de nanocápsulas poliméricas

4.2.2.1 Doseamento da benzofenona-3 nas suspensões de nanocápsulas

O doseamento da benzofenona-3 foi realizado a partir da adaptação da metodologia descrita por Sarveiya e colaboradores (2004). As suspensões foram tratadas com acetonitrila, a fim de ocasionar a dissolução das nanocápsulas. A quantificação de benzofenona-3 foi, então, realizada por cromatografia de alta eficiência (CLAE), a 289 nm. Utilizou-se acoplada à coluna de aço inoxidável LiChrosorb RP-18 Merck, uma pré-coluna com fase estacionária LiChrosorb RP-18 4 mm (Merck). A fase móvel foi constituída de uma mistura de metanol:água (95:5 v/v), tetrabutylamônio 4 (mg/%) e ácido acético 10 % para ajuste a pH 4,0 e o fluxo utilizado foi de 1 mL/min. O doseamento das formulações foi realizado em triplicata.

Curva padrão

A curva de calibração foi preparada por análise, em CLAE, a partir de soluções de concentrações crescentes de benzofenona-3 em acetonitrila. A solução-mãe foi preparada a partir de 25 mg de benzofenona diluída em 50 mL de acetonitrila. A partir da solução-mãe foram preparadas soluções com as seguintes concentrações: 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL e 40 µg/mL. A metodologia foi validada em termos de especificidade, linearidade, precisão e exatidão, segundo as normas descritas pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH, 1996) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003)(Anexo 1).

4.2.2.2 Determinação das taxas de associação da benzofenona-3 às nanocápsulas

A quantidade de substância ativa associada às nanoestruturas foi determinada por CLAE, pela diferença entre a quantidade total de benzofenona-3 na formulação e a quantidade presente na fase aquosa da suspensão (benzofenona-3 não associada). A quantidade total foi determinada pela dissolução das nanocápsulas em acetonitrila, a partir de uma amostra da suspensão.

Para a determinação da quantidade de benzofenona-3 presente na fase aquosa, foi realizada ultrafiltração-centrifugação das suspensões (Ultrafree[®] - MC Milipore 10000) a 2000 rpm, duas vezes por 5 minutos. Dessa forma, as nanocápsulas ficaram retidas e a benzofenona-3 não associada ultrapassou a membrana, de forma que pode ser quantificada no ultrafiltrado, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas descritas para a determinação da quantidade total de benzofenona-3. A determinação da taxa de associação das suspensões foi realizada em triplicata.

4.2.2.3 Determinação do pH

O pH das formulações foi medido em potenciômetro calibrado, diretamente nas suspensões coloidais, em seguida à preparação e após 30 dias de

armazenamento à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.2.4 Determinação do diâmetro médio das partículas e polidispersão

O diâmetro médio e a polidispersão das nanocápsulas em suspensão foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer nanoseries, Malvern Instruments, modelo ZEN 3600). Para análise, as suspensões de nanocápsulas foram diluídas 500 vezes em água MilliQ[®] e filtradas em filtro Millipore[®] 0,45 µm. Estas análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.2.5 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das suspensões foi determinado através de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer nanoseries, Malvern Instruments, modelo ZEN 3600, com um correlator Série 7032 Multi-8). Esta determinação foi realizada após diluição das amostras em NaCl 10 mM. Estas análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.2.6 Análise em Turbiscan LAb[®]

As suspensões de nanocápsulas foram submetidas à análise em Turbiscan LAb (Formulation, France). Através deste equipamento é possível determinar a ocorrência de fenômenos como cremagem, sedimentação, coalescência e mesmo a homogeneidade da amostra, baseando-se numa técnica que combina transmissão e retroespalhamento de luz com uma fonte de infravermelho próximo e detectores que medem a intensidade da luz refletida ou transmitida que atinge a amostra (LEMARCHAND *et al.*, 2003). As amostras (20 mL) foram colocadas em cubetas de vidro e as análises foram conduzidas a 40 °C durante 3 h, com leituras a cada 5 minutos.

4.2.2.7 Análise morfológica

As fotomicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1200 ExII, operando a 80 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As amostras das suspensões de nanocápsulas foram diluídas em água MilliQ[®] na proporção de 1:100, e preparadas em *grids* com filme de Formwar-Carbono (Electron Microscopy Sciences), utilizando-se como contraste uma solução de acetato de uranila a 2 %.

4.2.2.8 Reologia e determinação da viscosidade das suspensões de nanocápsulas

A viscosidade e análise reológica das suspensões de nanocápsulas foram conduzidas em viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LV-DV-II+Pro, utilizando *spindles* ULA. Estas análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2.9 Análise estatística

A significância estatística das diferenças entre os resultados obtidos para as formulações de nanocápsulas foi calculada por análise da variância em uma via (ANOVA) combinada com teste de Tukey, e também através do teste-t de student (SigmaStat, versão 3.5). Diferenças foram consideradas significativas para $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente.

4.2.3 Preparação da base semi-sólida contendo nanocápsulas de benzofenona-3

Foram preparados géis hidrofílicos à base de Natrosol[®] (1 %) (p/v), nos quais as suspensões de nanocápsulas contendo benzofenona-3 foram incorporadas em substituição à água, e adequadamente homogeneizadas em gral de porcelana até obtenção do gel. Para fins de comparação, foram preparados também um gel contendo benzofenona-3 livre previamente dispersa em Tween 80, em concentração igual ao gel preparado com nanocápsulas, e um gel branco, sem benzofenona-3.

4.2.4 Caracterização das bases semi-sólidas contendo nanocápsulas de benzofenona-3

4.2.4.1 Doseamento de benzofenona-3 nas bases semi-sólidas

Amostras dos géis contendo benzofenona-3 nanoencapsulada foram submetidas à extração do filtro solar com uma mistura de acetonitrila e água MilliQ[®] (3:7, v/v), sob agitação constante por duas horas, em banho-maria à temperatura de aproximadamente 37 °C. Após, o volume de cada amostra foi ajustado para 10 mL e, então, foram filtradas em papel filtro comum. Uma alíquota do filtrado foi retirada e diluída em acetonitrila. Logo após, as amostras foram submetidas à análise por CLAE, seguindo os parâmetros anteriormente determinados. Esta análise foi validada em termos de precisão, exatidão e especificidade, segundo normas descritas pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH, 1996) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003) (Anexo 2).

4.2.4.2. Análise em Turbiscan[®]

As bases semi-sólidas foram submetidas à análise em Turbiscan LAB (Formulation, France), a fim de se verificar fenômenos de instabilidade física, como cremagem, sedimentação, coalescência e mesmo a homogeneidade da amostra, baseando-se numa técnica que combina transmissão e retroespalhamento de luz com uma fonte de infravermelho próximo e detectores que medem a intensidade da luz refletida ou transmitida que atinge a amostra. As amostras (20 mL) foram colocadas em cubetas de vidro e as análises foram conduzidas a 40 °C durante 3 horas, com leituras a cada 5 minutos.

4.2.4.3 Análise morfológica das nanocápsulas após incorporação na base semi-sólida

As fotomicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1200 ExII, operando a 80 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica

da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As amostras dos hidrogéis contendo nanocápsulas foram diluídas em água MilliQ[®] na proporção de 1:50, e preparadas em *grids* com filme de Formwar-Carbono (Electron Microscopy Sciences), utilizando-se como contraste uma solução de acetato de uranila a 2 %.

4.2.4.4 Determinação do diâmetro das nanocápsulas após incorporação nos hidrogéis

O diâmetro médio das nanocápsulas, após incorporação nos hidrogéis, foi determinado por espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer nanoseries, Malvern Instruments, modelo ZEN 3600). Para análise, os hidrogéis, contendo nanocápsulas ou não, foram diluídos 1000 vezes em água MilliQ[®], submetidos ao vórtex até completa dispersão e então as suspensões foram filtradas em filtro Millipore[®] 0,45 µm. Estas análises foram graficadas com relação ao número de partículas e conduzidas em triplicata.

4.2.4.5 Determinação do potencial zeta dos hidrogéis após incorporação das nanocápsulas

O potencial zeta dos hidrogéis após incorporação das nanocápsulas foi determinado através de mobilidade eletroforética (Zetasizer nanoseries, Malvern Instruments, modelo ZEN 3600, com um correlator Série 7032 Multi-8). Esta determinação foi realizada após diluição das amostras em NaCl 10 mM, submetendo-as posteriormente ao vortex até completa dispersão do hidrogel. Estas análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.4.6 Reologia dos géis contendo nanocápsulas de benzofenona-3

A análise reológica dos géis contendo suspensões de nanocápsulas foi realizada em viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LV-DV-II+Pro, utilizando *spindles* SC4-25. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

4.2.5 Avaliação da penetração *in vitro* da benzofenona-3 a partir dos géis contendo nanocápsulas de benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana

4.2.5.1 Preparação e estocagem da membrana

A avaliação da penetração *in vitro* das nanocápsulas contendo benzofenona-3 foi realizada utilizando amostras de pele de abdômen de porcas como membrana. As amostras de pele foram obtidas de animais recém sacrificados (Abatedouro Araldi). Após a coleta, as amostras de pele foram limpas, removendo-se o tecido adiposo, e posteriormente estocadas sob refrigeração (- 4 °C) até a utilização nos ensaios. Para os experimentos de penetração, as membranas foram padronizadas com espessura média entre 1,3 mm e 1,6 mm, medidas com auxílio de um medidor de espessura.

4.2.5.2 Células de difusão do tipo *Franz*, *in vitro*

Os estudos de penetração *in vitro* foram conduzidos utilizando células de difusão verticais do tipo Franz modificadas, possuindo um compartimento receptor com capacidade em torno de 6,0 mL e área de difusão média de 2,30 cm² (FRANZ, 1975; VENTER *et al.*, 2001).

Um pedaço circular de membrana natural foi mantido em contato com uma solução receptora de tampão fosfato pH 7.4 e Tween 80 5 %, mantida a 37 °C (± 1° C), e o compartimento inferior permaneceu sob agitação constante com barra magnética de teflon.

As amostras foram cuidadosamente pesadas (6,5 mg/cm²) e aplicadas na pele, onde foram deixadas sob contato por 2, 4 e 8 horas. Após cada período, as células de difusão foram desmontadas e cada área exposta ao produto foi lavada cuidadosamente com água destilada e analisada quanto ao conteúdo de substância ativa retida no estrato córneo, quanto ao conteúdo de substância ativa retida na epiderme/derme e quanto ao conteúdo de filtro solar localizado na solução receptora. As amostras foram submetidas à análise por CLAE, de acordo com as

seguintes condições operacionais: coluna de aço inoxidável LiChrosorb RP-18 Merck, pré-coluna com fase estacionária LiChrosorb RP-18 4 mm (Merck), fase móvel constituída de uma mistura de metanol:água (90:10 v/v), tetrabutylamônio 4 (mg/%) e ácido acético 10 % para ajuste a pH 4,0 e o fluxo utilizado foi de 0,9 mL/min. Esta metodologia de quantificação foi validada de acordo com as normas preconizadas pelo ICH e pela ANVISA (Anexo 3). Os resultados da penetração cutânea *in vitro* foram analisados estatisticamente, comparando-os aos resultados obtidos a partir da quantificação da substância ativa encapsulada presente nas bases semi-sólidas, com a benzofenona-3 livre incorporada nas bases semi-sólidas.

4.2.5.3. Técnica do *tape stripping* – retenção no estrato córneo

As camadas do estrato córneo foram retiradas aderindo à fita adesiva na área exposta ao produto. Para tanto, foram utilizados 19 pedaços de fita adesiva Scotch 3M, medindo 19 x 40 mm para extração do estrato córneo.

As fitas foram pesadas antes e após a extração das camadas da pele e a substância ativa retida nas fitas adesivas foi extraída com acetonitrila. As fitas em conjunto foram colocadas em tubos de ensaio contendo o solvente e submetidas à agitação com agitador de tubo (vórtex) por 2 minutos, e posteriormente levadas ao banho de ultra-som durante 15 minutos (PELLET *et al.*, 1997; VERMA *et al.*, 2003; ABDULMAJED e HEARD, 2004; VERMA e FAHR, 2004; JIMÉNEZ *et al.* 2004). As amostras foram, então, filtradas através de membrana com porosidade 0,45 µm e posteriormente submetidas a doseamento conforme item 4.4.5.2.

4.2.5.4 Técnica de retenção cutânea (TOUITOU *et al.*, 1998; VERMA e FAHR, 2004)

Após a remoção do estrato córneo por *tape stripping*, a pele restante foi picotada e colocada em tubos de ensaio contendo o solvente extrator (acetonitrila). As amostras foram, então, submetidas à agitação em vórtex por 2 minutos, e posteriormente levadas ao banho de ultra-som durante 15 minutos. As amostras foram filtradas através de membrana com porosidade 0,45 µm, e o filtrado submetido à doseamento, conforme o item 4.4.5.2.

4.2.5.5 Análise estatística da penetração cutânea *in vitro* de benzofenona-3 a partir dos géis contendo nanocápsulas de benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana

A significância estatística das diferenças na penetração *in vitro* de benzofenona-3 a partir das nanocápsulas revestidas ou não e benzofenona-3 livre foi calculada por análise da variância em uma via (ANOVA) combinada com teste de Tukey (SigmaStat, versão 3.5). Diferenças foram consideradas significativas para $P < 0,05$.

4.2.6 Descarte de resíduos

O descarte de resíduos químicos seguiu procedimento padrão realizado pela Faculdade de Farmácia – UFRGS, no qual os resíduos gerados foram devidamente rotulados e entregues à Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT) desta Faculdade, que é responsável pelo envio dos resíduos ao Instituto de Química da UFRGS, onde são realizados os procedimentos adequados de reciclagem e/ou descarte do material químico.

5.1. Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana

5.1.1. Determinação dos diâmetros médios, polidispersão, potencial zeta, pH, taxa de associação e doseamento das nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana

Inicialmente foram preparadas suspensões de nanocápsulas utilizando o tensoativo lipofílico Span 60[®] (Tabela 2), partindo da formulação de base estabelecida e utilizada por nosso grupo de pesquisa, a qual, no presente trabalho, foi revestida com quitosana e que contém em sua composição poli(ϵ -caprolactona), triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, Span 60[®], benzofenona-3, água e Tween 80[®].

Para o revestimento das nanocápsulas, foi realizado um estudo preliminar para a escolha da solução de quitosana e de sua concentração final nas suspensões de nanocápsulas. Foram selecionadas soluções aquosas de quitosana em ácido acético 1 % (CALVO *et al.*, 1997a; RINAUDO *et al.*, 1999) nas concentrações de 1, 2 e 3 %, de forma a proporcionar concentração final de 0,2 % de quitosana nas suspensões. Este ensaio foi conduzido com nanocápsulas preparadas com Span 60[®] (Tabela 2).

Tabela 3. Características físico-químicas de nanocápsulas revestidas com diferentes concentrações de quitosana

Solução de quitosana (%)	Conc. de quitosana nas nanocápsulas (%)	Potencial zeta (mV)	Diâmetro (nm)	PDI
1	0,2	-3	355	0,4
2	0,2	22	306	0,3
3	0,2	5	783	0,8

Afim de se otimizar a adsorção da quitosana nas nanocápsulas, as mesmas foram incubadas com diferentes concentrações de quitosana em solução aquosa (Tabela 3). A análise estatística demonstrou que há uma diferença (ANOVA, $P < 0,05$) entre as nanocápsulas preparadas com as soluções a 2 e a 3 % (Tabela 3). Com o aumento da concentração de quitosana ocorre a inversão de valores de potencial zeta de -3 mV para 22 mV, o que indica que o processo de adsorção é mediado por interação eletrostática, como já proposto para a interação entre a poli(ϵ -caprolactona) e a poli-L-lisina (CALVO *et al.*, 1997b). Segundo Sonvico e colaboradores (2006) a quantidade de quitosana na solução aquosa exerce influência significativa sobre o diâmetro e a carga de superfície das nanopartículas. No presente trabalho, o revestimento com solução de quitosana a 3 % gerou nanocápsulas com diâmetro médio acima do desejado (783 nm) e elevada polidispersão (0,8). Por sua vez, a solução de quitosana a 1 % não foi capaz de promover potencial de superfície positivo nas nanocápsulas. Diante dos resultados obtidos, a solução de quitosana a 2 % foi escolhida para conduzir os estudos seguintes, pois as nanocápsulas com ela revestidas apresentaram um diâmetro médio que se enquadra na faixa desejada (306 nm) e baixa polidispersão (0,3). Dessa forma, um novo experimento foi realizado variando as concentrações de quitosana na suspensão de nanocápsulas a partir da solução de quitosana a 2 %, como segue na Tabela 4.

Tabela 4. Características físico-químicas de nanocápsulas revestidas com diferentes concentrações de quitosana

Solução de quitosana (%)	Conc. de quitosana nas nanocápsulas (%)	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro (nm)	PDI
2	0,1	4	889	0,7
2	0,2	22	306	0,3
2	0,3	19	330	0,4

Os resultados demonstram que a quitosana nas diferentes concentrações estudadas foi capaz de conferir potencial zeta positivo às nanocápsulas, porém havendo diferença significativa entre todas as formulações ($P < 0,05$). A formulação contendo 0,1 % de quitosana na suspensão de nanocápsulas proporcionou partículas com polidispersão (0,7) e diâmetro médio elevados (889 nm) e potencial zeta mais próximo de zero (4 mV). Já a formulação contendo 0,3 % de quitosana, apresentou diâmetro relativamente adequado (330 nm) e potencial zeta positivo alto (19 mV), porém com valor de polidispersão relativamente maior (0,4). A quitosana na concentração de 0,2 % na suspensão de nanocápsulas, incubada a partir de uma solução de quitosana a 2 % em ácido acético, foi a que apresentou diâmetro e polidispersão mais próximos da faixa desejada (306 nm), menor polidispersão (0,3) e potencial zeta positivo alto (22 mV), o que permitiu uma clara diferença das nanocápsulas carregadas negativamente, sendo por isso, a escolhida para o revestimento das nanocápsulas. Estes resultados vão ao encontro ao trabalho realizado por Calvo e colaboradores (1997a), que ao estudarem a variação das concentrações de poli(ϵ -caprolactona), lecitina e quitosana nas suspensões de nanocápsulas, observaram que para se obter um sistema coloidal é importante que a concentração de quitosana em solução aquosa não seja maior que 0,2 %.

Porém, estas nanocápsulas revestidas com quitosana apresentaram-se instáveis, pois após três dias de preparação houve aumento de diâmetro (de 306 nm para 472 nm) e polidispersão das partículas (0,6), em análise feita por espalhamento de luz dinâmico. Este fato nos levou a investigar outro tensoativo lipofílico que pudesse substituir o Span 60[®] promovendo nanocápsulas mais estáveis. Como alternativa, o tensoativo Epikuron 170[®] foi escolhido com base em sua ampla utilização na formulação de nanopartículas (CALVO *et al.*, 1997b; MOSQUEIRA *et al.*, 2000; MOSQUEIRA *et al.*, 2001; LBOUTOUNNE *et al.*, 2002; DE CAMPOS *et al.*, 2003).

A análise do diâmetro das formulações indicou que o diâmetro médio tanto das nanocápsulas preparadas com Span 60[®] (NC-S, NC-S-B3, NC-Q-S-B3) como daquelas preparadas com Epikuron 170[®] (NC-E, NC-E-B3, NC-Q-E-

B3) foi afetado pelo revestimento com quitosana, havendo diferenças significativas entre todas as formulações (ANOVA, $P < 0,05$) (Tabela 5). Houve um leve aumento do diâmetro das nanocápsulas revestidas com quitosana (NC-S, 234 nm; NC-S-B3, 260 nm; NC-Q-S-B3, 295 nm; NC-E, 174 nm; NC-E-B3, 175 nm; NC-Q-E-B3, 202 nm) em comparação com as formulações sem revestimento provavelmente em razão da presença de uma camada de quitosana solvatada em torno das partículas (CALVO *et al.*, 1997a; CALVO *et al.*, 1997b).

Para as nanocápsulas preparadas com Span 60[®] houve também uma diferença significativa devido à incorporação de benzofenona-3 (ANOVA, $P < 0,05$), pois os valores passaram de 234 nm (NC-S) para 260 nm (NC-S-B3) (Tabela 2). Isto pode ser explicado pelo fato de que o Span 60[®] encontra-se dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas, dessa forma promovendo um aumento no volume interno (MÜLLER *et al.*, 2001), fato este intensificado pela adição da benzofenona-3, que encontra-se, em tese, também dissolvida no núcleo oleoso das nanocápsulas, promovendo um aumento adicional no diâmetro médio das partículas.

O uso de diferentes tensoativos na fase orgânica também influenciou significativamente o diâmetro médio das nanocápsulas (teste-t, $P < 0,001$), sendo que aquelas preparadas com Epikuron 170[®] apresentaram diâmetros inferiores (NC-E, 174 nm; NC-E-B3, 175 nm; NC-Q-E-B3, 202 nm) aos das nanocápsulas preparadas com Span 60[®] (NC-S, 234 nm; NC-S-B3, 260 nm; NC-Q-S-B3, 295 nm) (Tabela 5). Todas as formulações apresentaram baixa polidispersão e mantiveram-se estáveis por 30 dias, exceto aquelas suspensões de nanocápsulas preparadas com Span 60[®] e revestidas por quitosana, que foram instáveis após 30 dias de armazenamento, havendo aumento significativo do diâmetro (de 295 nm para 2215 nm) (Tabela 3). Este resultado pode ter ocorrido pela ausência de tensoativo suficiente para estabilizar a quitosana empregada como revestimento, uma vez que o Span 60[®] encontra-se dissolvido no núcleo (MÜLLER *et al.*, 2001). Por sua vez, o Epikuron 170[®] está situado na interface entre a parede polimérica e o núcleo oleoso na forma de um complexo entre a poli(ϵ -caprolactona) e a fosfatidilcolina

(DURO *et al.*, 1999; LBOUTOUNNE *et al.*, 2002), além de possuir caráter aniônico, características estas que facilitam a interação com a quitosana.

Os resultados demonstraram que as nanocápsulas sem quitosana (NC-S-B3 e NC-E-B3) apresentaram valores de potencial zeta negativos, como descrito na literatura para nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; CALVO *et al.*, 1997a; DE CAMPOS *et al.*, 2003). Por outro lado, as nanocápsulas revestidas por quitosana (NC-Q-S-B3 e NC-Q-E-B3) apresentaram valores de potencial zeta positivos (21 mV, para ambas formulações), que podem ser atribuídos à presença dos radicais NH_3^+ na estrutura da quitosana, e que indicam que estas partículas encontram-se revestidas pelo biopolímero catiônico (CALVO *et al.*, 1997a).

Tabela 5. Características das nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana, preparadas a partir de diferentes tensoativos lipofílicos, determinadas imediatamente após preparação e 30 dias após armazenamento.

0 dias						
Amostras	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Teor* (%)	Taxa de associação (%)	pH
NC-S ^a	234	0,2	-12	-	-	6,7
NC-S-B3 ^b	260	0,2	-12	100,3	100	6,4
NC-Q-S-B3 ^c	295	0,2	21	102,5	100	4,4
NC-E ^d	174	0,1	-9	-	-	6,8
NC-E-B3 ^e	175	0,1	-8	99,8	99	6,5
NC-Q-E-B3 ^f	202	0,1	21	99,8	99	4,3
30 dias						
Amostras	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Teor* (%)		pH
NC-S ^a	231	0,2	-7	-	-	6,6
NC-S-B3 ^b	263	0,2	-12		101	5,8
NC-Q-S-B3 ^c	2215	0,8	13		101,8	4,8
NC-E ^d	170	0,1	-7		-	6,8
NC-E-B3 ^e	171	0,1	-8		102,5	3,6
NC-Q-E-B3 ^f	177	0,2	22		102,2	4,4

* Teor correspondente à concentração de 3 mg/mL de benzofenona-3 nas suspensões de nanocápsulas. ^a NC-S: nanocápsulas preparadas com Span 60[®], sem benzofenona-3; ^b NC-S-B3: nanocápsulas preparadas com Span 60[®], contendo benzofenona-3; ^c NC-Q-S-B3: nanocápsulas preparadas com Span 60[®], contendo benzofenona-3 e revestidas com

quitosana; ^d NC-E: nanocápsulas preparadas com Epikuron 170[®], sem benzofenona-3; ^e NC-E-B3: nanocápsulas preparadas com Epikuron 170[®], contendo benzofenona-3; ^f NC-Q-E-B3: nanocápsulas preparadas com Epikuron 170[®], contendo benzofenona-3 e revestidas com quitosana.

Pode-se observar que não houve alteração no potencial zeta das formulações não revestidas (NC-S-B3 e NC-E-B3) durante os primeiros 30 dias, bem como para a formulação revestida por quitosana contendo Epikuron 170[®] (NC-Q-E-B3). Entretanto, a formulação revestida por quitosana contendo Span 60[®] (NC-Q-S-B3) apresentou uma diminuição nos valores de potencial zeta após 30 dias (de 21 mV para 13 mV), o que demonstra mais uma vez a sua instabilidade.

O doseamento das nanocápsulas quanto ao teor de benzofenona-3, para todas as formulações, foi de aproximadamente 100 % imediatamente após a preparação e 30 dias depois. Todas as formulações apresentaram excelentes taxas de associação, que sugerem que a benzofenona-3 está completamente associada às nanocápsulas, dispersa no núcleo oleoso ou adsorvida à parede polimérica.

Os valores de pH das suspensões de nanocápsulas foram condizentes com a literatura (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), estando dentro da faixa de pH adequada para aplicação cutânea, entre 4,5 e 6,0 (WILKINSON e MOORE, 1990; BARATA, 2002).

Considerando os resultados acima expostos, as formulações de nanocápsulas preparadas com Epikuron 170[®] revestidas ou não com quitosana (NC-E-B3 e NC-Q-E-B3) foram selecionadas para a continuidade dos estudos.

5.1.2. Caracterização morfológica das nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana

As fotomicrografias das nanocápsulas demonstram que os diâmetros e a polidispersão das nanocápsulas estão de acordo com as análises realizadas por espectroscopia de correlação de fótons. Pode-se observar que tanto as não

revestidas (NC-E-B3) (Figuras 4A) como as nanocápsulas revestidas (NC-Q-E-B3) (Figura 4B) apresentam-se sob forma esférica, relativamente pouco polidispersas, e com diâmetros médios de acordo com as análises prévias por espalhamento de luz dinâmico (NC-E-B3, 175 nm; NC-Q-E-B3, 202 nm). Contudo, nas nanocápsulas que contem revestimento de quitosana a parede limítrofe partícula/meio externo parece mais definida, o que poderia indicar a presença de uma parede polimérica “dupla”, devido ao revestimento com o biopolímero.

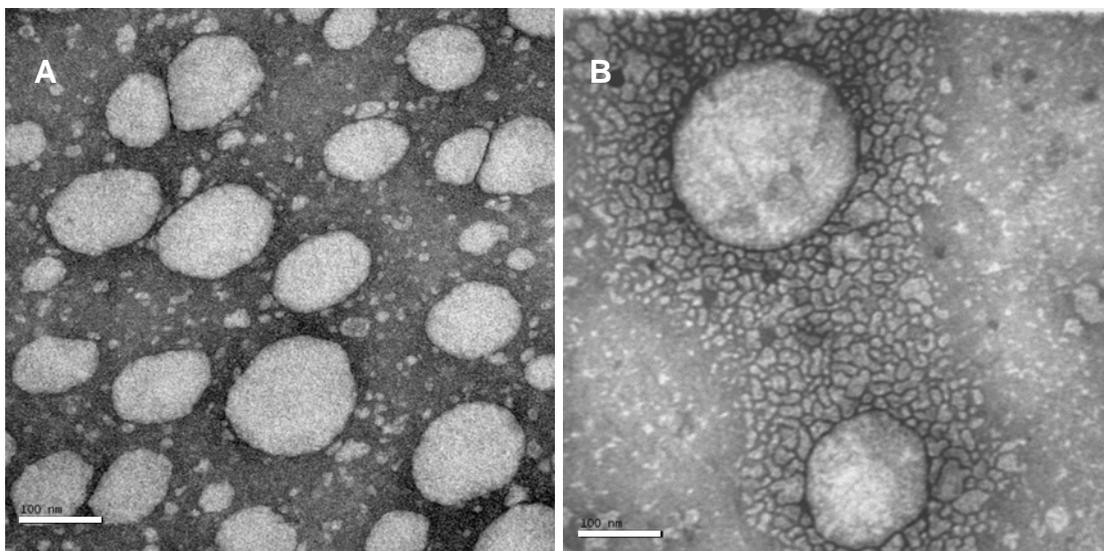


Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão: A) NC-E-B3 e B) NC-QTS-E-B3. 200000 x.

5.1.3. Caracterização reológica e determinação da viscosidade das suspensões de nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana

As suspensões de nanocápsulas NC-E-B3 e NC-Q-E-B3 apresentaram viscosidades médias de 1,2 cP e 2,0 cP, respectivamente, e a análise reológica das suspensões demonstrou que tratam-se de fluidos newtonianos, como pode ser observado nos gráficos de tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento (Figura 5A e 5B). Fluidos newtonianos caracterizam-se por apresentarem viscosidades constantes independentemente da taxa de cisalhamento. Geralmente, materiais quimicamente puros ou soluções muito diluídas

apresentam comportamento newtoniano (MARTIN, 1993; ANSEL, 1999), como é o caso das suspensões de nanocápsulas.

A maior viscosidade observada na formulação NC-Q-E-B3 provavelmente é devido à presença da quitosana. Esta solução de quitosana (2 %) apresentou uma viscosidade igual a 9,9 cP, a 8 rpm à temperatura de 25°C.

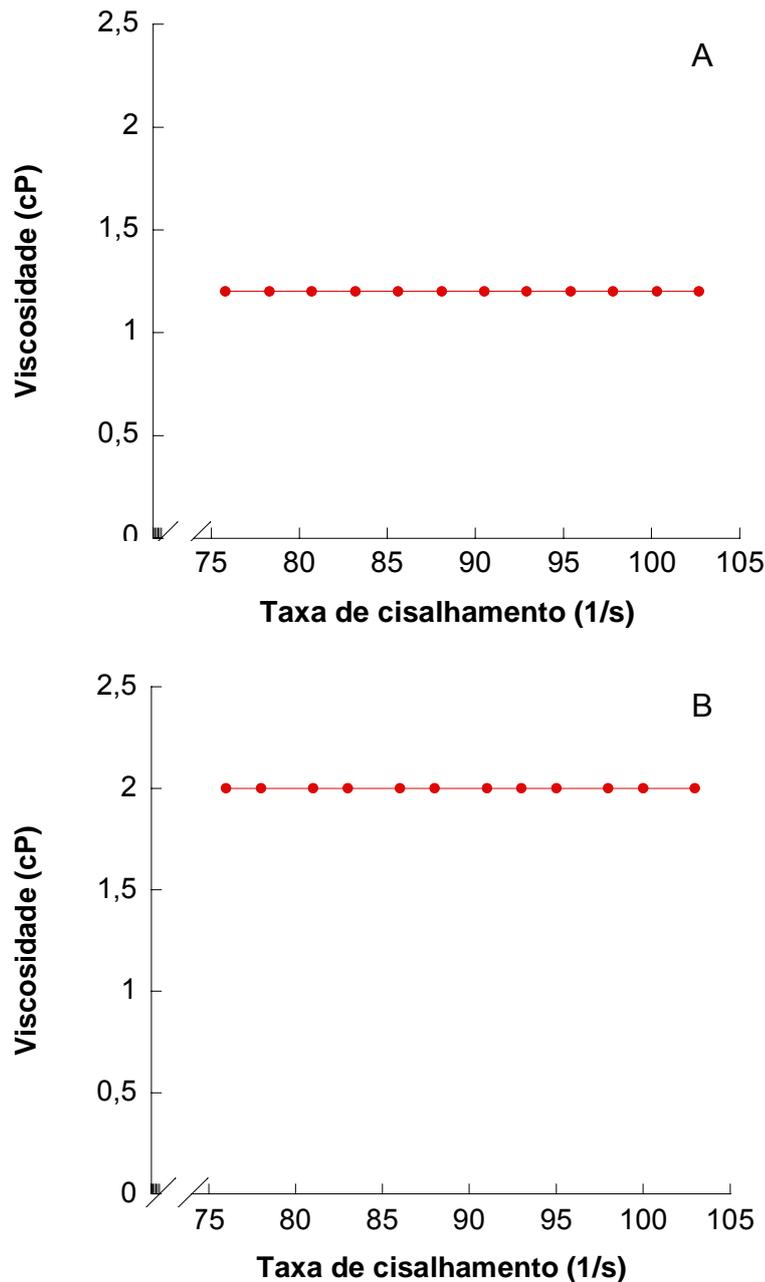


Figura 5. Comportamento newtoniano apresentado pelas suspensões NC-E-B3 (A) e NC-Q-E-B3 (B).

5.1.4. Análise em Turbiscan LAb[®]

O Turbiscan LAb tem sido usado com sucesso no estudo de estabilidade de emulsões (LEMARCHAND *et al.*, 2003) e dispersões coloidais concentradas (MENGUAL *et al.*, 1999). Nestes casos, a desestabilização pode ocorrer pela presença de processos irreversíveis como coalescência ou floculação, ou de processos reversíveis como cremagem ou sedimentação. A principal vantagem desta técnica é a detecção do fenômeno de forma mais fácil e segura do que por observação visual do analista, especialmente no caso de sistemas opacos e concentrados. No caso de sistemas opacos as desestabilizações serão obtidas através de alterações no retroespalhamento de luz, e para sistemas translúcidos isso será visualizado através de alterações nas medidas de transmissão da luz. A desestabilização de uma suspensão freqüentemente é devida a dois tipos de fenômenos físicos: aumento do tamanho de partícula (coalescência) ou agregação de partículas (floculação); e migração das partículas (cremagem ou sedimentação) (MENGUAL *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos mostram que a formulação NC-S-B3 (Figura 6A) é relativamente estável, com leve tendência à cremagem. Observa-se uma pequena diminuição do *backscattering* em torno de 2 a 3 mm, que sugere migração das partículas, e aumento do *backscattering* acima de 40 mm, demonstrando uma tendência à cremagem. A formulação NC-QTS-S-B3 (Figura 6B) foi a que apresentou maior sinal de instabilidade. Em torno de 2 a 3 mm observa-se uma diminuição no *backscattering*, que pode indicar migração das partículas. Já entre 8 e 40 mm é possível notar uma oscilação no gráfico, correspondente à alteração de diâmetro. Oscilações em termos de aumento e diminuição do *backscattering* simultaneamente, indicam que há alteração no tamanho das partículas, havendo presença tanto de partículas da ordem de nanômetros como da ordem de micrômetros. Entretanto, essa alteração nos diâmetros não é significativa uma vez que a percentagem apresentada é muito baixa (< 5 %). Para a formulação NC-E-B3 (Figura 6C) observou-se uma tendência à migração das partículas entre 2 e 3 mm, com diminuição do *backscattering* logo após, estendendo-se até próximo de 40 mm. Há um aumento do *backscattering* em torno de 42 mm, que representa a parte superior da amostra, sugerindo uma tendência à cremagem. Por sua vez, a

formulação NC-QTS-E-B3 (Figura 6D) apresentou-se praticamente estável, com pequeno aumento no *backscattering* em torno de 42 mm, menor que 5 %.

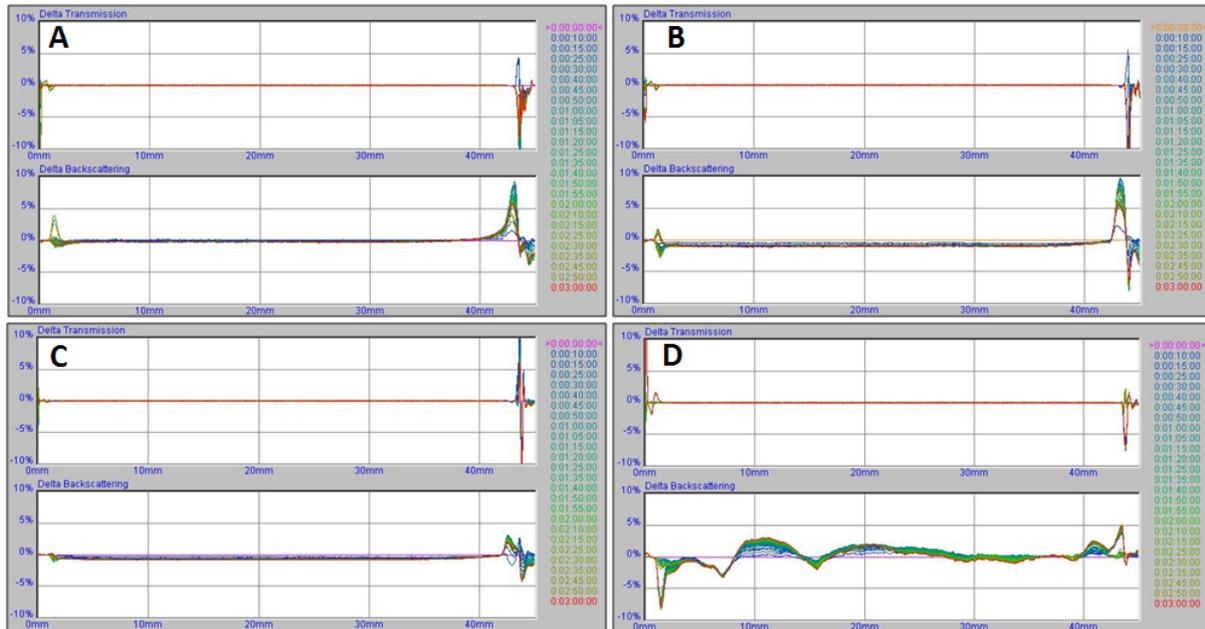


Figura 6. Gráficos de transmissão (acima) e retroespalhamento de luz (abaixo) das suspensões de nanocápsulas: NC-S-B3 (A), NC-Q-E-B3 (B), NC-E-B3 (C) e NC-Q-S-B3 (D).

5.2. Preparação e caracterização da base semi-sólida contendo nanocápsulas de benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana

O Natrosol[®] (hidroxi-etil-celulose) é comumente utilizado na composição de diversas formas farmacêuticas como agente suspensor, estabilizante ou agente de consistência para emulsões e formador de gel não-iônico, comportando-se como fluido não-newtoniano de caráter pseudoplástico e compatível com a maioria dos materiais aniônicos, não-iônicos, anfotéricos e catiônicos (BRAUN & ROSEN, 2000). A característica não-iônica do Natrosol[®] foi determinante para a escolha deste veículo para as nanocápsulas em estudo, uma vez que uma das formulações (NC-Q-E-B3) apresenta potencial de superfície positivo o que a tornaria incompatível com géis de caráter aniônico, como é o caso das resinas do tipo Carbopol[®], as mais usualmente empregadas em formulações de hidrogéis.

Ambos os hidrogéis preparados a partir das suspensões de nanocápsulas revestidas ou não (HEC-NC-Q-B3 e HEC-NC-B3), apresentaram cor branca característica das suspensões de nanocápsulas. Por sua vez, o hidrogel contendo benzofenona-3 livre apresentou-se levemente amarelado, cor característica da benzofenona-3, e translúcido.

No gel preparado com benzofenona-3 livre houve a necessidade de utilizar um tensoativo para dispersar o ativo. Optou-se por usar o Tween 80[®], uma vez que o mesmo está presente na composição das nanocápsulas, desta forma, obtendo-se formulações qualitativamente comparáveis. A quantidade de Tween 80[®] adicionada à formulação semi-sólida foi igual à quantidade do mesmo tensoativo usada no preparo das nanocápsulas.

Todos os hidrogéis preparados apresentaram valores de pH adequados para aplicação cutânea: HEC (pH 6,5), HEC-B3 (pH 6,9), HEC-NC-B3 (pH 6,7) e HEC-NC-Q-B3 (pH 4,6). O baixo pH observado para HEC-NC-Q-B3 é devido à presença da solução ácida de quitosana no revestimento das nanocápsulas. No estado normal, a superfície da pele tem sempre caráter ácido, devido à presença de ácidos orgânicos (acético, propiônico, caprílico e outros, como o láctico, cítrico e ascórbico) que se encontram em concentração elevada devido à evaporação do suor que os contém. Entretanto, o grau de acidez varia com idade, sexo e indivíduo, e o caráter torna-se alcalino à medida que se penetra nos tecidos. Tanto para a cosmetologia como para a dermatologia, é primordial ter em conta as variações do pH cutâneo, pois pode ser fundamental para a boa tolerância dos produtos cosméticos. O pH da pele varia entre 4,0 e 7,0, sendo que diferentes regiões do corpo apresentam diversos valores de pH, tais como: couro cabeludo ($\pm 4,0$), rosto ($\pm 4,7$), axila ($\pm 6,5$), linhas interdigitais ($\pm 7,0$), tronco ($\pm 4,7$), linhas mamárias ($\pm 6,0$) e perna e tornozelo ($\pm 4,5$) (WILKINSON e MOORE, 1990; BARATA, 2002).

5.2.1. Análise reológica dos hidrogéis preparados com benzofenona-3 livre e a partir das suspensões de nanocápsulas contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana

Equações exponenciais têm sido usadas para descrever sistemas pseudoplásticos. O modelo matemático mais simples para expressar o comportamento é a “lei da potência” ou modelo de Ostwald (Equação 2) (BRICEÑO *et al.*, 2000; ALMEIDA e BAHIA, 2003; KIM *et al.*, 2003; ALVES, 2007).

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (2)$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ representa a taxa de cisalhamento, K é o coeficiente de consistência e n é o índice de escoamento ou coeficiente de fluxo, que é adimensional, e pode ser usado para a caracterização das formulações, uma vez que ele caracteriza o desvio em relação ao comportamento newtoniano. Por sua vez, a constante K está relacionada a própria viscosidade do produto e é representada pelas unidades de viscosidade (BRICEÑO, 2000; ALVES, 2007). Estes sistemas podem ser classificados quanto tipo de escoamento em reofluidificantes, quando $n < 1$ (pseudoplástico) ou reofluidificantes com valor de cedência (plásticos) e reoespessantes (dilatantes), quando $n > 1$ (MARTIN *et al.*, 1993; ALMEIDA e BAHIA, 2003; ALVES, 2007).

O comportamento reológico de um sistema e a viscosimetria têm sido estudados com o objetivo de caracterizar um sistema e avaliar a estabilidade físico-química dos produtos diante dos efeitos causados pelo tempo, pela temperatura ou mesmo pela incorporação de substâncias ativas e de carreadores de substâncias, como é o caso dos sistemas nanoparticulados (MILÃO, 2003; ALVES, 2007). Uma forma de quantificar a reologia dos fluídos é a medição da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, que pode ser representada por um reograma através da relação tensão *versus* taxa de cisalhamento (WILKINSON e MOORE, 1990; ALVES, 2007).

O comportamento reológico é determinado pelo maior coeficiente de regressão obtido da equação linear para o modelo matemático. Neste trabalho,

foram realizadas as análises reológicas das amostras HEC-B3, HEC-NC-B3 e HEC-NC-Q-B3, e os resultados de taxas de cisalhamento e tensões de cisalhamento foram plotados (Figura 7) e tratados de acordo com a equação de Oswald (Equação 2).

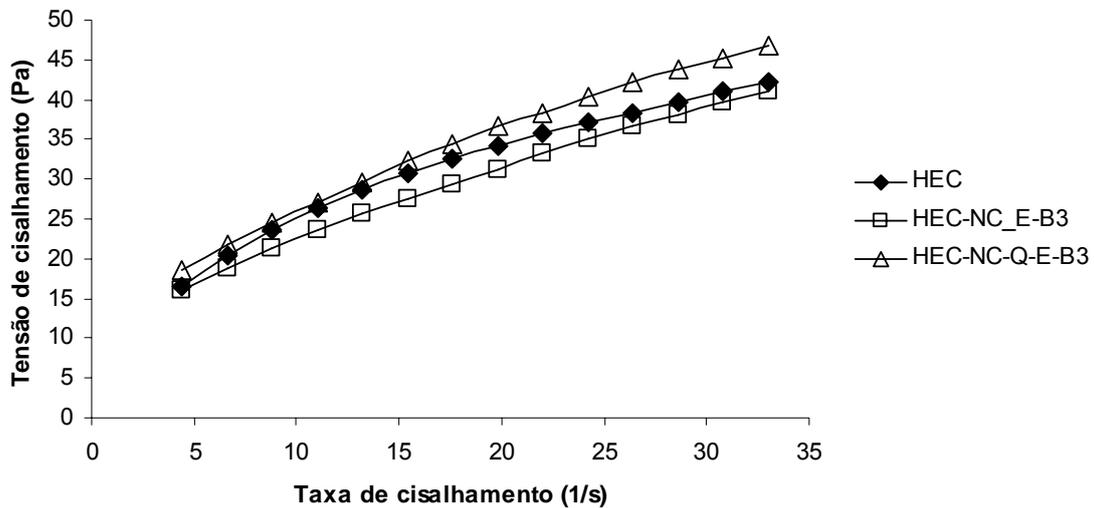


Figura 7. Comportamento reológico dos hidrogéis de Natrosol[®] contendo benzofenona-3 livre (HEC-B3) e nanocápsulas contendo benzofenona-3 não revestidas (HEC-NC-B3) e revestidas com quitosana (HEC-NC-Q-B3).

Os valores dos coeficientes de regressão obtidos para as equações lineares dos hidrogéis foram altos (HEC-B3, $0,996 \pm 0,002$; HEC-NC-B3, $0,996 \pm 0,004$; HEC-NC-Q-B3, $0,998 \pm 0,001$) e estiveram de acordo com o modelo de Ostwald indicando, portanto, que a adição das suspensões de nanocápsulas em completa substituição à água no preparo dos hidrogéis não modificou o comportamento pseudoplástico originalmente conferido aos hidrogéis de Natrosol[®]. Os índices de escoamento (n) obtidos foram menores que 1, estando de acordo com as características de fluidos pseudoplásticos e os índices de consistência (K) não apresentaram diferenças significativas com a adição das nanocápsulas aos hidrogéis (Tabela 6).

Tabela 6. Índices de escoamento (n) e de consistência (K) dos hidrogéis.

Formulações	N	K (Pa. s^{n})
HEC-B3	0,46 ± 0,03	8,66 ± 2,49
HEC-NC-E-B3	0,48 ± 0,02	7,68 ± 1,54
HEC-NC-Q-E.B3	0,48 ± 0,03	8,96 ± 2,59

A presença do revestimento de quitosana nas nanocápsulas também não influenciou o fluxo do gel. O comportamento pseudoplástico ocorre em soluções de polímeros e, na maioria dos sistemas semi-sólidos que contenham componentes poliméricos, em consequência da existência de interações intermoleculares entre as cadeias dos polímeros (WOOD, 2001). Semi-sólidos com concentrações significativas de metil-celulose, carboxi-metil-celulose, carbômero e gomas naturais como adraganta e alginato sódico apresentam escoamento reofluidificante (MARTIN, 1993; ALMEIDA e BAHIA, 2003; ALVES, 2007).

Resultado semelhante foi obtido por Alves e colaboradores (2005) para hidrogéis de Carbopol 940[®] contendo nanocápsulas, nanoesferas ou nanoemulsões de nimesulida. Neste caso, a incorporação dos nanocarreadores não modificou o tipo de fluxo apresentado. Ainda, os géis contendo os nanocarreadores não apresentaram diferenças significativas com relação ao coeficiente de consistência em comparação ao gel controle, sem nimesulida e sem nanocarreadores. Por outro lado, este não foi o caso do gel contendo nimesulida livre, que apresentou um coeficiente de consistência mais elevado.

5.2.2. Doseamento de benzofenona-3 nanoencapsulada presente nas bases semi-sólidas, determinação do diâmetro das nanocápsulas após incorporação

nos hidrogéis e do potencial zeta dos hidrogéis após incorporação das nanocápsulas

Os teores de benzofenona-3 nos hidrogéis (3 mg/mL) preparados a partir das nanocápsulas revestidas (HEC-NC-Q-B3) e não revestidas (HEC-NC-B3) foram ambos iguais a 90 %.

Determinações do diâmetro das partículas foram conduzidas por espalhamento de luz a fim de detectar a presença das nanocápsulas nos hidrogéis. De acordo com a figura 8, observa-se que as nanocápsulas puderam ser detectadas nos hidrogéis após sua incorporação, através de análise do perfil de distribuição de tamanho por número de partículas. Os resultados obtidos para os hidrogéis preparados a partir das suspensões de nanocápsulas indicam diâmetros dentro do intervalo médio obtido para as nanocápsulas antes da incorporação nos hidrogéis.

Foram realizadas determinações do potencial zeta dos hidrogéis após a incorporação das nanocápsulas, com o propósito de verificar a influência do potencial de superfície das nanocápsulas sobre o caráter não-iônico dos hidrogéis. Os resultados demonstraram que os hidrogéis preparados a partir das nanocápsulas não revestidas (HEC-NC-B3) apresentaram potencial zeta negativo, conforme verificado para as suspensões de nanocápsulas (NC-E-B3), entretanto apresentando um valor mais elevado (-17,5 mV) daquele obtido para as suspensões (-8 mV). Por sua vez, o hidrogel preparado com nanocápsulas revestidas por quitosana (HEC-NC-Q-B3) apresentou potencial zeta positivo, da mesma forma como verificado para as nanocápsulas revestidas (NC-Q-E-B3), porém com valor inferior (14,4 mV) aquele obtido para as nanocápsulas (22 mV). Em estudo semelhante, SOUTO e colaboradores (2004) observaram que a adição de nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados carregados negativamente à hidrogéis de hidróxi-etil-celulose, manteve os valores de potencial zeta negativos originalmente verificados para as nanopartículas.

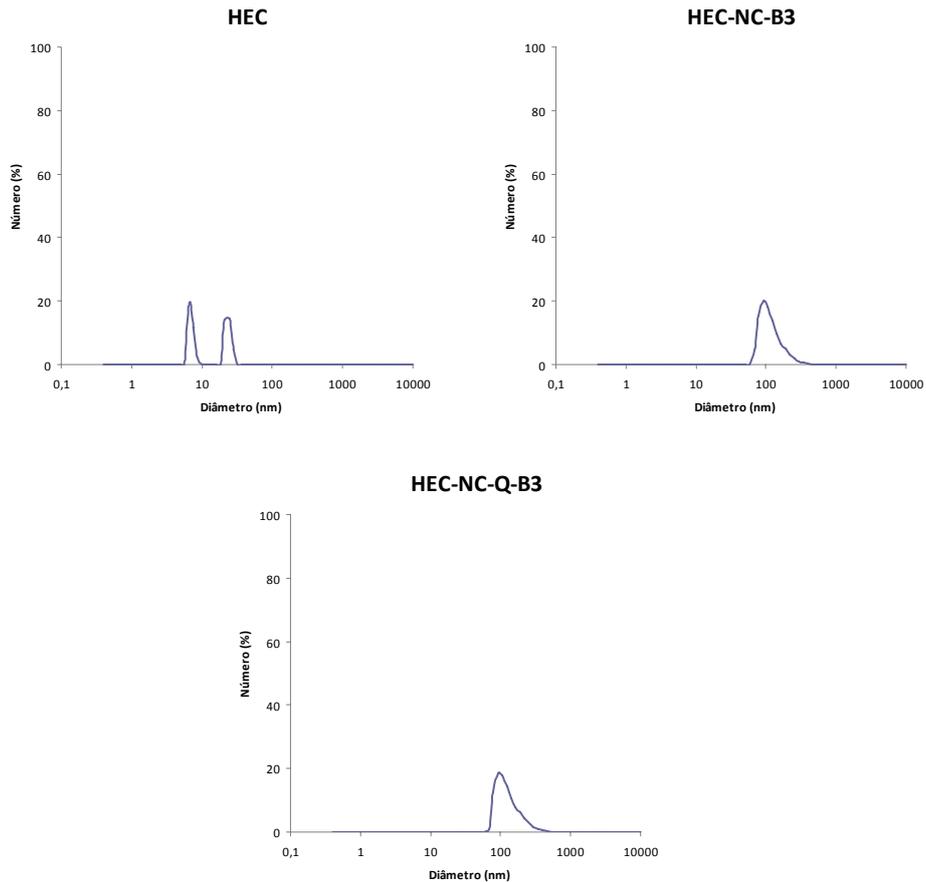


Figura 8. Determinação do diâmetro das nanocápsulas após incorporação nos hidrogéis. (HEC: hidrogel de Natrosol[®] branco; HEC-NC-B3: hidrogel de Natrosol[®] com nanocápsulas sem revestimento contendo benzofenona-3; HEC-NC-Q-B3: hidrogel de Natrosol[®] com nanocápsulas revestidas com quitosana contendo benzofenona-3).

5.2.3. Análise morfológica das nanocápsulas após incorporação na base semi-sólida

Uma vez verificada a presença das nanocápsulas após incorporação nos hidrogéis através da determinação do diâmetro das partículas por espalhamento de luz dinâmico, as mesmas amostras foram submetidas à microscopia eletrônica de transmissão com o objetivo de visualizar a presença das nanocápsulas nos hidrogéis. Como pode ser observado na figura 9, foi possível visualizar as nanocápsulas revestidas (HEC-NC-Q-B3) bem como as não revestidas (HEC-NC-B3) presentes na estrutura matricial do hidrogel.

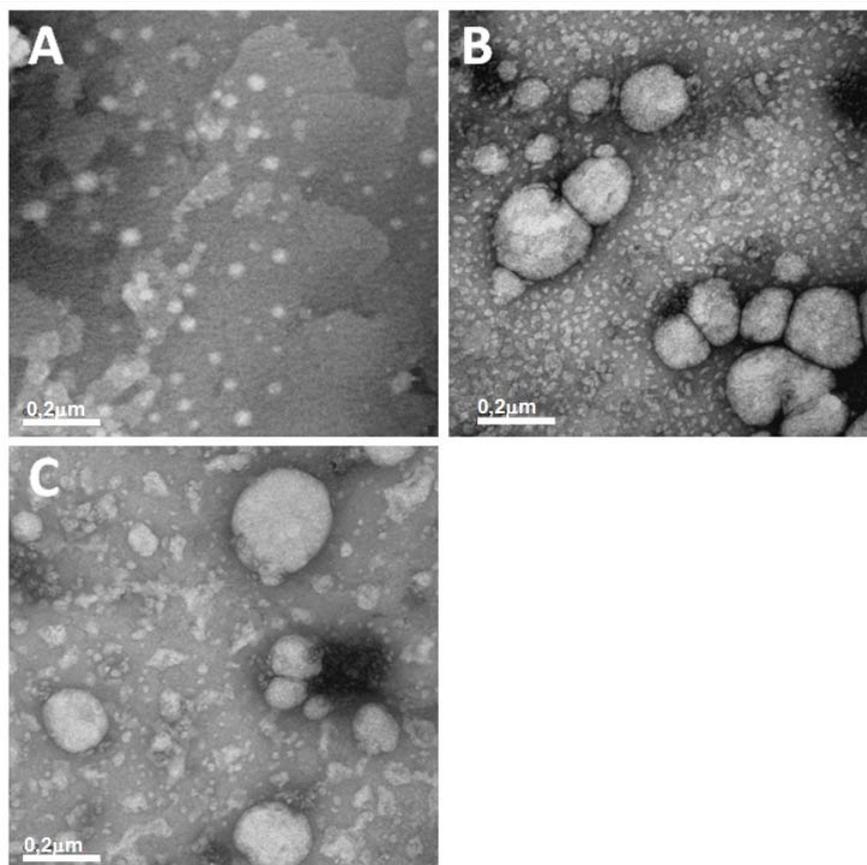


Figura 9. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão do hidrogel com benzofenona-3 livre (A) e hidrogéis preparados a partir de nanocápsulas contendo benzofenona-3 não revestidas (B) e revestidas por quitosana (C). 150000 x.

5.2.4. Análise em Turbiscan LAb[®]

As formulações dos hidrogéis contendo benzofenona-3 (HEC-B3, HEC-NC-B3 e HEC-NC-Q-B3) foram submetidas à análise em Turbiscan LAb[®] a fim de verificar a homogeneidade das amostras. As análises realizadas com os hidrogéis preparados a partir das nanocápsulas, que apresentaram-se opacos e de cor branca, não apresentaram nenhuma tendência à desestabilização, uma vez que as variações do retroespalhamento de luz foram menores que 5 % e portanto, desconsideradas. Para os hidrogéis contendo benzofenona-3 livre, que apresentaram-se levemente amarelados e translúcidos, também não houve nenhuma alteração na transmissão nem no retroespalhamento de luz. Já os hidrogéis sem benzofenona-3, que eram transparentes, apresentaram

aumento na transmissão da luz, entretanto nenhuma alteração foi observada (Figura 10).

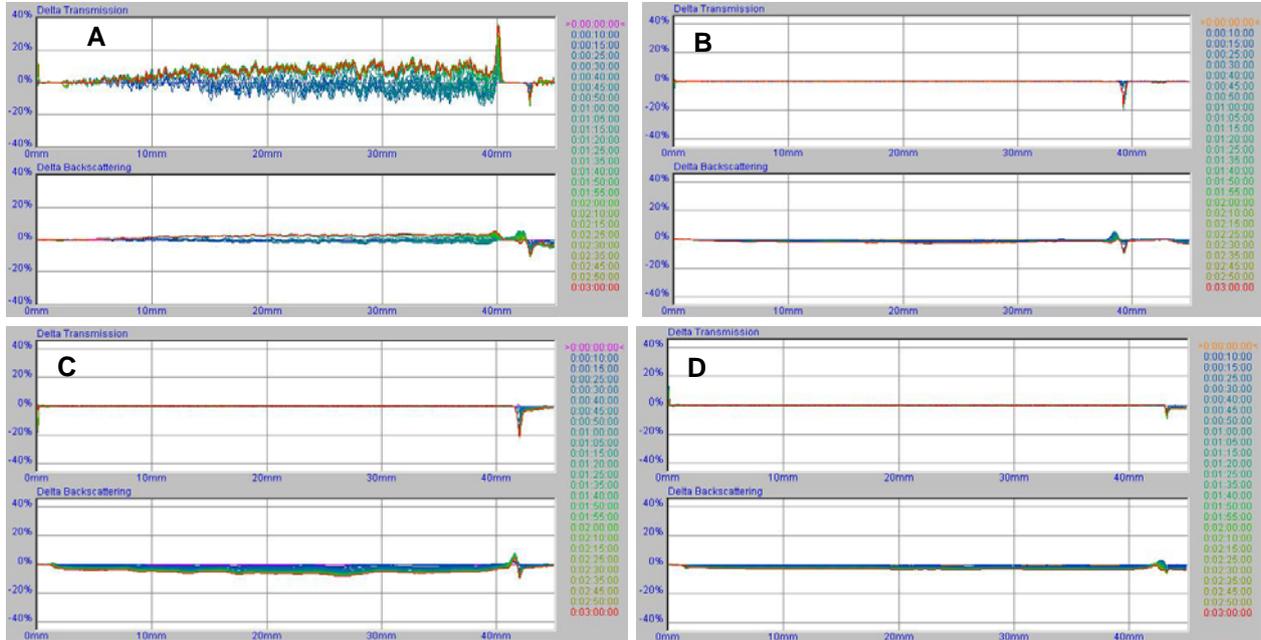


Figura 10. Delta backscattering e delta transmission dos géis de Natrosol® a 1%: a) HEC; b) HEC-B3; c) HEC-NC-E-B3 e d) HEC-NC-QTS-E-B3.

5.3. Avaliação da penetração cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir dos géis contendo nanocápsulas de benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana

Nesta última parte do trabalho, foi avaliada a influência do nanoencapsulamento e também do revestimento de quitosana nas nanocápsulas sobre a alteração do tempo de permanência e penetração da benzofenona-3 na superfície da pele, empregando-se células de difusão de Franz e utilizando como membrana pele de abdômem suíno. O uso da pele de porco foi fundamentado no fato de a epiderme suína ser morfológica e funcionalmente comparável à pele humana (FERNANDEZ, 2000; WEISS, 2007). Este modelo tem sido muito utilizado pela facilidade de aquisição, uma vez que trata-se de resíduo não destinado ao consumo alimentar humano que

geralmente é descartado, e também pela facilidade de preparo, ao contrário da pele humana que é geralmente proveniente de cirurgias plásticas ou cadáveres, e que frequentemente chegam danificadas (FERNANDEZ, 2000).

A análise da penetração cutânea foi realizada comparando-se a quantidade de benzofenona-3 detectada em μg por cm^2 de pele nas diferentes camadas (compartimento doador, estrato córneo, epiderme viável, derme e meio receptor) e também nas 19 fitas adesivas da técnica do *tape stripping*, nos tempos de coleta de 2, 4 e 8 horas. Os tempos de coleta foram determinados levando em consideração que longas aplicações de protetores solares na pele, acima de 12 horas, não são comuns (FERNANDEZ *et al.*, 2000; WEISS, 2007). A quantidade de hidrogel depositada nos compartimentos doadores ao início do experimento foi padronizada em $6,5 \text{ mg/cm}^2$. A tabela 7 apresenta as concentrações de benzofenona-3 determinadas em cada compartimento da pele, doador e meio receptor das células de Franz.

De uma forma geral, os ensaios de penetração *in vitro* realizados com a formulação contendo nanocápsulas revestidas por quitosana (HEC-NC-Q-B3) apresentaram menores desvios padrões, em comparação com a formulação contendo nanocápsulas não revestidas (HEC-NC-B3) e com a benzofenona-3 livre (HEC-B3) o que pode ser compreendido pela excelente capacidade da quitosana em formar filmes homogêneos (AGNIHOTRI *et al.*, 2004; RINAUDO, 2006). Neste caso, o filme homogêneo formado pelas nanocápsulas revestidas por quitosana sobre a pele, permitiu também uma liberação homogênea de benzofenona-3 ao longo da membrana.

A formulação HEC-NC-Q-B3 apresentou uma concentração de benzofenona-3 aproximadamente 2 vezes maior nos tempos 4 e 8 h, e cerca de 3 vezes maior no tempo 2 h no estrato córneo das membranas, quando comparada à HEC-B3 (Figura 11). Já com relação ao HEC-NC-B3 houve um aumento de 150 % na concentração do filtro solar, quando comparada à concentração de benzofenona-3 oriunda de HEC-B3. Pode-se observar que, além do nanoencapsulamento, o revestimento de quitosana sobre as nanocápsulas foi de fundamental importância para a permanência prolongada da benzofenona-3 no estrato córneo, podendo-se concluir que a chave para o

aumento no tempo de permanência deste filtro solar no estrato córneo pode estar relacionado com a superfície modificada das nanocápsulas.

Tabela 7. Concentrações de benzofenona-3 em cada tempo de coleta, nos diferentes compartimentos da pele.

Concentração de benzofenona-3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)				
Compartimento		HEC-B3 ^a	HEC-NC-B3 ^b	HEC-NC-Q-B3 ^c
Doador	2 h	6,452 \pm 2,16	7,545 \pm 4,64	8,449 \pm 1,07
	4h	6,899 \pm 4,31	7,817 \pm 5,61	7,999 \pm 1,95
	8h	4,931 \pm 2,16	7,285 \pm 4,91	5,907 \pm 2,87
Estrato córneo	2 h	0,665 \pm 0,13	1,283 \pm 0,24	1,836 \pm 0,25
	4 h	0,894 \pm 0,75	1,465 \pm 1,98	1,471 \pm 0,30
	8 h	0,711 \pm 0,56	1,095 \pm 1,37	1,312 \pm 0,23
Epiderme viável	2 h	0,727 \pm 0,35	2,200 \pm 0,35	1,548 \pm 0,35
	4 h	1,398 \pm 0,63	1,955 \pm 0,42	1,639 \pm 0,35
	8 h	0,915 \pm 0,39	2,240 \pm 1,20	1,758 \pm 0,35
Derme	2 h	1,902 \pm 0,71	2,789 \pm 0,71	1,550 \pm 0,71
	4 h	2,297 \pm 1,13	3,592 \pm 0,60	1,843 \pm 0,71
	8 h	2,709 \pm 0,37	3,759 \pm 0,96	2,208 \pm 0,71
Receptor	2 h	0,553 \pm 0,07	0,688 \pm 0,07	0,338 \pm 0,07
	4 h	0,916 \pm 0,28	0,525 \pm 0,19	0,348 \pm 0,07
	8 h	1,069 \pm 0,30	0,637 \pm 0,39	0,464 \pm 0,07

^a HEC-B3: hidrogel contendo benzofenona-3 livre; ^b HEC-NC-B3: hidrogel com nanocápsulas não revestidas contendo benzofenona-3; ^c HEC-NC-Q-B3: hidrogel com nanocápsulas revestidas por quitosana contendo benzofenona-3.

O mecanismo de interação da quitosana com a pele, pode ser atribuído à mucoadesividade e/ou interação eletrostática com a pele negativamente

carregada, da mesma forma como já proposto para a interação entre este polissacarídeo e o epitélio ocular (CALVO *et al.*, 1997b; DE CAMPOS *et al.*, 2001; DE CAMPOS *et al.*, 2003).

Por sua vez, o mecanismo de ação das nanocápsulas está relacionado a área específica elevada destes carreadores, uma vez que o reduzido tamanho das partículas garante um contato muito próximo com o estrato córneo (JENNING *et al.*, 2000; ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004). Estes resultados vão ao encontro do estudo realizado por Weiss (2007) utilizando nanocápsulas poliméricas contendo MCO, que após 3 h de ensaio em células de Franz observou que grande parte da dose aplicada do filtro solar estava presente nas camadas mais superficiais da pele (doador e estrato córneo). Após 6 h de experimento, a quantidade de filtro solar nas camadas viáveis aumentou. A quantidade detectada no compartimento doador foi menor entre 3 h e 6 h, enquanto no estrato córneo houve aumento na concentração de metoxicinamato de octila.

A técnica do *tape stripping* permitiu identificar que a benzofenona-3 estava localizada na camada mais superficial do estrato córneo (relativo às 3 primeiras fitas adesivas) representadas nas figura 12 por T2, já que a primeira fita (T1) corresponde ao compartimento doador.

Na epiderme viável houve uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre as formulações HEC-NC-B3 e HEC-B3 no tempo de 2 h, indicando uma quantidade de benzofenona-3 cerca de 3 vezes maior oriunda da formulação contendo nanocápsulas em relação à formulação contendo benzofenona-3 livre, como pode ser visualizado na figura 11. No tempo 8 h observa-se a presença de benzofenona-3 em maior quantidade na epiderme viável quando esta se origina de HEC-NC-B3 e HEC-NC-Q-B3, reforçando a idéia de que o nanoencapsulamento é fundamental para a permanência prolongada da benzofenona-3 na epiderme. Uma formulação contendo um filtro solar requer que o ativo penetre pouco profundamente e permaneça localizado próximo à superfície da pele por um período prolongado (KURUL *et al.*, 2001).

Entretanto, de acordo com a literatura (GUPTA *et al.*, 1999), isto não é observado quando a benzofenona-3 é veiculada na forma livre, mesmo em diferentes tipos de bases semi-sólidas. A quantidade de benzofenona-3 foi cerca de 3 vezes menor no estrato córneo quando comparada com MCO, em todos os tempos de coleta (1, 2, 6 e 10 horas), incorporadas em formulações hidroalcoólica ou de adipato de diisopropila. Além disso, as quantidades penetradas (derme e receptor) aumentaram lentamente com o passar do tempo, sendo que a concentração de benzofenona-3 foi maior que a de metoxicinamato de octila. A quantidade de cada filtro solar no meio receptor foi menor que 1 % da dose aplicada, com exceção da benzofenona-3 oriunda do veículo hidroalcoólico, que foi detectada em cerca de 85 %.

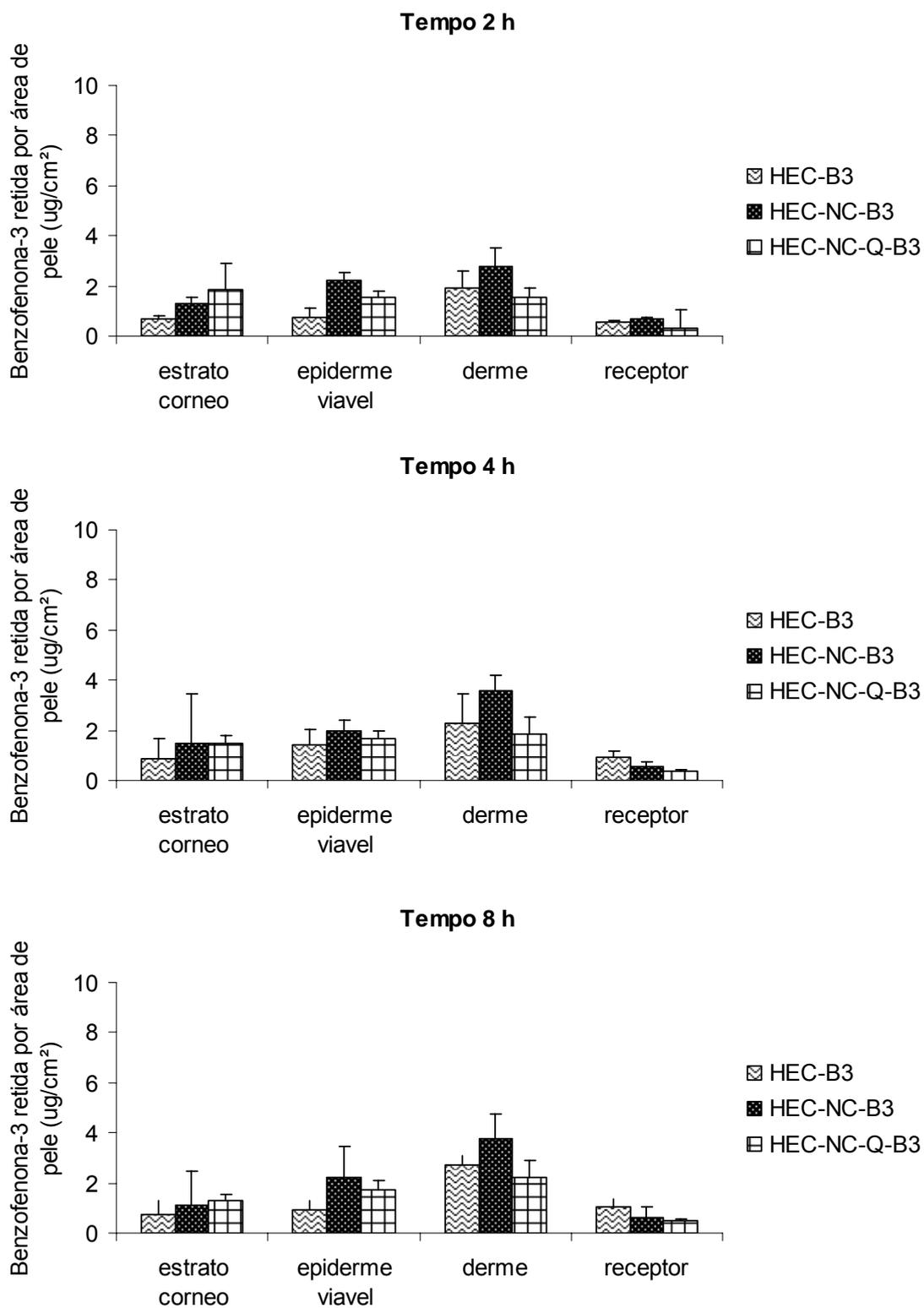


Figura 11. Quantidade de benzofenona-3 retida ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Por tempo de análise, em cada compartimento da pele, a partir das formulações HEC-B3, HEC-NC-B3 e HEC-NC-Q-B3.

Na derme, houve uma redução na concentração de benzofenona-3 oriunda de HEC-NC-Q-B3, quando comparada à HEC-NC-B3, representando cerca de 2 vezes menos a quantidade do filtro solar. A concentração de benzofenona-3 também foi reduzida em 1,2 vezes quando detectada a partir de HEC-NC-Q-B3 em comparação à HEC-B3. Entretanto, pode-se notar uma maior penetração do filtro solar a partir de HEC-NC-B3 na derme em relação às outras formulações (Figura 11).

Da mesma forma, foi observada uma redução significativa ($P < 0,05$) no conteúdo de benzofenona-3 no meio receptor das células de Franz a partir de HEC-NC-Q-B3, quando comparada com as demais formulações em todos os tempos de coleta (Figura 11). Verifica-se novamente que as nanocápsulas revestidas com quitosana foram eficazes em manter a benzofenona-3 por mais tempo na superfície da pele, reduzindo assim a sua chegada às camadas mais profundas. É importante que haja o controle de chegada de filtros solares à corrente circulatória, uma vez que a benzofenona-3 é detectada nos demais órgãos do corpo como fígado, pulmões, coração e rins, e até mesmo na urina, como já descrito na literatura (OKEREKE *et al.*, 1993; GONZALEZ, *et al.*, 2006).

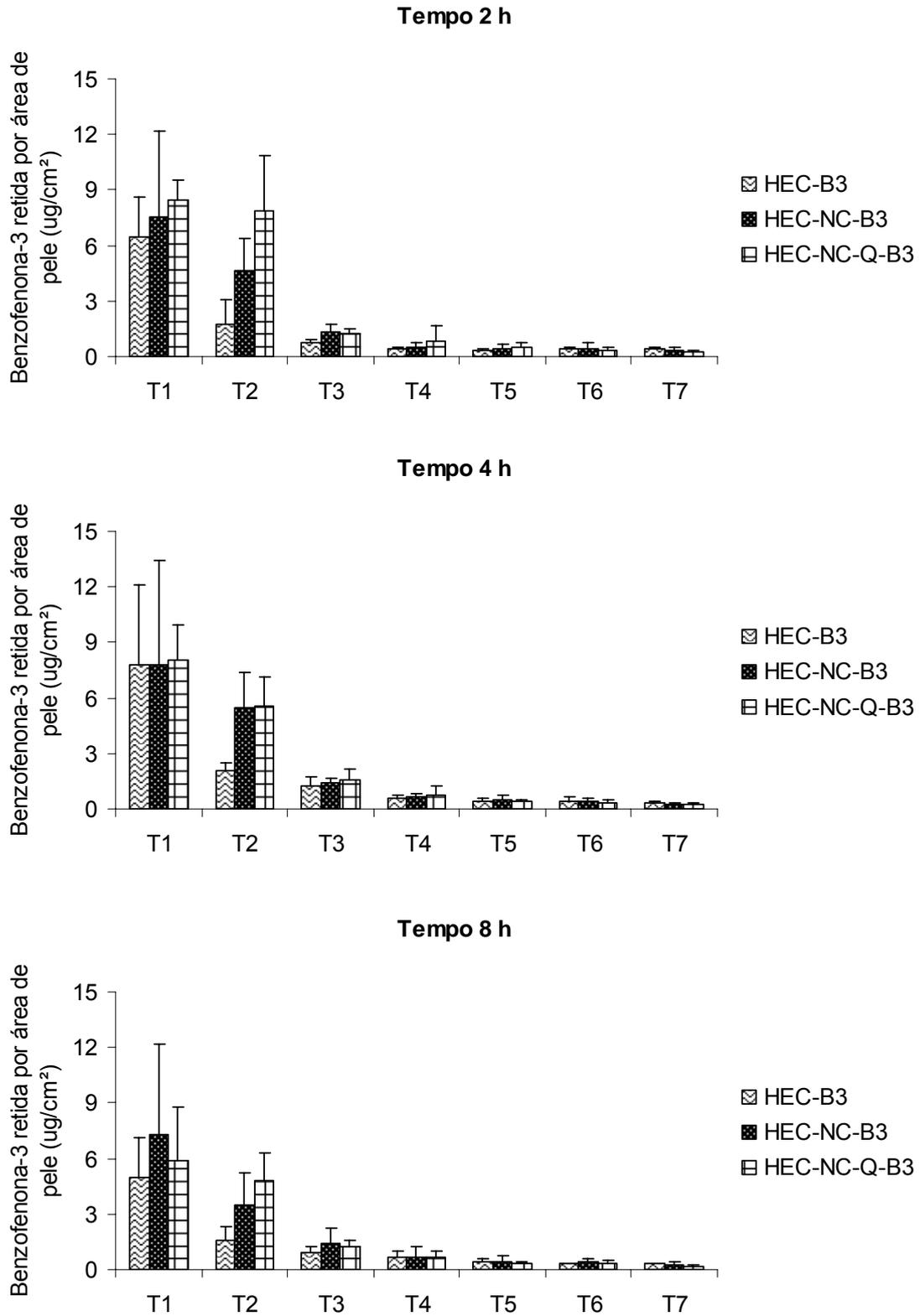


Figura 12. Distribuição da benzofenona-3 retida no estrato córneo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), por tempo de análise, a partir de HEC-B3, HEC-NC-B3 e HEC-NC-Q-B3, através da técnica do *tape stripping*.

Foi possível obter nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo benzofenona-3 revestidas ou não com quitosana. As nanocápsulas sem revestimento com parede polimérica composta apenas por poli(ϵ -caprolactona) apresentaram carga de superfície negativa. As nanocápsulas com revestimento de quitosana sobre a parede de poli(ϵ -caprolactona) apresentaram carga de superfície positiva.

Observou-se que os diâmetros médios das nanocápsulas revestidas e não revestidas com quitosana foram influenciadas pelo uso de diferentes tensoativos, Span 60[®] e Epikuron 170[®] (Span 60[®] - NS-S: 234 nm; NC-S-B3: 260 nm; NC-S-Q-B3: 295 nm. Epikuron 170[®] - NC-E: 174 nm; NC-E-B3: 175 nm; NC-E-Q-B3: 202 nm), pelo revestimento com quitosana (NC-S-B3: 260 nm; NC-S-Q-B3: 295 nm; NC-E-B3: 175 nm; NC-E-Q-B3: 202 nm) e pela adição de benzofenona-3 (NS-S: 234 nm; NC-S-B3: 260 nm; NC-E: 174 nm; NC-E-B3: 175 nm).

Análises em Turbiscan LAb[®] demonstraram uma tendência à coalescência para as suspensões de nanocápsulas preparadas com Span 60[®] e revestidas com quitosana.

As suspensões de nanocápsulas preparadas com o tensoativo Epikuron 170[®] apresentaram características físico-químicas adequadas e permaneceram estáveis num período de 30 dias, e por isso, foram utilizadas nos estudos subseqüentes.

A adição das suspensões de nanocápsulas revestidas e não revestidas, em total substituição à água, na preparação dos hidrogéis de Natrosol[®] não modificou o comportamento pseudoplástico originalmente conferido à este polímero. Foi possível detectar a presença das nanocápsulas nos hidrogéis, bem como a influência das cargas de superfície das mesmas sobre os hidrogéis.

As análises dos hidrogéis em Turbiscan LAb[®] não mostraram tendência à nenhum tipo de instabilidade.

Os ensaios de penetração cutânea através de células de Franz indicam que as nanocápsulas revestidas com quitosana aumentam o tempo de permanência da benzofenona-3 sobre a superfície da pele e reduzem sua concentração nas camadas viáveis, bem como no meio receptor. Isto indica que as nanocápsulas revestidas por quitosana são sistemas promissores para aplicação cutânea da benzofenona-3, podendo ser também carreadores adequados para a veiculação de substâncias cosméticas destinadas a atuarem nas camadas mais superficiais da pele.

Referências

- ABDULMAJED, K.; HEARD, C. M. Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug. 1. Synthesis, penetration into and permeation across human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, 6 (2004) 113-124.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 100 (2004) 5 –28.
- ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: Interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, p. 96, 2003.
- 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**, 52 (2001) 191-195.
- ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, 99 (2004) 53-62.
- ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, n. 12, p. 900-4, 2005.
- ALVES, M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro***. 2006. 166p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, 341 (2007) 215-220.
- ANSEL, H. C.; ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. Philadelphia: Lippincott W. Wilkins, 1999. p. 595.
- BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science and Technology Today** , v. 3, n. 5, 2000, 163-171.

BARATA, E. A. F. **A Cosmetologia: Princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress, 2002. p. 19.

BRAUN, D. B.; ROSEN, M. R. **RHEOLOGY MODIFIERS HANDBOOK: Practical use and application**. New York: William Andrew Publishing, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 47, de 16 de março de 2006. Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 17/03/2006.

BRASIL. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02/06/2003.

BRICEÑO, M. I. **Rheology of suspensions and emulsions**. In: Nielloud, F.; Marti-Mestres, G. (ed.) *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*, New York, 2000.

BRONAUGH, R. L.; MAIBACH, H. I. (ed.). **Topical absorption of dermatological products**. Marcel Dekker: New York, 2002. 544p.

CAMBON, M., ISSACHAR, N., CASTELLI, D., ROBERT, C. An in vivo method to assess the photostability of UV filters in a sunscreen. **Journal of Cosmetic Science**, 52 (2001) 1–11.

CALVO, P.; REMUÑAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid and Polymer Science**, 275 (1997a) 46-53.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, 153 (1997b) 41-50.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 56 (2004) 671-675.

CHAN, J. L.; EHRLICH, A.; LAWRENCE, R. C.; MOSHELL, A. N.; TURNER, M. L.; KIMBALL, A. B. Assessing the role of race in quantitative measures of skin pigmentation and clinical assessments of photosensitivity. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 56 (2005) 609-15.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (avobenzone) and ethylhexyl methoxycinnamate by bisethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. **Photochemistry and Photobiology**, 74 (2001) 401–406.

COLIPA. Guideline – International Sun Protection Factor (SPF) test method. Brussels, 2006. Disponível em: < <http://www.colipa.com/site/index.cfm?SID=15588>>. Acesso em: 9 maio, 2007.

CUI, F.; QIAN, F.; YIN, C. Preparation and characterization of mucoadhesive polymer-coated nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, 316 (2006) 154-161.

DARLINGTON, S.; WILLIAMS, G.; NEALE, R.; FROST, C.; GREEN, A. A Randomized Controlled Trial to Assess Sunscreen Application and Beta Carotene Supplementation in the Prevention of Solar Keratoses. **Archives of Dermatology**, 139 (2003) 451-455.

DE CAMPOS, A. M.; SÁNCHEZ, A.; ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. **International Journal of Pharmaceutics**, 224 (2001) 159-168.

DE CAMPOS, A. M.; SÁNCHEZ, A.; GREF, R.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 20 (2003) 73-81.

DIFFEY, B. L.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J.; NASH, J. F. In vitro assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 43 (2000) 1024-35.

DURO, R.; SOUTO, C.; GÓMEZ-AMOZA, J. L.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; CONCEIRO, A. Interfacial Adsorption of Polymers and Surfactants: Implications for the Properties of Disperse Systems of Pharmaceutical Interest. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 25 (1999) 817–829.

FELIX, T.; HALL, B.; BRODBELT, J. S. Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC-MS. **Analytica Chimica Acta**, 371 (1998) 195-203.

FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; RAMOS, J.; MAILLOLS, H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of 'in vitro' and 'in vivo' skin

penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 24 (2000) 155–165.

FERNANDEZ, C.; NIELLOUD, F.; FORTUNÉ, R.; VIAN, L.; MARTI-MESTRES, G. Benzophenone-3: rapid prediction and evaluation using non-invasive methods of in vivo human penetration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 28 (2002) 57–63.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1989.

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

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, 3 (2000) 417-425.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, 153-158, 2007.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190-195, 1975.

GERHARD, J.; SCHAEFERY, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 33 (2001) 285–299.

GIOKAS, D. L.; SALVADOR, A.; CHISVERT, A. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, 2007.

GONZALEZ, H. **Studies of Sunscreens: Percutaneous Absorption of Benzophenone-3 and Photostability**. 2006a. 47p. Tesis (PhD of Medicine). Department of Dermatology and Venerology, Institute of Clinical Sciences, The Sahlgrenska Academy at Göteborg University. Göteborg, Sweden.

GONZALEZ, H.; FARBROT, A.; LARKÖ, O.; WENNBERG, A-M. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. **British Journal of Dermatology**, 154 (2006b) 337-340.

- GUSTAVSSON-GONZALEZ, H.; FARBROT, A.; LARKÖ, O. Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. **Clinical and Experimental Dermatology**, 27 (2002) 691-694.
- GREEN, A.; WILLIAMS, G.; NEALE, R.; HART, V.; LESLIE, D.; PARSONS, P.; MARKS, G. C.; GAFFNEY, P.; BATTISTUTTA, D.; FROST, C. *et al.* Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamouscell carcinomas of the skin: a randomised controlled trial. **The Lancet**, 354 (1999):723-729.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, 2 (2007) 1-11.
- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, 224 (2001) 1-18.
- HAYDEN, C. G.; ROBERTS, M. S.; BENSON, H. A. Systemic absorption of sunscreen after topical application. *Lancet* (1997) 4: 350-863 *apud* GONZÁLEZ, H.; FARBROT, A.; LARKÖ, O.; WENNBERG, A-M. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. **British Journal of Dermatology**, 154 (2006): 337-340.
- HAYWOOD, R.; WARDMAN, P.; SANDERS, R.; LINGE, C. Sunscreens Inadequately Protect Against Ultraviolet-A-Induced Free Radicals in Skin: Implications for Skin Aging and Melanoma? **Journal of Investigative Dermatology**, 121 (2003) 862-868.
- ICH Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. United States of America, 1996. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 20 nov., 2006.
- JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. **Journal of Controlled Release**, 66 (2000) 115-126.
- JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, 272 (2004) 45-55.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999.

JANES, K. A.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 47 (2001) 83–97.

KAN, P.; CHEN, Z.; KUNG, R.; LEE, C.; CHU, I. Study on the formulation of o/w emulsion as carrier for lipophilic drugs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 15 (1999) 117-125.

KAWAMURA, Y.; OGAWA, Y.; NISHIMURA, T.; KIKUCHI, Y.; NISHIKAWA, J.-I.; NISHIHARA, T.; TANAMOTO, K. Estrogenic activities of UV stabilizers used in food contact plastics and benzophenone derivatives tested by the yeast two-hybrid assay. **Journal of Health Science**, 49 (2003) 205–212.

KIM, J-Y.; SONG, J-Y.; LEE, E-J.; PARK, S-K. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. **Colloid and Polymer Science**, 281 (2003) 614-623.

KURUL, E.; HEKIMOGLU, S. Skin permeation of two different benzophenone derivatives from various vehicles. **International Journal of Cosmetic Science**, 23 (2001) 211-218.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H. C.; PITTELKOW, M. R. Photoprotection. **The Lancet**, v. 370 (2007) 528-537.

LBOUOTOUNNE, H.; CHAULET, J-F.; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROT, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, 82 (2002) 319-334.

LEMARCHAND, C.; COUVREUR, P.; BESNARD, M.; CONSTANTINI, D.; GREF, R. Novel polyester-polysaccharide nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, 20 (2003) 1284-1292.

LEYDEN, J.J.; RAWLINGS, A. V. (ed). **Skin Moisturization**. Marcel Dekker: New York, Basel (2002). 671p.

LIM, H. W.; NAYLOR, M.; HÖNIGSMANN, H.; GILCHREST, B. A.; COOPER, K.; MORISON, W.; DELEO, V. A.; SCHERSCHUN, L. American Academy of Dermatology Consensus Conference on UVA protection of sunscreens: Summary and recommendations. **Journal of American Academy of Dermatology**, 44 (2001) 505-508.

- LOWE, N.J.; SHAATH, N. A.; PATHAK, M. A. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects**. Marcel Decker, Inc.: New York, 1997.
- LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, F.; KÖNIG, K.; KOSTKA, K-H.; LEHR, C-M.; SCHAEFER, U. F. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. **Skin Pharmacology and Physiology**, 19 (2006) 190-197.
- MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K.; HÖNIGSMANN, H. Change of Ultraviolet Absorbance of Sunscreens by Exposure to Solar-Simulated Radiation. **Journal of Investigative Dermatology**, 117(2001) 256-262.
- MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; MARTINCIGH, B. S.; BRUNNHOFER, K.; HÖNIGSMANN, H. Ultraviolet protective performance of photoprotective lipsticks: change of spectral transmittance because of ultraviolet exposure. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, 21 (2005) 84-92.
- MARÓN, L. B.; COVAS, C. P.; SILVEIRA, N. P.; POHLMANN, A. R.; MERTINS, O.; TATSUO, L. N.; SANANNA, O. A. B.; MORO, A. M.; TAKATA, C. S.; ARAÚJO, P. S.; COSTA, M. H. B. LUVs recovered with chitosan: a new preparation for vaccine delivery. **Journal of Liposome Research**, 17:3 (2007) 155-163.
- MARTIN, A.; WARBRICK, J.; CAMMARATA, A. **Rheology in physical pharmacy**. 4th. ed. Lea & Febiger: Philadelphia.1993. 622 p.
- MENGUAL, M.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyzer: the Turbiscan MA 1000. **Colloids and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects**, 152 (1999) 111-123.
- MERTINS, O.; SEBBEN, M.; POHLMANN, A. R.; SILVEIRA, N. P. Production of soybean phosphatidylcholine–chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. **Chemistry and Physics of Lipids**, 138 (2005) 29–37.
- MERTINS, O.; CARDOSO, M. C.; POHLMANN, A. R.; SILVEIRA, N. P. Structural Evaluation of Phospholipidic Nanovesicles Containing Small Amounts of Chitosan. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 6 (2006) 2425-2431.
- MILÃO, D. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas de diclofenaco**. 2003. 174p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

- MONTI, D.; SAETTONI, M. F.; CENTINI, M.; ANSELMINI, C. Substantivity of sunscreens – in vitro evaluation of the transdermal permeations characteristics of some benzophenone derivatives. **International Journal of Cosmetic Science**, 15 (1993) 45-52.
- MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**, 19 (2001) 489-501.
- MOROHOSHI, K.; YAMAMOTO, H.; KAMATA, R.; SHIRAISHI, F.; KODA, T.; MORITA, M. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreens lotions evaluated by in vitro assays. **Toxicology in vitro**, 19 (2005) 457-469.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 89 (2000) 614-626.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, 22 (2001) 2967-2979.
- MOYAL, D.; CHARDON, A.; KOLLIAS, N. Determination of UVA protection factors using the persistent pigment darkening (PPD) as the end point. (Part 1). Calibration of the method. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, 16 (2000) 245-249.
- MOYAL, D.; WICHROWSKI, K.; TRICAUD, C. In vivo persistent pigment darkening method: a demonstration of the reproducibility of the UVA protection factors results at several testing laboratories. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, 22 (2006) 124-128.
- MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; SILVEIRA, N. P.; COSTA, T. D.; GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Die Pharmazie**, v. 56, n. 11, p. 864-867, 2001.
- MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 58 (2004) 343-356.

NAKAGAWA, Y.; SUZUKI, T.; TAYAMA, S. Metabolism and toxicity of benzophenone in isolated rat hepatocytes and estrogenic activity of its metabolites in MCF-7 cells. **Toxicology**, 156 (2000) 27-36.

NAYLOR MF, BOYD A, SMITH DW, CAMERON GS, HUBBARD D, NELDNER KH. High sun protection factor sunscreens in the suppression of actinic neoplasia. **Archives in Dermatology**, 131 (1995) 170–75.

OKEREKE, C. S.; KADRY, A. M.; ABDEL-RAHMAN, M. S.; DAVIS, F. A.; FRIEDMAN, M. A. Metabolism of benzophenone-3 in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, 21 (1993) 1-5.

OLVERA-MARTINEZ, B. I.; CÁZARES-DELGADILLO, J.; CALDERILLA-FAJARDO, S.; VILLALOBOS-GARCÍA, R.; GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Preparation of Polymeric Nanocapsules Containing Octyl Methoxycinnamate by the Emulsification–Diffusion Technique: Penetration Across the Stratum Corneum. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 94 (2005) 1552-1559.

PELLET, M. A.; ROBERTS, M. S.; HADGRAFT, J. Supersaturated solutions evaluated with an in vitro stratum corneum tape stripping technique. **International Journal of Pharmaceutics**, 151 (1997) 91-98.

PREGO, C.; GARCÍA, M; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Transmucosal macromolecular drug delivery. **Journal of Controlled Release** (2005) 101: 151–162.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, 40 (1999) 7029-7032.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, 31 (2006) 603-632.

RHODES, M. C.; BUCHER, J. R.; PECKHAM, J. C.; KISSLING, G. E.; HEJTMANCIK, M. R.; CHHABRA, R. S. Carcinogenesis studies of benzophenone in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, 45 (2007) 843-851.

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

SCHAEFER, H.; WATTS, F.; BROD, J.; ILLEL, B. Follicular penetration, in: R. C. Scott, R. H. Guy, J. Hadgraft (Eds), Prediction of percutaneous penetration. Methods, Measurements, modeling, IBC Technical services, London, 1990, pp. 163-173 *apud* ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release** 99 (2004) 53-62.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, 26 (2003) 1-12.

SCHULZ, J.; HOHENBERG, H.; PFLÜCKER, F.; GÄRTNER, E.; WILL, T.; PFEIFFER, S.; WEPF, R.; WENDEL, V.; GERS-BARLAG, H.; WITTERN, K-P. Distribution of sunscreen on skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 54 (2002) S157-S163.

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

SCHMUTZLER, C.; HAMANN, I.; HOFMANN, P. J.; KOVACS, G.; STEMMLER, L.; MENTRUP, B.; SCHOMBURG, L.; AMBRUGGER, P.; GRÜTERS, A.; SEIDLOVA-WUTTKE, D.; JARRY, H.; WUTTKE, W.; KÖHRLE, J. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. **Toxicology**, 205 (2004) 95-102.

SCHLUMPF, M.; SCHMID, P.; DURRER, S.; CONSCIENCE, M.; MAERKEL, K.; HENSELER, M.; GRUETTER, M.; HERZOG, I.; REOLON, S.; CECCATELLI, R.; FAASS, O.; STUTZ, E.; JARRY, H.; WUTTKE, W.; LICHTENSTEIGER, W. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters – an update. **Toxicology** 205 (2004) 113-122.

SHIM, J.; KANG, H. S.; PARK, W-S.; HAN, S-H.; KIM, J.; CHANG, I-S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, 97 (2004) 477-484.

SONVICO, F.; CAGNANI, A.; ROSSI, A.; MOTTA, S.; DI BARI, M. T.; CAVATORTA, F.; ALONSO, M. J.; DERIU, A.; COLOMBO, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, 324 (2006) 67-73.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release** (2001) 70: 1-20.

SOUTO, E. B.; WISSING, S. A.; BARBOSA, C. M.; MÜLLER, R. H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 58 (2004) 83-90.

TING, W. W.; VEST, C. D.; SONTHEIMER, R. D. Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. **International Journal of Dermatology**, 43 (2004) 538-547.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drugs localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, 56 (1998) 7-21.

TREFFEL, P.; GABARD, B. Skin penetration and sun protection factor of ultra-violet filter from two vehicles. **Pharmaceutical Research** (1996) 13: 770-774.

VALENTA, C.; AUNER, B. G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 58 (2004) 279-289.

VENTER, J. P.; MÜLLER, D. G. ; PLESSIS, J.; GOOSEN, C. A comparative study of in situ adapted diffusion cell and in vitro Franz diffusion cell method for transdermal absorption of doxylamine. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, 13 (2001) 169-177.

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

VERMA, D. D.; FAHR, A. Synergistic penetration enhancement effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporin A. **Journal of Controlled Release**, 97 (2004) 55-66.

VIDAL, L.; CHISVERT, A.; CANALS, A.; SALVADOR, A. Sensitive determination of free benzophenone-3 in human urine samples based on an ionic liquid as extractant phase in single-drop microextraction prior to liquid chromatography analysis. **Journal of Chromatography A** (2007), doi:10.1016/j.chroma.2007.07.077. In Press.

VIGLIOGLIA, P. A.; RUBIN, J. **Cosmiatria: fundamentos científicos y técnicos**. Buenos Aires: Ediciones de Cosmiatria, 1979.

- VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controlled Release**, 78 (2002) 15-24.
- WANG, S-P.; LEE, W-T. Determination of benzophenones in a cosmetic matrix by supercritical fluid extraction and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 987 (2003) 269-275.
- WEISS, V. A. **Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas**. 2007. 208p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetologia de Harry** Madrid: Ediciones Diaz de Santos S.A. 1039 p., 1990.
- WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics** 254 (2003) 65-68.
- WOOD, J. H. Reologia Farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. vol.2, 2001. p. 211-226.
- WULF, H. C.; SANDBY-MOLLER, J.; KOBAYASI, T.; GNIADECKI, R. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, 35 (2004) 185–91.
- YENER, G.; INCEGÜL, T.; YENER, N. Importance of using solid lipid microspheres as carriers for UV filters on the example octyl methoxy cinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, 258 (2003) 203-207.
- ZETA-METER INC. Potencial zeta: un curso completo en 5 minutos. Stauton, [2006]. Disponível em: <<http://www.zeta-meter.com/contact.html>>. Acesso em: 09 dez. 2006.

Validação do método analítico para doseamento da benzofenona-3 nas nanocápsulas

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

1.1. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). A linearidade pode ser avaliada pela inspeção visual dos sinais plotados em função da concentração do analito. Se há uma relação linear, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos adequados, como por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, e determinação do coeficiente de correlação (ICH, 1996). No intervalo de 0,1 µg/mL à 40 µg/mL a quantificação da benzofenona-3 foi linear, apresentando um coeficiente de correlação superior a 0,99, a interseção com o eixo Y foi igual a -13834 e um coeficiente angular de 70966, estando de acordo com as normas que regem os guias de validação vigentes (ICH, 1996; BRASIL, 2003) (Figura 1.1).

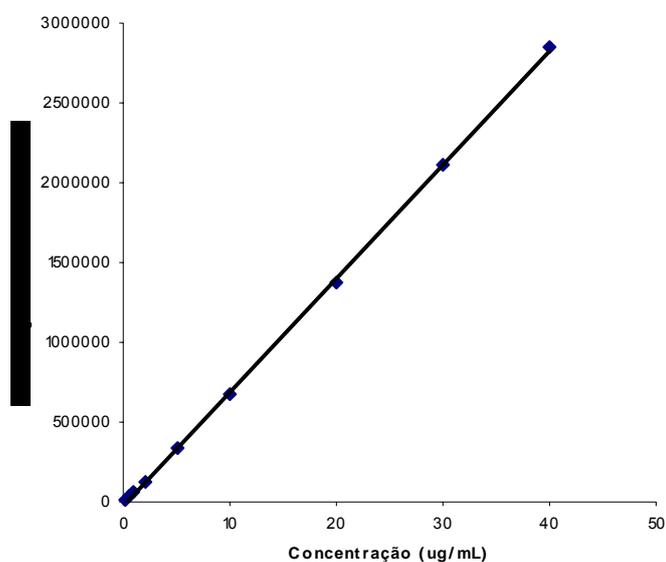


Figura 1.1. Representação gráfica da curva média da benzofenona-3, quantificada por CLAE (n = 3, para cada ponto da curva).

O valor de F (70857,12) da ANOVA da regressão foi maior que o F tabelado (4,41) para $P < 0,05$, indicando a existência de regressão linear entre as variáveis relacionadas (Tabela 1.2).

Tabela 1. 2. Cálculo de ANOVA para análise da linearidade do método analítico de quantificação da benzofenona-3 em nanocápsulas

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F calc	F tab
<i>Entre</i>	8	2,57E+13	3,22E+12	5391,01	2,51
<i>Regressão linear</i>	1	2,57E+13	2,57E+13	70857,12	4,41
<i>Desvio linearidade</i>	7	2542855156	363265022,2	0,61	2,58
<i>Dentro</i>	18	10743905534	596883640,8		
<i>Total</i>	26				

1.2. Precisão

Para um método analítico, a precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). Para este trabalho, foram considerados dois níveis da precisão: repetibilidade (precisão intra-corrída), que é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação; e precisão intermediária (precisão inter-corrídas), que representa a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes de análise. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

Neste caso, o CV inter-dia foi inferior a 1 % (Tabela 1.3), apresentando-se de acordo com a regulamentação dos órgãos oficiais que determinam um limite máximo igual a 5 % (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

Tabela 1.3. Avaliação precisão do método analítico de doseamento da benzofenona-3 em nanocápsulas através da análise dos coeficientes de variação intra e inter-dia (n = 6)

Dia	20 µg/mL de benzofenona-3
	CV %
1	0,65
2	0,73
3	0,57
Inter-dia	0,07

1.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). As amostras de NC foram contaminadas com benzofenona-3, resultando nas concentrações finais de 2, 10 e 30 µg/mL. Os valores recuperados de

benzofenona-3 a partir das soluções-amostra estão de acordo com os percentuais permitidos (ICH, 1996) (Tabela 1.4).

Tabela 1.4. Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento da benzofenona-3 em nanocápsulas (n = 9)

Concentração de benzofenona-3 ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. \pm DP	Exatidão (%)
2	2,02 \pm 0,05 (101,30 %)	101,30
10	9,75 \pm 0,19 (97,55 %)	97,55
30	28,90 \pm 0,16 (96,36 %)	96,36

1.4. Especificidade

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Como pode ser visualizado na figura 1.2, os cromatogramas mostram que o método é específico para a quantificação de benzofenona-3 em suspensões de nanocápsulas, não observando interferência dos demais componentes da formulação.

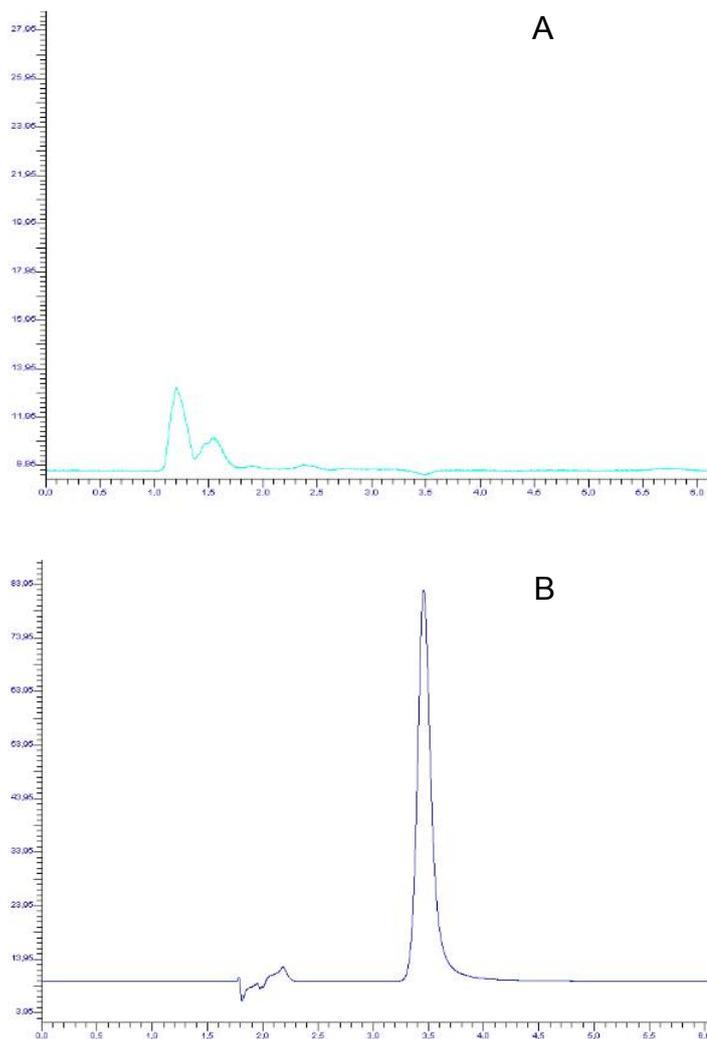


Figura 1.2. Cromatogramas obtidos na detecção das nanocápsulas sem benzofenona-3 (A) e das nanocápsulas com benzofenona-3 (B).

Uma vez que os parâmetros usados para validação do método analítico para quantificação da benzofenona-3 em suspensões de nanocápsulas encontram-se de acordo com as normas oficiais, o método em questão foi considerado linear, preciso, exato e específico, sendo confiável para determinação da benzofenona-3 nas amostras de nanocápsulas.

Validação do método analítico de extração da benzofenona-3 das nanocápsulas incorporadas no hidrogel

2.1. Precisão

O CV inter-dia foi inferior a 5 % (Tabela 1.3), apresentando-se de acordo com a regulamentação dos órgãos oficiais que determinam um limite máximo igual a 5 % (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

Tabela 2.1. Avaliação precisão do método de extração da benzofenona-3 em nanocápsulas incorporadas nos hidrogéis, através da análise dos coeficientes de variação intra e inter-dia (n = 6)

Dia	20 µg/mL de benzofenona-3
	CV %
1	3,54
2	4,34
3	4,05
Inter-dia	4,39

2.2. Exatidão

Os extratos dos hidrogéis foram contaminados com benzofenona-3 e os valores recuperados a partir das soluções-amostra foram de 92,1 %.

2.3. Especificidade

Como pode ser visualizado na figura 2.1, não observa-se nenhuma interferência dos demais componentes da formulação do hidrogel, indicando que o método é específico.

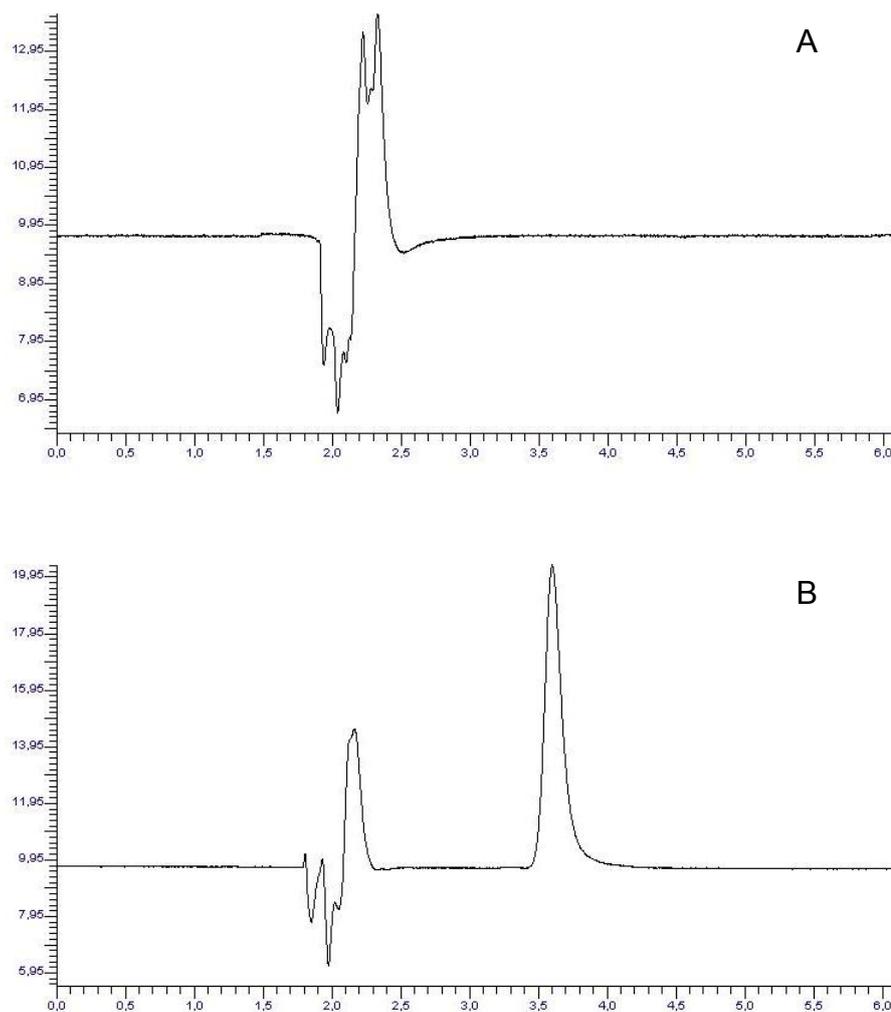


Figura 2.1. Cromatogramas obtidos na quantificação dos hidrogéis sem benzofenona-3 (A) e com nanocápsulas contendo benzofenona-3 (B).

Validação do método analítico de doseamento da benzofenona-3 na pele, meio receptor das células de Franz e *tape stripping*

3.1. Linearidade

O método foi considerado linear no intervalo entre 0,1 µg/mL à 20 µg/mL, apresentando coeficientes de correlação maiores que 0,99, interseção com o eixo y igual a 78680 e coeficiente angular de -6408,3, confirmando a linearidade entre as concentrações de benzofenona-3 e as áreas dos picos.

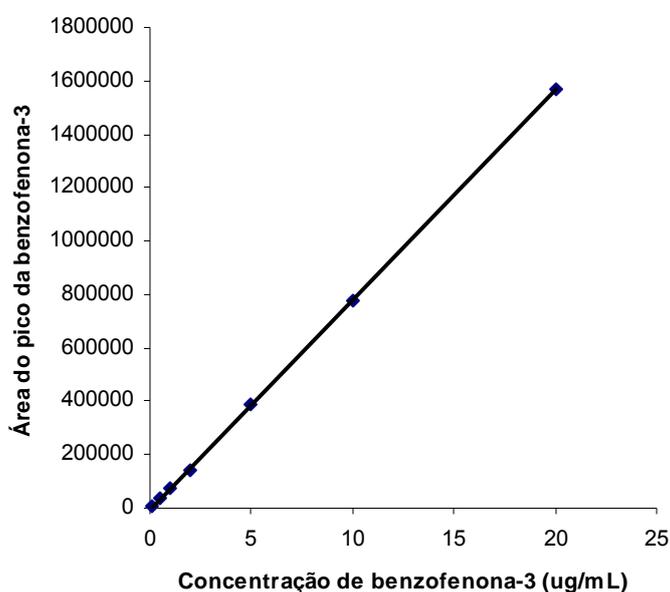


Figura 3.1. Representação gráfica da curva média da benzofenona-3, quantificada por CLAE (n = 3, para cada ponto da curva).

A linearidade foi também avaliada através da ANOVA, onde o F calculado (17295,46) foi maior que o F tabelado (4,6) indicando que há regressão linear, sem desvio da linearidade, como pode ser visualizado na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Cálculo de ANOVA para análise da linearidade do método analítico de quantificação da benzofenona-3 em nanocápsulas

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F calc	F tab
<i>Entre</i>	6	5,89534E+12	9,82E+11	2882,88	2,85
<i>Regressão linear</i>	1	5,89473E+12	5,89E+12	17295,47	4,6
<i>Desvio linearidade</i>	5	614448953,4	122889790,7	0,36	2,96
<i>Dentro</i>	14	4771548822	340824915,8		
<i>Total</i>	20				

3.2. Exatidão

A avaliação da exatidão do método analítico para quantificação da benzofenona-3 na pele foi realizada através da contaminação do extrato de pele com soluções de benzofenona-3. Os resultados indicam que o método é exato, visto que a percentagem de recuperação da benzofenona-3 encontra-se de acordo com as normas preconizadas pelos códigos oficiais (ICH, 1996; BRASIL, 2003) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento da benzofenona-3 (n = 9)

Concentração de benzofenona-3 ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. \pm DP	Exatidão (%)
0,5	0,55 \pm 0,02	109,35
5	4,91 \pm 0,06	98,26
10	9,58 \pm 0,05	95,82

3.3. Especificidade

Como pode ser visualizado na figura 3.2, os cromatogramas indicam que o método é específico para a quantificação de benzofenona-3 em suspensões de nanocápsulas. Nenhuma interferência dos demais componentes da formulação é observada.

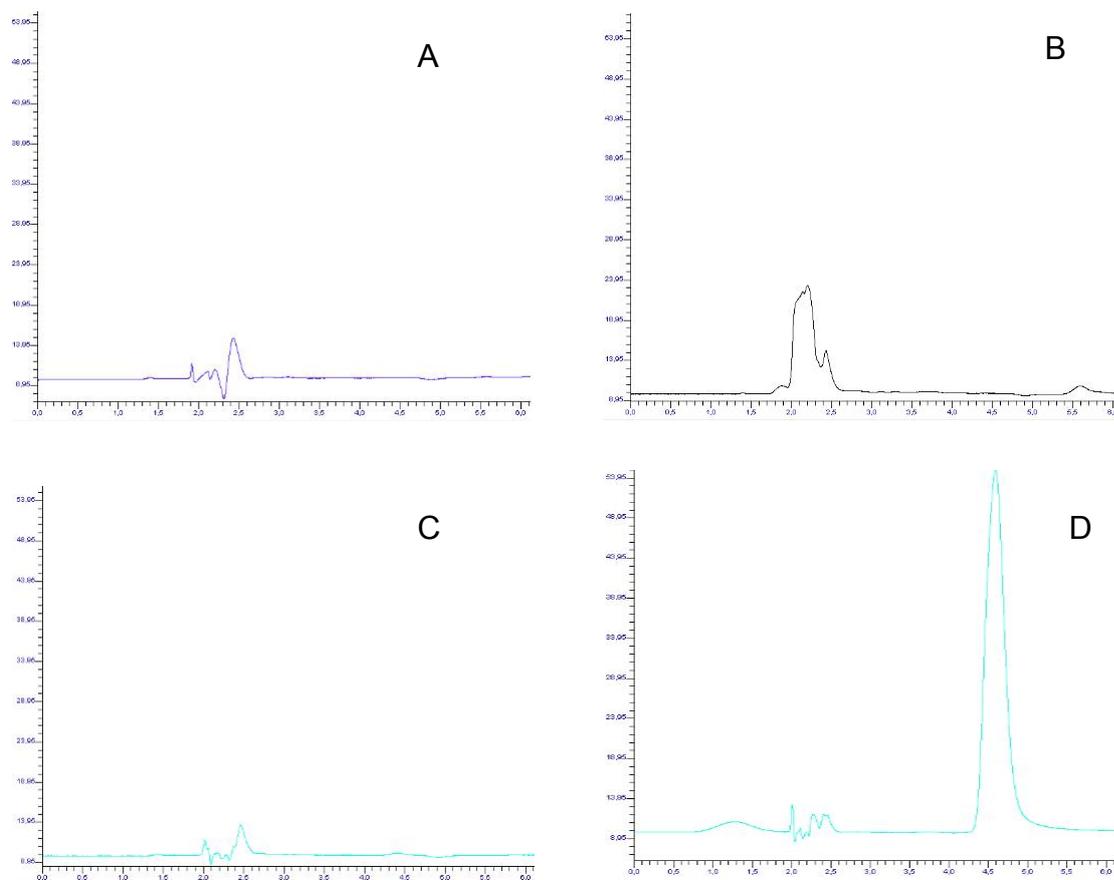


Figura 3.2. Cromatogramas obtidos na detecção da epiderme (A), derme (B), fita adesiva e estrato córneo (C) e benzofenona-3 (D).