UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência de micro e nanopartículas lipídicas sólidas na eficácia de
formulações fotoprotetoras bioativas**

Rodrigo Molina Martins

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência de micro e nanopartículas lipídicas sólidas na eficácia de
formulações fotoprotetoras bioativas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientado: Rodrigo Molina Martins

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Martins, Rodrigo Molina

Influência de micro e nanopartículas lipídicas sólidas na eficácia de formulações fotoprotetoras bioativas

181 p.: Il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Freitas, Luis Alexandre Pedro de

1. Micropartículas lipídicas sólidas. 2. Nanopartículas lipídicas sólidas 3.
Filtro solar 4. Pele reconstruída 5. Pele humana

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigo Molina Martins

Influência de micro e nanopartículas lipídicas sólidas na eficácia de formulações fotoprotetoras bioativas

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Osvaldo e Izildinha, que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas, e por todo o amor, carinho e orações dedicados.

A minha esposa, Silvia, por seu amor, companheirismo, carinho e dedicação.

Aos meus irmãos Juliana e Marco Aurélio por simplesmente existirem e fazerem parte da minha vida.

Agradecimientos

A Deus, por me dar forças e me guiar na jornada da vida.

Ao meu orientador Luis Alexandre Pedro de Freitas, pela confiança, ensinamentos, atenção, compreensão e pela amizade;

A professora Maria José Vieira Fonseca pela coorientação e pela colaboração, a qual foi imprescindível para a realização deste trabalho;

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Física Industrial e Processos Industriais Farmacêuticos: Aurea Lanchote, Anna Beatriz F. L. Nosari, Ana Rita Costa Machado, Cristina Zamarioli, Luciana Tacon, Marcela Olaia Machado, Simone Vieira Pereira, pelo companheirismo e amizade;

Aos meus amigos de pós-graduação, em especial a Ana Luiza Aguilera, Frederico Martins, Joel Gonçalves e Rebeca Oliveira de Souza pela amizade;

Aos meus amigos João Paulo de Mello Guedes, Thiago Gomes da Silva e Rodrigo Mendes pela força e amizade;

Aos técnicos de laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP): Henrique, José Orestes, Luiz H. Cenzi, José Maria, Luis Fernando e José Roberto Jabor pela colaboração e apoio no desenvolvimento deste trabalho;

Aos funcionários da seção de Pós-graduação da FCFRP-USP em especial a Eleni Angeli Passos pela eficiência e dedicação nos serviços prestados;

A professora Maria Vitória Lopes Badra Bentley por disponibilizar alguns equipamentos indispensáveis para a realização deste trabalho;

Aos professores Osvaldo de Freitas e Marilisa Guimarães Lara pelas valiosas sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho;

A toda equipe do *Laboratoire d' Organogénèse Expérimentale-Hôpital Enfant-Jesus* (LOEX) da Université Laval (Quebec, Canadá) em especial a professora Veronique Moulin que aceitou orientar parte desse trabalho, a Lorraine Andrée Parent, Sebastien Larrochelle, Akram Ayoub, Jadson Moreira Pereira, Marie-Ève Ouellette, François Dominique Scott, Rina Ginard e Natália Oliveira Gallisa por terem nos auxiliado nos trabalhos.

Ao casal de professores Celso de Amorim Câmara e Tania Maria Sarmiento da Silva por serem meus primeiros mestres, na universidade, no caminho fascinante da pesquisa científica;

Aos meus pais, Osvaldo dos Santos Martins e Izildinha Molina Martins e aos meus queridos irmãos Juliana Molina Martins e Marco Aurélio Molina Martins pelo grande apoio e amor;

A minha querida e amada esposa, Silvia de Siqueira Martins, por todos esses maravilhosos anos juntos com muito carinho e amor. Sem ela esse trabalho não se tornaria realidade;

Ao Conselho nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) programa sem fronteiras (processo: 237020/2012-2), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo: 2010/11602-3) pelo auxílio financeiro concedido;

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

*“Nunca deixe que lhe digam que
não vale à pena acreditar nos sonhos que se tem
ou que os seus planos nunca vão dar certo
ou que você nunca vai ser alguém...”*

Renato Russo

RESUMO

MARTINS, R. M. **Influência de micro e nanopartículas lipídicas sólidas na eficácia de formulações fotoprotetoras bioativas**. 2014. 181f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014

O presente trabalho teve o objetivo de desenvolver uma formulação tópica contendo os filtros solares benzofenona-3 e avobenzona microencapsulados em associação com filtro solar não encapsulado octocrileno e nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina (formulação completa) e avaliar a eficácia fotoquimiopreventiva dessa formulação usando biópsias de pele humana e pele reconstruída *in vitro*. Micropartículas lipídicas sólidas contendo grandes quantidades de filtros solares, benzofenona-3 e avobenzona foram obtidas pela técnica do *spray congealing* com propriedades adequadas para aplicação tópica. Além disso, o processo de microencapsulação foi capaz de diminuir a penetração de benzofenona-3 na pele, aumentar a estabilidade da avobenzona frente à radiação ultravioleta A e a capacidade fotoprotetora desses filtros microencapsulados em formulações tópicas quando expostos a radiação ultravioleta. Nanopartículas lipídicas sólidas contendo o flavonóide rutina foram produzidas pelo processo de homogeneização a alta pressão e suas condições foram otimizadas pelo método da deseabilidade rendendo nanopartículas lipídicas sólidas com tamanho médio de $74,22 \pm 2,77$ nm, índice de polispersividade de $0,161 \pm 0,03$ e eficiência de encapsulação de $98,90 \pm 0,25$ %. Em adição, as nanopartículas mostraram serem capazes de proteger a viabilidade celular de fibroblastos de ratos L929 irradiados com radiação ultravioleta A e B. Para a eficácia fotoquimiopreventiva a formulação completa foi capaz de evitar/diminuir a formação de células apoptóticas, caspase-3, dímeros de ciclobutanodipirimidina, metaloproteínases e peroxidação lipídica em pele humana e pele reconstruída expostos a UVB. O processo tecnológico de microencapsulação e nanoencapsulação dos ativos avaliados mostrou ser eficaz, não comprometendo as propriedades de fotoproteção dos filtros solares e rutina, apresentando resultados similares ou melhores do que as formulações contendo os ativos na forma livre. Portanto, o desenvolvimento de formulações contendo ativos microencapsulados e nanoencapsulados é uma alternativa interessante para o emprego em produtos comerciais para proteção solar, por diminuir as características indesejáveis como penetração e instabilidade, melhorando as propriedades fotoprotetoras e evitando a necessidade de desenvolver novos compostos com propriedades fotoprotetoras.

Palavras-chaves: micropartículas lipídicas sólidas, nanopartículas lipídicas sólidas, filtro solar, pele reconstruída, pele humana.

ABSTRACT

MARTINS, R. M. **Influence of solid lipid micro and nanoparticles on the efficacy of bioactive photoprotective formulations.** 2014. 181f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014

This study aimed the pharmaceutical development of a topical formulation containing an association of microencapsulated sunscreens benzophenone-3 and avobenzone, free sunscreen octocrylene and rutin flavonol solid lipid nanoparticles (complete formulation). This formulation was assessed for photochemoprotective ability using human skin obtained surgically and reconstructed human skin. Solid lipid microparticles containing large amounts of sunscreens benzophenone-3 and avobenzone were obtained by the spray congealing technique under conditions that allowed the manufacture of microparticles with suitable properties for topical application. The microencapsulation conditions were also able to reduce the penetration of benzophenone-3 through the skin, enhanced the stability of avobenzone against the ultraviolet radiation (UVR) and increased the photoprotective ability of both filters in topical formulations exposed to UVR. Solid lipid nanoparticles containing rutin were produced by the high pressure homogenization process whose conditions were optimized using the desirability method, yielding nanoparticles with size of 74.22 ± 2.77 nm, polydispersity index of 0.161 ± 0.03 and encapsulation efficiency of $98.90 \pm 0.25\%$. In addition, the nanoparticles were able to avoid the death of L929 mice fibroblasts exposed to UVR A and B. For the photochemopreventive ability studies, the complete formulation was able to reduce/avoid the induction of apoptotic cells, caspase-3, CPDs, metalloproteinases and lipid peroxides in human skin obtained surgically and reconstructed human skin *in vitro* exposed to UVB. Thus, the micro and nanoencapsulation solved some intrinsic problems related to sunscreens and rutin without, however, compromising their photochemoprotective ability, since the results showed similar or better efficacy when compared to the formulations containing actives in free form. Therefore, the development of formulations containing microencapsulated and nanoencapsulated compounds is an interesting alternative for employment in commercial products for sun protection by decreasing the undesirable characteristics, such as penetration and instability, improving the photoprotective properties and avoiding the need to develop new compounds with photoprotective characteristics.

Keywords: solid lipid microparticles, solid lipid nanoparticles, sunscreens, reconstructed skin, human skin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fotolesões induzidas pela exposição à UVB.....	33
Figura 2:	Exemplos de modificações oxidativas encontradas nas bases nitrogenadas de DNA de mamíferos.....	35
Figura 3:	Fórmula estrutural genérica da maioria dos filtros solares orgânicos.....	39
Figura 4:	Características das moléculas fotoprotetoras e seus respectivos perfis de absorção de UV.....	42
Figura 5:	<i>Spray dryer</i> modelo LM MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil).....	54
Figura 6:	Esquema do processo de <i>spray congealing</i>.....	54
Figura 7:	Esquema representativo do ensaio de permeação/retenção usando célula de Franz.....	62
Figura 8:	Esquema representativo do ensaio de fotoproteção das formulações contendo MLSs de B-3 e AVO ou não.....	64
Figura 9:	Representação esquemática do cubo multidimensional com os pontos do planejamento composto central.....	65
Figura 10:	Esquema representativo da preparação da pele humana reconstruída <i>in vitro</i>.....	78
Figura 11:	Fotomicrografias das micropartículas lipídicas sólidas de benzofenona-3.....	87
Figura 12:	Difratogramas das micropartículas lipídicas sólidas de	

	benzofenona-3.....	89
Figura 13:	Curva calorimétrica das micropartículas lipídicas sólidas de cera de caranaúba contendo benzofenona-3.....	89
Figura 14:	Curva calorimétrica das micropartículas lipídicas sólidas de cera de abelha contendo benzofenona-3.....	90
Figura 15:	Perfil de dissolução <i>in vitro</i> comparativo das micropartículas lipídicas sólidas de benzofenona-3.....	91
Figura 16:	Determinação da viabilidade celular de fibroblastos L929 em cultura de células na presença das micropartículas lipídicas sólidas de benzofenona-3.....	93
Figura 17:	Determinação da viabilidade celular de fibroblastos L929 em cultura de células na presença do controle do solvente, micropartículas lipídicas sólidas de cera de carnaúba e micropartículas lipídicas sólidas de cera de abelha.....	94
Figura 18:	Perfil cromatográfico da benzofenona-3.....	95
Figura 19:	Determinação da viabilidade celular de fibroblastos L929 em cultura de células após a exposição das formulações as micropartículas lipídicas sólidas contendo benzofenona-3 em três diferentes doses de irradiação (10, 25 e 35 J/cm ²) correspondendo a aproximadamente 1, 2 e 3 horas de exposição.....	96
Figura 20:	Reogramas das formulações com micropartículas lipídicas sólidas contendo benzofenona-3.....	99
Figura 21:	Alterações no índice de fluxo, na viscosidade aparente, tixotropia e pH das formulações contendo micropartículas lipídicas sólidas de benzofenona-3.....	100

Figura 22:	Retenção na pele de orelha de porco de B-3 12 horas após a sua aplicação tópica, incluindo as formulações utilizando micropartículas lipídicas sólidas de cera de carnaúba, contendo de B-3 e micropartículas lipídicas sólidas de cera de abelha de B-3.....	101
Figura 23:	Fotoproteção das formulações contendo micropartículas lipídicas sólidas de benzofenona-3.....	104
Figura 24:	Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação (EE) em relação à vazão de alimentação de resfriamento (VAR) e do conteúdo de avobenzona ($AVO_{cont.}$).....	106
Figura 25:	Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação (EE) em relação à vazão de alimentação de dispersão (VAD) e da vazão do ar de resfriamento (VAR).....	108
Figura 26:	Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação (EE) em relação à vazão de alimentação de dispersão (VAD) e do conteúdo de avobenzona ($AVO_{cont.}$).....	108
Figura 27:	Gráfico de superfície de resposta do diâmetro médio das partículas (D_{50}) em relação à vazão do ar de resfriamento (VAR) e do conteúdo de avobenzona ($AVO_{cont.}$).....	110
Figura 28:	Gráfico de superfície de resposta da polidispersividade (SPAN) em relação à vazão do ar de resfriamento (VAR) e a vazão de alimentação da dispersão (VAD).....	112
Figura 29:	Gráfico de superfície de resposta da polidispersividade (SPAN) em relação à concentração de avobenzona ($AVO_{cont.}$) e a vazão de alimentação de dispersão (VAD).....	112

Figura 30:	Difratogramas micropartículas lipídicas sólidas contendo AVO.....	115
Figura 31:	Curva calorimétrica das micropartículas lipídicas sólidas contendo AVO.....	116
Figura 32:	Fotomicrografias das micropartículas lipídicas sólidas contendo AVO.....	116
Figura 33:	Perfil cromatográfico da avobenzona.....	118
Figura 34:	Resultados da fotodegradação das formulações contendo micropartículas lipídicas sólidas otimizadas de avobenzona.....	118
Figura 35:	Fotoproteção da formulação contendo MLS_{OT} de avobenzona.....	120
Figura 36:	Gráfico de superfície de resposta do diâmetro médio das NLSs contendo rutina (D₅₀) em relação à porcentagem de rutina e do tempo.....	121
Figura 37:	Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação (EE) em relação à porcentagem de rutina e do tempo.....	124
Figura 38:	Gráfico de superfície de resposta do conteúdo de ativo (CA) em relação à porcentagem de rutina e da pressão de homogeneização..	125
Figura 39:	Gráfico de superfície de resposta do índice de polidispersividade (IPD) em relação à pressão e do tempo de homogeneização.....	126
Figura 40:	Gráfico de superfície de resposta do índice de polidispersividade (IPD) em relação à pressão de homogeneização e da porcentagem de rutina.....	127
Figura 41:	Gráfico de superfície de resposta ao potencial Zeta (PZ) em relação à porcentagem de rutina e do tempo de homogeneização...	128
Figura 42:	Distribuição de tamanho de NLS contendo rutina obtidas em	

	condições otimizadas.....	130
Figura 43:	Determinação da viabilidade celular de fibroblastos L929 em cultura de células na presença das NLSs sem rutina e NLSs contendo rutina.....	131
Figura 44:	Medida da viabilidade dos fibroblastos de ratos L929 tratados com concentrações crescentes de rutina e NLSs contendo rutina por 4 e 24 h e submetidos a uma única dose de radiação UVB (400 mJ/cm ²).....	133
Figura 45:	Medida da viabilidade dos fibroblastos de ratos L929 tratados com concentrações crescentes de rutina (A) e NLSs contendo rutina (B) por 4 e 24 h e submetidos a uma única dose de radiação UVA (50 J/cm ²).....	133
Figura 46:	Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra os efeitos induzidos pela radiação UVB (500 mJ/cm ²) após 24 horas da exposição em secções histológicas de pele humana coradas com hematoxilina-eosina.....	136
Figura 47:	Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra os efeitos induzidos pela radiação UVB (500 mJ/cm ²) após 24 horas da exposição em secções histológicas de pele humana coradas com hematoxilina-eosina.....	137
Figura 48:	Inibição da formação de células apoptóticas induzidas pela radiação UVB (500 mJ/cm ²) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e	

	nanopartículas lipídicas sólidas de rutina.....	138
Figura 49:	A radiação UVB (500 mJ/cm ²), 24 horas após sua exposição induz a formação de Caspase-3 detectados por imunohistoquímica (verde) em secções de pele humana.....	140
Figura 50:	A radiação UVB (500 mJ/cm ²), 24 horas após sua exposição induz a formação de Caspase-3 detectados por imunohistoquímica (verde) em secções de pele humana.....	141
Figura 51:	Inibição da formação de caspase-3 induzidas pela radiação UVB (500 mJ/cm ²) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina.....	142
Figura 52:	Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra CPDs induzidas pela radiação UVB em pele humana por imunofluorescência usando anticorpo contra CPDs.....	145
Figura 53:	Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra CPDs induzidas pela radiação UVB em pele humana por imunofluorescência usando anticorpo contra CPDs.....	147
Figura 54:	Inibição da formação de CPDs induzidas pela radiação UVB (500mJ/cm ²) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina.....	148
Figura 55:	Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra os	

	efeitos induzidos pela radiação UVB (500 mJ/cm ²) após 24 horas da exposição em secções histológicas de pele reconstruída coradas com hematoxilina-eosina.....	151
Figura 56:	Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra os efeitos induzidos pela radiação UVB (500 mJ/cm ²) após 24 horas da exposição em secções histológicas de pele reconstruída coradas com hematoxilina-eosina.....	153
Figura 57:	Inibição da formação de células apoptóticas induzidas pela radiação UVB (500 mJ/cm ²) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina em pele reconstruída.....	151
Figura 58:	A radiação UVB (500 mJ/cm ²), 24 horas após sua exposição induz a formação de Caspase-3 detectados por imunohistoquímica (verde) em secções de pele reconstruída	156
Figura 59:	Inibição da formação de caspase-3 induzidas pela radiação UVB (500 mJ/cm ²) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina em pele reconstruída.....	157
Figura 60:	A radiação UVB (500 mJ/cm ²), 24 horas após sua exposição induz a formação de CPDs detectados por imunofluorescência em secções de pele reconstruída humana.....	159
Figura 61:	A radiação UVB (500 mJ/cm ²), 24 horas após sua exposição induz	

	a formação de CPDs detectados por imunofluorescência em secções de pele reconstruída.....	160
Figura 62:	Inibição da formação de CPDs induzidas pela radiação UVB (500mJ/cm²) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina em pele reconstruída.....	161
Figura 63:	Indução da peroxidação lipídica pela radiação UVB (500 mJ/cm²) após 4 horas da exposição a de radiação UVB em pele humana.....	163
Figura 64:	Indução da MMPs pela radiação UVB (500 mJ/cm²) após 4 horas da exposição a de radiação UVB em pele humana.....	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Valores fixados para obtenção das MLSs contendo B-3 por <i>spray congealing</i>.....	55
Tabela 2:	Planejamento composto central com fatores estudados para produção de MLS contendo avobenzona.....	67
Tabela 3:	Valores fixados para obtenção das MLSs contendo AVO por <i>spray congealing</i>.....	67
Tabela 4:	Planejamento composto central com fatores estudados.....	71
Tabela 5:	Formulações contendo MLSs e NLSs: composição e porcentagem.....	75
Tabela 6:	Valores do tamanho de partícula, polidispersividade e eficiência de encapsulação das MLSs de cera de abelha e cera de carnaúba contendo benzofenona-3.....	86
Tabela 7:	Características térmicas da benzofenona-3, cera de abelha, cera de carnaúba e suas micropartículas lipídicas sólidas.....	90
Tabela 8:	Planejamento composto central com fatores e respostas das variáveis dependentes estudados.....	107
Tabela 9:	Análise de variância da eficiência de encapsulação das micropartículas lipídicas sólidas contendo avobenzona obtidas por <i>spray congealing</i>.....	107
Tabela 10:	Análise de variância do tamanho médio das micropartículas lipídicas sólidas contendo avobenzona obtidas por <i>spray congealing</i>.....	110
Tabela 11:	Análise de variância da polidispersividade (<i>SPAN</i>) das	

	micropartículas lipídicas sólidas contendo avobenzona obtidas por <i>spray congealing</i>	111
Tabela 12:	Condições otimizadas para a produção de MLSs contendo AVO usando o método da desejabilidade com os valores preditos e atuais.....	114
Tabela 13:	Planejamento composto central e resultados das variáveis dependentes estudadas.....	122
Tabela 14:	Análise de variância do tamanho médio (D_{50}) das NLSs contendo rotina.....	123
Tabela 15:	Análise de variância da eficiência de encapsulação (EE) das NLSs contendo rotina.....	123
Tabela 16:	Análise de variância do conteúdo de ativo (CA) das NLSs contendo rotina.....	124
Tabela 17:	Análise de variância do índice de polidispersividade (IPD) das NLSs contendo rotina	126
Tabela 18:	Análise de variância do potencial zeta (PZ) das NLSs contendo rotina.....	128
Tabela 19:	Análise de variância do ativo recuperado (AR) das NLSs contendo rotina.....	129
Tabela 20:	Condições otimizadas para a produção de NLSs contendo rotina usando o método da desejabilidade com os valores preditos e atuais.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Fe²⁺	Íons ferro
•OH	Radical hidroxil
¹O₂	oxigênio no estado singlete
4-MBC	4-methylbenzylidenecamphor
6-4 PPs	pirimidina-pirimidona (6,4) fotoprodutos
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Ativo recuperado
AVO	avobenzona
AVO_{cont}	Conteúdo de filtro solar avobenzona
B-3	Benzofenona-3
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BN	Bico nebulizador
BP	Bomba peristáltica
CA	Câmara de aquecimento
CA	Conteúdo de ativo
CI	Controle irradiado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNI	Controle não irradiado
COLIPA	The European Cosmetics Association
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPDs	dímeros de ciclobutanodipirimidina
CR	Câmara de resfriamento
D	[Método da desejabilidade
D₅₀	Diâmetro médio das micropartículas

DMEM	Meio Dulbecco modificado por Eagle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EE	Eficiência de encapsulação
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EXP	Experimento
F-MLS_{CA70%}	formulação com MLS_{CA70%}
F-MLS_{CC70%}	formulação com MLS_{CC70%}
F-1	formulação sem B-3 ou MLSs
F-AVO	Formulação que contem apenas avobenzona
F-B3	formulação com B-3
FDA	Food and Drug Administration
FF	Formulação contendo B-3, AVO, OCT livres
FF_{BA}	Formulação contendo B-3 e AVO livres
FF_M	Formulação contendo MLSs de B-3 e AVO, OCT livre
FF_{MBA}	Formulação contendo MLSs de B-3 e AVO
FF_{MR_N}	Formulação contendo MLSs de B-3 e AVO, OCT livres e NLSs de rotina
FFR	formulação contendo B-3, AVO, OCT e rutina livres
FP	Formulação placebo livre de ativos
F-P	Formulações sem AVO ou MLSs
FPS	Fator de proteção solar
FR	Formulação contendo rutina livre
FR_N	Formulação contendo apenas NLSs de rotina
F_{SPF60}	Formulação comercial com fator de proteção solar 60
H₂O₂	peróxido de hidrogênio

HOCl	ácido hipocloroso
IF	Pele irradiada tratada com formulação contendo apenas filtros solares benzofenona-3, avobenzona e octocrileno
IF_{BA}	Pele irradiada tratada com formulação contendo benzofenona-3 e avobenzona
IF_M	Pele irradiada tratada com formulação contendo benzofenona-3 e avobenzonamicroencapsulada e octocrileno
IF_{MBA}	Pele irradiada tratada com formulação contendo benzofenona-3 e avobenzonamicroencapsulada
IF_{MRN}	Pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (benzofenona-3 e avobenzona), octocrileno e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina
IFR	Pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (benzofenona-3, avobenzona e octocrileno) e rutina
IP	Pele irradiada tratada com formulação placebo
IPD	índice de polidispersividade
IR	Pele irradiada tratada com formulação contendo rutina
IR_N	Pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina
MDA	Malondealdeído
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
MLS_{CA}	MLSs de cera de abelha
MLS_{CA70%}	MLSs de cera de abelha contendo 70 % de B-3
MLS_{CC}	MLSs de cera de carnaúba
MLS_{CC70%}	MLSs de cera de carnaúba contendo 70 % de B-3
MLS_{OT}	MLSs otimizadas contendo AVO
MLSs	Micropartículas lipídicas sólidas
MMPs	metaloproteinases da matriz

NLSs	Nanopartículas lipídicas sólidas
NO[•]	óxido nítrico
O.T.C.:	over-the-counter
O₂^{•-}	ânion superóxido
OA	Óleo aquecido
OCT	octocrileno
OMC	octilmetoxicinamato
ONOO⁻	Radical peroxinitrito
P	Pressão de homogeneização
PA	Pressão de atomização
PABA	ácido aminobenzoico
PCC	Pontos centrais compostos
PG	prostaglandinas
PGE2	prostaglandina E2
PLA₂	fosfolipase A₂
PZ	potencial zeta
qsp	Quantidade suficiente para
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RO₂[•]	Radical peroxil
Rut_{cont.}	Conteúdo de rutina
RUV	Raios ultravioleta
SBF	Soro bovino fetal
SPAN	polidispersividade
T	Tempo de homogeneização
TBA	Ácido tiobarbitúrico

UVA	ultravioleta A
UVB	ultravioleta B
UVC	ultravioleta C
VAD	Vazão de alimentação da dispersão
VAR	Vazão do ar de resfriamento

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. OBJETIVOS.....	49
2.1. Gerais:.....	49
2.2. Específicos:	49
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1. Material.....	52
3.2. Métodos	52
3.2.1. Preparação das dispersões.....	52
3.2.2. Preparação das micropartículas lipídicas sólidas por <i>spray congealing</i>	53
3.2.3. Determinação do tamanho de partícula e polidispersividade das MLSs.....	55
3.2.4. Determinação da eficiência de encapsulação das MLSs.....	56
3.2.5. Estudo de difração de raios X de pó das MLSs contendo B-3 e AVO	56
3.2.6. Calorimetria exploratória diferencial das MLSs contendo B-3	56
3.2.7. Microscopia eletrônica de varredura das MLSs contendo avobenzona.....	57
3.2.8. Liberação <i>in vitro</i> das MLSs contendo B-3	57
3.2.9. Linhagem celular e cultura de células	58
3.2.10. Ensaio de captação de vermelho neutro	58
3.2.11. Estudo de fotoestabilidade das MLSs contendo B-3 por CLAE e em cultura de células	59
3.2.12. Preparação de formulações tópicas contendo MLSs de benzofenona-3	60
3.2.13. Estudo de estabilidade das formulações contendo MLSs de B-3 por comportamento reológico	60
3.2.14. Estudo da permeação/retenção usando pele de orelha de porco.....	61
3.2.15. Condições cromatográficas	62
3.2.16. Estudo de fotoproteção das formulações contendo MLSs de B-3 e AVO ..	63
3.2.17. Planejamento experimental para produção das MLSs contendo avobenzona por <i>spray congealing</i>	65

3.2.18. Otimização da obtenção das MLSs contendo avobenzona.....	68
3.2.19. Estudos de fotodegradação das MLSs contendo AVO em formulação tópica	68
3.2.20. Preparação das NLSs contendo rutina pela técnica da microemulsão.....	69
3.2.21. Planejamento experimental para produção das NLSs contendo rutina usando homogeneizador de alta pressão.....	70
3.2.22. Determinação do tamanho médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das NLSs	71
3.2.23. Determinação da eficiência de encapsulação, conteúdo ativo e porcentagem de ativo recuperada das NLSs	72
3.2.24. Otimização da obtenção das NLSs contendo rutina	73
3.2.25. Estudo de citotoxicidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina	73
3.2.26. Avaliação da atividade fotoprotetora das NLSs contendo rutina utilizando o ensaio de captação do vermelho neutro por exposição à UV	74
3.2.27. Preparação de formulações tópicas contendo MLSs de B-3 e AVO, octocrileno e NLSs de rutina	74
3.2.28. Preparação da pele humana.....	76
3.2.29. Preparação da pele reconstruída <i>in vitro</i>	76
3.2.30. Estudo de fotoquimioprevenção das formulações contendo sistemas micro e nanoencapsulados em pele humana e pele reconstruída <i>in vitro</i> contra a radiação UVB	78
3.2.31. Preparação das amostras para avaliação de ensaios imunohistoquímicos...	79
3.2.32. Determinação de células apoptóticas	80
3.2.33. Determinação e quantificação da caspase-3 e CPDs	80
3.2.34. Avaliação da fotoquimioprevenção das formulações contendo sistemas micro e nanoencapsulados em pele humana.....	81
3.2.35. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica em pele humana	82
3.2.36. Avaliação da metaloproteinases totais em pele humana	83
3.2.37. A análise estatística	83
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1. Caracterização das micropartículas lipídicas sólidas contendo B-3	85
4.2. Liberação <i>in vitro</i> das MLSs contendo B-3	91
4.3. Estudo da citotoxicidade das MLSs contendo B-3 em cultura de células de fibroblastos de rato L929.....	92

4.4. Estudo de fotoestabilidade das MLSs contendo B-3 por CLAE e em cultura de células.....	94
4.5. Estabilidade das formulações contendo MLSs pela avaliação do comportamento reológico	96
4.6. Retenção/permeação em pele de orelha de porco	100
4.7. Estudo de fotoproteção das formulações contendo MLSs de B-3.....	102
4.8. Planejamento experimental para produção das MLSs contendo AVO por <i>spray congealing</i>	104
4.9. Otimização da produção MLSs contendo AVO e verificação do modelo	113
4.10. Caracterização físico-química das MLS _{OT} contendo AVO	114
4.11. Estudo de fotoestabilidade das MLS _{OT} de AVO.....	117
4.12. Estudo de fotoproteção das formulações contendo MLS _{OT} de AVO.....	119
4.13. Planejamento experimental para produção das nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina	121
4.14. Otimização da produção NLSs contendo rutina.....	130
4.15. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina	132
4.16. Avaliação das células apoptóticas em pele humana.....	135
4.17. Avaliação da formação de caspase-3 em pele humana	139
4.18. Avaliação da formação de CPDs em pele humana.....	143
4.19. Avaliação das células apoptóticas em pele reconstruída	149
4.20. Avaliação da formação de caspase-3 em pele reconstruída.....	155
4.21. Avaliação da formação de CPDs em pele reconstruída	158
4.22. Avaliação da formação peroxidação lipídica em pele humana tratadas com formulação por 4 horas após a radiação UVB.....	161
4.23. Avaliação da formação metaloproteinases totais em pele humana tratadas com formulação por 4 horas após a radiação UVB.....	163
5. CONCLUSÕES.....	167
REFERÊNCIAS.....	170

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A pele é um órgão complexo, formado por diferentes estruturas e com diversos tipos celulares. Possui a maior área superficial do corpo, delimitando a interface entre o organismo e o meio ambiente (CROSS et al., 1998). Desta maneira, a pele é diretamente exposta a vários fatores químicos, físicos e microbiológicos, dentre os quais, pode-se citar a radiação ultravioleta (RUV, 290 – 400 nm), proveniente dos raios solares. A RUV é responsável por alguns efeitos benéficos como a síntese de vitamina D3 (colecalciferol), que é responsável pela fixação de cálcio nos ossos, ação fungicida e bactericida, além da sensação de bem-estar (OLIVEIRA; FONSECA & FONSECA, 2008). Dentre os efeitos maléficos provocados pela exposição à RUV a curto e médio prazos encontram-se: a perda de água e o ressecamento da pele provocando aspecto opaco, perda da elasticidade, eritema (vermelhidão), edema, descamação e manchas. Podem ocorrer ainda queimaduras solares de diferentes graus. A exposição solar crônica da pele à RUV leva a uma variedade de efeitos adversos, incluindo o fotoenvelhecimento cutâneo (enrugamento, elastose e irregularidade da pigmentação), a fotocarcinogênese e a diminuição da imunidade do indivíduo (RAMOS et al., 2003; OLIVEIRA; FONSECA & FONSECA, 2008).

A RUV subdivide-se em: ultravioleta A (UVA), entre 320 e 400 nm, responsável pelo envelhecimento prematuro da pele; ultravioleta B (UVB), entre 290 e 320 nm, responsável pelas queimaduras solares (radiação eritematogênica); e ultravioleta C (UVC), entre 100 e 290 nm, sendo a faixa de radiação mais danosa, porém inócua ao ser humano visto que é retida pela camada de ozônio não chegando à superfície terrestre.

Os raios UVB possuem energia suficiente para induzirem, diretamente, lesões às moléculas de DNA, e podem, também, gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). Dois tipos de lesões são majoritariamente formados em decorrência da exposição do

DNA à UVB: os dímeros de ciclobutanodipirimidina (CPDs) e os pirimidina-pirimidona (6,4) fotoprodutos (6-4 PPs) (NISHIGORI, 2006). A formação de CPDs ocorre quando bases pirimidínicas vizinhas absorvem a energia da RUV, formando um anel ciclobutano pela ligação covalente entre os átomos de carbono C5 e C6 de ambas as bases nitrogenadas. No caso dos 6-4 PPs, embora também se trate de uma ligação covalente entre pirimidinas da mesma fita, esta não é cíclica, envolvendo os carbonos C6 e C4 das pirimidinas (citosinas e, em menor proporção, timinas) 5'e 3', respectivamente. (NISHIGORI, 2006). Um esquema representativo das duas lesões é apresentado na Figura 1.

Figura 1. Fotolesões induzidas pela exposição à UVB.

Lesões do tipo CPDs representam 70-80 % dos danos causados pela UVB enquanto que os 6-4 PPs são responsáveis por 20-30 % de danos ao DNA. Ambos os tipos de dímeros podem causar uma distorção helicoidal que afeta o emparelhamento adequado das bases nitrogenadas dos nucleotídeos e conduz a perturbações dos processos de transcrição e de replicação (SCHULZ, et al., 2002). Dependendo da sequência de DNA nas imediações do dímero formado, pode haver uma perturbação da

estabilidade do nucleossoma do DNA em níveis variados. O enovelamento incorreto do DNA pode causar interações errôneas entre proteínas e o DNA (SCHULZ et al., 2002). Um grau elevado de danos à fita de DNA leva a interrupção do ciclo celular e a indução da apoptose celular, caracterizada pela presença de queratinócitos danificados com perfil disqueratótico (queratinócitos de citoplasma eosinofílico e núcleo picnótico) e vacuolizados, classicamente conhecidos como *sunburncells*. Além disso, pode ocorrer a perda dos mecanismos de controle do crescimento pela célula levando a iniciação do câncer de pele (carcinoma de células basais e escamosas e melanoma maligno) (SCHULZ, et al., 2002).

A radiação UVA é menos energética que a UVB, mas possui maior poder de penetração, sendo que o seu principal modo de ação se dá pela geração de EROs (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006). Fotossensibilizantes endógenos, como DNA, porfirinas, ácido urônico e aminoácidos aromáticos, excitados, pela captura de fótons da radiação UVA, transferem a energia para o oxigênio molecular conduzindo a geração de EROs. Para manter a integridade das estruturas celulares, a pele é provida de grande número de mecanismos de defesa antioxidantes (KOHEN & GATI, 2000) que contam com sistemas enzimáticos (catalase, superóxido dismutase, glutathionaperoxidase e glutathionaredutase) e não-enzimáticos (glutathiona, α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno) (STEENVOORDEN & BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1997) e que estão em maior concentração na epiderme, por ser esta a camada mais externa da pele (SHINDO et al., 1994). Sob tensão normal de oxigênio tais mecanismos são suficientes para manter a homeostasia, removendo os radicais livres produzidos. Porém, quando há alterações acentuadas neste equilíbrio um estado pró-oxidante pode ser gerado, levando assim ao chamado estresse oxidativo (ASIKAINEN et al., 2002), com aumento na produção de EROs e conseqüentes danos às moléculas como proteínas,

lipídios e ácidos nucleicos (STEENVOORDEN & BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1997). As EROs mais reativas nos organismos vivos incluem hidroxil ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), peroxil ($\text{RO}_2\cdot$), peroxinitrito (ONOO^-), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio no estado singlete (frequentemente simbolizado como $^1\text{O}_2$). As EROs podem remover elétrons de resíduos de macromoléculas orgânicas de acordo com a seguinte reação geral:

Desta forma, as EROs são capazes de iniciar uma reação em cadeia que resulta em danos ao DNA a distâncias consideráveis da reação inicial (SARAN & BORS, 1990).

O ataque ao DNA por EROs gera uma variedade de produtos. Por exemplo, o radical hidroxil pode agir sobre o DNA originando quebras de simples e/ou dupla fita, assim como lesões nas bases purínicas e pirimidínicas, afetando a integridade do genoma. A maioria dos produtos de dano oxidativo ao DNA estão identificados na Figura 2.

Figura 2. Exemplos de modificações oxidativas encontradas nas bases nitrogenadas de DNA de mamíferos (CROTEAU & BOHR, 1997).

Das principais classes de biomoléculas (açúcares, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios), que podem ser atacadas pelas EROs, os lipídios são, provavelmente, os mais susceptíveis, pois as membranas biológicas contém consideráveis quantidades de lipídios altamente insaturados e são banhadas por fluídos ricos em oxigênio e metal (INAL; KANBAK & SUNAL, 2001).

A peroxidação lipídica induzida por radiação UV pode conduzir a uma desorganização da membrana celular com liberação de fosfolipídios que associados a um aumento das atividades da fosfolipase A₂ (PLA₂) e da ciclooxygenase-2 (COX-2) induzidas, também, pela radiação UV, resultam em níveis maiores de produção de prostaglandinas (PG), incluindo a prostaglandina E2 (PGE2), que causam inflamação na pele (MAHNS, et al., 2004).

As citocinas pró-inflamatórias, por sua vez, desencadeiam a expressão de metaloproteinases em queratinócitos e fibroblastos de pele. As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de zinco endopeptidases capazes de degradar estruturas protéicas como colágeno, elastina e outras proteínas presentes na matriz extracelular (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006). A RUV induz aumento nos níveis de RNAm, de proteína e atividade enzimática de pelo menos três MMPs. São elas: MMP-1, que degrada fibras de colágeno tipo I e III, MMP-3 (estromelisina-1) que degrada colágeno tipo IV e MMP-9 (gelatinase-B) que degrada fragmentos de colágeno gerados pela MMP-1. Juntas, estas MMPs têm a capacidade de degradar a maior parte das proteínas estruturais que compõe o tecido conectivo dérmico. Inicialmente, a MMP-1 cliva as moléculas tripla hélice de colágeno em fragmentos de $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ de comprimento e estes são então clivados em fragmentos menores pelas MMPs 3 e 9. Essa degradação resulta em acúmulo de fragmentos de fibras de colágeno que prejudicam a integridade estrutural da matriz extracelular dérmica (BRENNAN et al., 2003). A MMP-1, dentre as

enzimas capazes de degradar o colágeno presente na pele, é a que apresenta maior atividade enzimática, além de ser extensivamente induzida pela exposição à RUV (BRENNAN et al., 2003).

Assim, a exposição crônica a radiação solar UV altera a composição e arquitetura da matriz extracelular da derme, resultando em alterações tanto clínicas como histológicas na pele humana. Alterações clínicas incluem perda de tônus e elasticidade, aumento da aspereza, pigmentação irregular e enrugamento profundo da pele. Histologicamente, a pele com danos decorrentes da exposição à radiação solar apresenta alterações qualitativas e quantitativas no tecido conectivo dérmico. Estas incluem além de danos nas fibras elásticas, no colágeno e nas glicosaminoglicanas da matriz extracelular da derme, um acúmulo de material amorfo elástico, condição esta denominada elastose (WANG & KOICHEVAR, 2005).

O uso de protetores solares representa a medida mais utilizada para reduzir os efeitos deletérios dos raios ultravioletas (RUV) na pele humana (SCALIA & MEZZENA, 2010). Os constituintes ativos desses produtos atenuam a transmissão dos RUV na pele pela absorção, reflexão ou espalhamento da radiação (SCALIA; MEZZENA & IANNUCELLI, 2007).

Nos Estados Unidos da América, o FDA classifica filtros solares como medicamento de venda livre (O.T.C.: *over-the-counter*) e estabelece normas para determinação do fator de proteção solar (FPS) e resistência à água. Loções que tenham FPS 15 ou mais poderão manter a informação no rótulo (UVA + UVB = amplo espectro) de que reduzem o risco de câncer e o envelhecimento precoce da pele. Qualquer produto que tiver o FPS 2 a 14 deve incluir o aviso de que o produto não ajuda a prevenir contra o câncer ou envelhecimento da pele. O FPS máximo permitido no rótulo deverá ser igual a 50+ (FDA, 2011).

No Brasil, os filtros solares são classificados como cosméticos. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – RDC nº 237 de agosto de 2002, existem várias regras para quando tais substâncias forem adicionadas à formulação: no rótulo do produto devem conter informações sobre o FPS, indicação para qual tipo de pele, composição de sua formulação, especificação sobre a resistência à água e advertências quanto ao uso. No mercado de cosméticos, atualmente, existem inúmeros filtros solares com diferentes formas farmacêuticas para o uso tópico como: cremes, loções, géis, aerossóis, soluções e espumas. Inicialmente só eram usados para a proteção contra queimadura solar, mas hoje são usados para proteção contra o envelhecimento e também contra o câncer de pele (RANGEL & CORRÊIA, 2002).

Como características necessárias a um filtro solar podem-se destacar:

- ✓ Ser compatível com os inúmeros ingredientes usados na formulação;
- ✓ Ser estável e conservar suas propriedades quanto exposto à luz;
- ✓ Ser inócuo para a pele sadia e atóxico;
- ✓ Ter aceitação cosmética pelo consumidor;
- ✓ Ter alta substantividade (capacidade de se ligar à camada córnea sem ser absorvido);
- ✓ Ter alta estabilidade ou habilidade de manter suas características de eficácia perante condições adversas, como transpiração e exposição à água (RANGEL & CORRÊIA, 2002; SCHERSCHUM & LIM, 2001).

As moléculas fotoprotetoras podem ser classificadas como: físicas ou químicas. As físicas agem refletindo e/ou dispersando a radiação incidente. Como principais exemplos temos: o dióxido de titânio e o óxido de zinco (RANGEL & CORRÊIA, 2002, GONZÁLEZ, FERNÁNDEZ-LORENTE & GILABERTE-CALZADA, 2008).

Já os filtros químicos podem ser naturais ou sintéticos absorvendo a radiação UV (Figura 3). Como exemplo dessas classes, há as seguintes famílias químicas: PABA (ácido p-aminobenzóico e derivados), derivados do ácido cinâmico, derivados do ácido salicílico, derivados da cânfora, ácido fenilbenzimeidazol, benzofenonas, antranilatos, dibenzoilmetanos e outros (como o octocrileno) (RANGEL & CORRÊA, 2002).

A maioria dos filtros orgânicos são compostos aromáticos, dissustituídos, com um grupamento carbonila (do tipo cetona ou éster), e um substituinte com par de elétrons livres (amina ou metoxila) doadores de elétrons, normalmente em posição orto ou para ao grupamento carbonila (Figura 3). Ao absorverem a radiação ultravioleta, os elétrons situados no orbital π HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) são excitados para o orbital π^* LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia) e ao retornarem para o estado inicial, o excesso de energia é liberado em forma de calor. As transições eletrônicas que estão envolvidas durante a absorção da luz ultravioleta ocorrem entre a diferença de energia HOMO-LUMO (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007).

Figura 3. Fórmula estrutural genérica da maioria dos filtros solares orgânicos. Adaptado de SHAATH, 1997.

Sendo assim, substâncias que apresentam a configuração citada acima absorvem a radiação ultravioleta de menor comprimento de onda, ou seja, comprimento de onda

que transporta alta energia, e liberam esta energia na forma de uma radiação de elevado comprimento de onda, ou seja, baixa energia. A energia absorvida da radiação ultravioleta corresponde à energia requerida para causar uma excitação fotoquímica na molécula do filtro solar.

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

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

Formulações antisolares contendo filtros solares UVB já são utilizadas com frequência por décadas, enquanto que as com filtros solares UVA e de amplo espectro foram desenvolvidas mais recentemente (LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007). Os filtros sintéticos orgânicos: 4- metoxicinamato de 2- etilexila ou octilmetoxicinamato (OMC); 2-ciano-3,3-difenil-acrilato de 2-etilexila ou octocrileno (OCT); e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona ou benzofenona-3 (B-3) são os mais utilizados mundialmente, pois abrangem ampla faixa dos espectros UVA e UVB (RANGEL & CORRÊA, 2002).

O OCT é um derivado pertencente à classe dos cinamatos (Figura 4), de fórmula molecular igual a $C_{24}H_{27}NO_2$, e apresenta-se como um líquido viscoso amarelo claro, com odor aromático típico, que absorve a radiação na faixa do UVB, com absorção máxima em 303 nm. É comumente utilizado para estabilizar o OMC, reduzindo sua isomerização e consequentemente melhorando a eficácia da formulação antissolar. É solúvel em miristato de isopropila, etanol, álcool isopropílico, insolúvel em água,

propilenoglicol, e glicerina. A concentração máxima permitida pelo FDA e pela maioria dos países é de 10 % (SHAATH, 2007).

A B-3 é uma cetona aromática (Figura 4), de fórmula molecular igual a $C_{14}H_{12}O_3$, um composto importante na fotoquímica orgânica e na cosmetologia. Absorve a radiação nas faixas UVA e UVB, apresenta absorção máxima em 286 nm e em 324 nm. É um pó amarelo claro, inodoro, insolúvel em água e em óleo mineral, solúvel em propilenoglicol, etanol, álcool isopropílico, glicerina, miristato de isopropila, em concentrações até 12 %. A B-3 age como filtro ótico, pois ela é capaz de utilizar a energia da radiação UV para se excitar e na volta para o estado fundamental ela dissipa essa energia em forma de calor para o ambiente ao invés de emitir radiação lesiva à pele. Isso é possível devido à B-3 possuir seus estados de singleto e tripleto muito próximos entre si em energia. A concentração máxima permitida pela agência internacional reguladora de alimentos e medicamentos (U.S. FDA/CDER, 1997) é de 6 %, porém a maioria dos países permite a concentração máxima de 10 %, incluindo o Brasil e a COLIPA (SHAATH, 2007).

Figura 4. Características das moléculas fotoprotetoras e seus respectivos perfis de absorção de UV. Adaptado de Hanselet al., 1995.

Longos períodos de exposição aos raios solares podem conduzir à degradação química e/ou a penetração dos filtros solares nas camadas mais profundas da pele levando a uma diminuição da sua ação protetora e também podendo induzir a produção de espécies tóxicas, por exemplo, radicais livres, resultando em riscos ao usuário (ALBERTINI et al., 2009). Desta forma, um parâmetro importante no desenvolvimento de um protetor solar efetivo e seguro é este apresentar uma alta fotoestabilidade e permanecer apenas nas camadas superficiais da pele. O uso de B-3, um filtro de amplo espectro de absorção solar (UVA-UVB), geralmente usado em associação a outros filtros UVB em formulações com fator de proteção solar (FPS) elevado, foi detectada na urina humana em concentrações de 1 a 2 % da quantidade referente à aplicada na pele e também no leite materno humano (HANSON; GRATTON & BARDEEN, 2006). Outros resultados em ratos e camundongos mostraram que a B-3 causou ganho de peso

desses animais e alterações no fígado, rim e órgãos reprodutores quando administrada dermicamente e oralmente (CALAFT et al, 2008). O 4-methylbenzylidenecamphor (4-MBC), um protetor solar que promove excelente proteção contra raios UVB também mostrou capaz de atingir a circulação sistêmica em estudos realizados em ratos quanto em humanos (JANJUA et al., 2004). Outros filtros solares exibem rápida decomposição pela ação da luz solar comprometendo a estabilidade da formulação. É o caso do butilametoxidibenzoilmetano, mais conhecido como avobenzona (AVO), um filtro solar muito empregado em formulações tópicas por apresentar forte absorção na região do UVA (ALBERTINI et al, 2008). Além disso, Hanson, Gratton e Bardeen (2006) comprovaram que os filtros solares que penetram nas camadas mais profundas da pele, podem atuar como fotossensibilizadores induzindo a formação de EROs na presença da RUV.

Para complementar a ação protetora e diminuir a concentração de substâncias que possam causar efeitos indesejados no uso das formulações antissolares, torna-se importante que os filtros atuais possuam na sua composição propriedades antioxidantes oriundas de fontes naturais (BABY et al., 2008).

Para minimizar a produção das EROs, pode-se lançar mão de agentes antioxidantes que exercem efeitos antiinflamatórios e anticarcinogênicos na pele. Recentemente, produtos naturais bioativos tem sido foco de inúmeras pesquisas, devido à presumível utilização segura, a questões ecológicas (sustentabilidade) e mínimo impacto ambiental (VELASCO et al, 2008). A rutina (3, 3', 4', 5, 7, pentahidroxiflavona-3-rutinosídeo), objeto deste estudo, é um flavonóide de ocorrência natural, sendo bem conhecido por apresentar diversas atividades como antioxidante, antitumoral, antiinflamatória, antiagregante plaquetário, entre outras. A rutina é abundante na natureza e está presente em diversos vegetais como, por exemplo, o trigo-

sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), a Uncária (*Uncaria eliptica*), e no fruto da árvore brasileira Fava-d'Anta (*Dimorphandra mollis*) (FERES et al., 2006). O uso em formulações tópicas de antioxidantes representa uma estratégia interessante de proteção cutânea contra o estresse oxidativo ocasionado pela radiação UV (GUARATINI; MEDEIROS & COLEPICOLA, 2007). Contudo, a penetração de compostos bioativos nas camadas mais profundas da pele é necessária para atingir o seu efeito terapêutico desejado e diversas estratégias podem ser usadas para aumentar a penetração desses agentes antioxidantes. Vicentini e colaboradores (2008) produziram uma micremulsão O/A de quercetina, a qual aumentou a penetração deste flavonóide ambos *in vivo* quanto *in vitro* diminuindo os danos causados pela radiação UVB. Outro tipo de formulação interessante seriam as nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) contendo esses bioativos. As NLSs são compostas de lipídios fisiologicamente biocompatíveis apresentando uma faixa de tamanho de 50 a 1000 nm (KHERADMANDNIA et al, 2010). As NLSs têm conduzido um aumento da absorção percutânea de fármacos e tem permitido uma ação direcionada em locais específicos da pele. É bem demonstrado que, depois da aplicação na pele, as nanopartículas podem promover um contato com as junções superficiais dos corneócitos nas camadas mais externas da pele devido a um pronunciado efeito adesivo. A aderência das NLSs na pele conduz a formação de um filme e conseqüentemente um efeito de oclusão o que proporciona uma maior penetração destas nas camadas mais profundas da pele (PASSERINI et al., 2009). Ao contrário das NLSs, as micropartículas lipídicas sólidas (MLSs) são bem maiores, da ordem de 1 a 1000 µm, evitando que os filtros solares penetrem através do estrato córneo. Desta forma, as MLSs têm emergido como carreadores atrativos para aplicação tópica no campo farmacêutico e cosmético por proporcionar melhor estabilidade, maior ação dos filtros solares, além de serem biodegradáveis e biocompatíveis com a pele devido a sua constituição lipídica. Outras

vantagens das MLSs incluem boa afinidade com o estrato córneo, onde o filtro solar destina-se a agir, e com um tamanho de partícula apropriado (10-50 μm) reduz a absorção cutânea do protetor solar na pele, mantendo as propriedades desejáveis para a aplicação tópica (TURSILLI et al., 2007). As MLSs podem ser preparadas por diferentes processos tais como evaporação de solvente, dispersão fundida, homogeneização por aquecimento e resfriamento, *spray drying* e *spray congealing* (ARAÚJO et al., 2010; MARTINS, et al., 2013; MARTINS, et al., 2012). Recentemente, a técnica de *spray congealing*, também conhecida como *spray chilling* ou *spray cooling*, está ganhando considerável atenção, especialmente do ponto de vista da segurança e rapidez (ALBERTINI et al., 2008). Esta tecnologia demonstra uma grande vantagem frente às tradicionais, pois é adequada para a produção em larga escala, pelo fato de poder ser operado continuamente (EMAS; NYQVIST, 2000), elimina etapas de produção e não necessita do uso de solventes, sendo considerada uma técnica ambientalmente correta. Com relação ao tempo e energia gastos no processo, o *spray congealing* apresenta-se mais econômico quando comparado a outras técnicas como o *spray drying* (PASSERINI et al., 2006). Esta técnica tem sido pouco explorada do ponto de vista científico: existem apenas dois trabalhos na literatura utilizando o *spray congealing* para produção de MLSs de uso tópico. Por exemplo, Albertini e colaboradores (2009) produziram MLSs avobenzona usando cera de carnaúba como material lipídico. Os resultados mostraram uma melhora na fotoestabilidade e controle da liberação deste filtro UVA. Portanto, o emprego desta técnica para a produção de MLSs de filtro solar parece ser muito interessante, sendo necessários estudos mais aprofundados de suas aplicações.

A utilização de animais em pesquisa, principalmente de mamíferos, tem trazido discussões acaloradas por parte da sociedade e da própria comunidade científica. Esse

fato, aliado ao banimento da experimentação animal na União Européia tem levado a um crescente interesse na busca por métodos alternativos ao uso de animais. Segundo o Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (*ECVAM – European Centre for the Validation of Alternative Methods*) um método alternativo é qualquer método utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em experimentação científica. W. M. S. Russel e R. L. Burch em seu livro “*The Principles of Humane Experimental Technique*”, publicado pela primeira vez em 1959, estabeleceram três tipos de métodos alternativos: o de redução, que obtém um nível comparável de informações com o uso de menor número de animais por experimento, ou mais informações utilizando o número original de animais; o de refinamento, que visa o alívio ou a diminuição da dor, estresse e sofrimento dos animais; e o de substituição, que permite a obtenção de um resultado comparável sem a utilização de animais vertebrados (PURCHASE et al, 1998). Esses três tipos de métodos alternativos são referidos como “os três Rs” (*The three Rs – Reduction, Refinement and Replacement*).

A busca de métodos alternativos para experimentos agressivos tem levado ao desenvolvimento de técnicas como cultura celular, cultura com mais de um tipo celular e cultura de pele reconstruída (CROCE, 1999).

O modelo atualmente aceito para a avaliação da toxicidade de novos agentes é a cultura de células, uma importante ferramenta de estudo em que se pode investigar as interações específicas que ocorrem em nível celular. As células cultivadas podem crescer e sobreviver mais facilmente que os tecidos adultos. Elas são obtidas pela desagregação enzimática ou mecânica de um pedaço de tecido ou pela migração espontânea de um explante (PIZZOFERRATO, et al. 1994). As células cultivadas *in vitro* mantêm suas características e funções originais. Porém, a cultura de células da

pele não é um modelo apropriado para a avaliação de compostos insolúveis em meio aquoso e formulações semi-sólidas (VIOUX-CHAGNOLEAU et al. 2006).

A utilização de técnicas como a cultura de pele reconstruída para substituição ou refinamento de experimentos agressivos é uma proposta válida, visto que a pele reconstruída é preparada a partir de células isoladas de tecidos humanos possuindo, portanto, características similares às apresentadas *in vivo*. O modelo de pele reconstruída *in vitro* é baseado na proliferação de queratinócitos em uma epiderme diferenciada e multiestratificada sobre uma base dérmica. Várias células cutâneas podem ser incorporadas à derme ou epiderme como os melanócitos, as células de Langerhans, ou mesmo células endoteliais. Alguns desses modelos já estão disponíveis para a comercialização, como o EpiDerm[®], Episkin[®] e o SkinEthic[®], e são frequentemente testados e validados para estudos farmacotoxicológicos (NETZLAFF, 2005).

Portanto, o modelo de pele reconstruída é uma ferramenta atrativa para estudar a fototoxicidade de formulações cosméticas contendo filtros solares e/ou compostos de origem natural. Embora o modelo de pele reconstruída permita estudar a citotoxicidade e mutagenicidade induzidas pela radiação UV eles exibem uma função de barreira frágil e ausência de descamação do estrato córneo. Para superar essas limitações outros modelos são desenvolvidos e usados especialmente em estudos de absorção como os explantes de pele humana, provenientes de procedimentos cirúrgicos e explantes de pele de porco.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais:

- ✓ Produzir micropartículas lipídicas sólidas dos filtros solares benzofenona-3 e avobenzona pela técnica de *spray congealing*;
- ✓ Obter nanopartículas lipídicas sólidas contendo o flavonóide rutina;
- ✓ Desenvolver uma formulação tópica contendo os filtros solares benzofenona-3 e avobenzona microencapsulados em associação com filtro solar não encapsulado octocrileno e nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina;
- ✓ Avaliar a eficácia fotoquimiopreventiva dessa formulação por meio de ensaios *in vitro* usando biópsias de pele humana e pele reconstruída *in vitro* contra a radiação UVB.

2.2. Específicos:

- ✓ Avaliar a proporção ativo:carreador na produção das micropartículas lipídicas sólidas de cera de carnaúba e cera de abelha contendo benzofenona-3 por *spray congealing*;
- ✓ Determinar o melhor carreador para a produção de micropartículas contendo benzofenona-3 em estudos *in vitro* de permeação/retenção usando pele de orelha de porco;
- ✓ Avaliar a capacidade fotoprotetora das micropartículas lipídicas sólidas contendo benzofenona-3 contra a radiação ultravioleta por técnicas *in vitro* de cultura celular;
- ✓ Produzir e otimizar micropartículas lipídicas sólidas contendo avobenzona pelo emprego de um planejamento fatorial para obter micropartículas com características adequadas ideais para aplicação tópica;

- ✓ Caracterizar as propriedades físico-químicas das micropartículas pela determinação do tamanho médio, eficiência de encapsulação, morfologia, propriedades térmicas e cristalinas;
- ✓ Produzir e otimizar a obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina usando um planejamento fatorial;
- ✓ Avaliar a fototoxicidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina contra a radiação ultravioleta por ensaios *in vitro* de cultura celular;
- ✓ Avaliar a capacidade de inibição da formação da caspase-3, dímeros de pirimidinas e células apoptóticas da formulação contendo filtros microencapsulados e não encapsulados com nanopartículas lipídicas sólidas de rutina usando biópsias de pele humana e pele reconstruída contra a radiação ultravioleta UVB;
- ✓ Avaliar a capacidade de inibição da formação de metaloproteínases e peroxidação lipídica da formulação contendo filtros microencapsulados e não encapsulados com nanopartículas lipídicas sólidas de rutina usando biópsias de pele humana e pele reconstruída contra a radiação ultravioleta UVB.

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

A benzofenona-3 e avobenzona foram adquiridos da Merck (*Darmstadt*, Alemanha). A rutina foi fornecida pela Sigma Aldrich (EUA). A cera de abelha e cera de carnaúba foram adquiridos da Henrifarma (São Paulo, Brasil). Os solventes de grau CLAE foram fornecidos pela JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Hostacerin SAF, óleo de macadâmia, propilenoglicol, ácido oléico, lecitina de ovo, esqualeno, nipaguard e phenova foram adquiridos da PharmaSpecial Especialidades Químicas e Farmacêuticas Ltda (São Paulo, Brasil). O meios de cultura e aditivos foram adquiridos da Gibco (Invitrogen, Gibco Cell Culture, Portland, OR, EUA) e as placas de cultivo celular foram adquiridos da BD Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação das dispersões

As dispersões contendo B-3 foram preparadas pelo método da fusão. Foram preparadas oito tipos de dispersões, as quais se diferenciaram apenas pelo conteúdo de ativo (0, 30, 50 e 70 %) e tipo de carreador (cera de abelha ou cera de carnaúba). Primeiramente, o material lipídico (cera de abelha ou cera de carnaúba) foi fundido e mantido a 95 °C. Em seguida a B-3 foi adicionada sob o lipídio fundido e mantido em agitação. Após homogeneização da mistura a dispersão foi submetida à produção das MLSs por *spray congealing*. Cada experimento foi feito usando 50 g de material. Da mesma maneira como descrito acima, as dispersões contendo AVO foram preparadas apenas com cera de carnaúba e em percentagens de ativo de acordo com um planejamento experimental, descrito no item 2.2.17. Nas dispersões contendo AVO foram preparadas sempre um total de 30 g de material.

3.2.2. Preparação das micropartículas lipídicas sólidas por *spray congealing*

As MLSs foram produzidas usando um aparelho de *spray dryer* modificado (Figura 5), modelo MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda), com capacidade de 0,5 litro por hora. A Figura 6 mostra o esquema de funcionamento do aparelho módulo *spray congealing*. Esse aparelho operou em modo co-corrente, com um bico nebulizador (BN) do tipo duplo fluído, recebendo ar comprimido e a dispersão por entradas distintas, com orifício de saída de 1,2 mm, responsável pela produção das gotículas do material fundido. A câmara de resfriamento era constituída de borossilicato e tinha um diâmetro interno de 13 cm e 51 cm de comprimento. O ar de resfriamento foi fornecido por um soprador de ar cuja vazão foi determinada por um anemômetro (MDA 11, Minipa Ltda, Manaus, Brasil) na saída de ar frio localizada no ciclone separador. A temperatura do ar de saída foi determinada por um sensor tipo PT 100 e controlada por um controlador digital tipo PID (HW2000, Coel Ltda, São Paulo, Brasil). A dispersão contendo filtro solar:carreador fundido foi mantido a 95 °C, sob agitação, por uma chapa aquecedora/magnética, modelo TE0851 (Tecnal, São Paulo, Brasil), foi bombeada até o BN por uma bomba peristáltica (BP 1) com vazão ajustável e cabeça com camisa de aquecimento mantida a 80 °C. A mangueira de silicone desta bomba foi mantida aquecida a 100 °C por uma fita aquecedora (Fisatom, Ltda, São Paulo, Brasil) e sensor tipo PT 100 conectado a um controlador digital (HW 500, Coel Ltda) para evitar a solidificação da dispersão antes de chegar ao BN. O BN foi mantido aquecido por um sistema de circulação de óleo a 140 °C através do auxílio de uma bomba peristáltica (BP 2), modelo Masterflex L/S 752450 (Cole Parmer Instrument Company, São Paulo, Brasil) para evitar solidificação da dispersão no bico e interrupção do processo de obtenção das MLSs.

Figure 5. *Spray dryer* modelo LM MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Figura 6. Esquema do processo de *spray congealing*. BN - bico nebulizador; BP 1 - bomba peristáltica que impulsiona a dispersão ao BN; BP 2 - bomba peristáltica que promove a circulação do fluído aquecido (140 °C) ao BN.

A Tabela 1 mostra as condições de preparo das MLSs contendo B-3. As MLSs contendo AVO foram obtidas usando um planejamento experimental apresentado no item 3.2.17.

Tabela 1. Valores fixados para obtenção das MLSs contendo B-3 por *spray congealing*.

Parâmetros	Valores fixos
Pressão do ar de atomização	6 bar
Vazão do ar de atomização	50 L/min
Vazão do ar de resfriamento	1,2m ³ /min
Temperatura da fita aquecedora	100 °C
Temperatura do banho de óleo vegetal	150 °C
Temperatura da dispersão	95 °C
Temperatura de ar de saída	20 °C

3.2.3. Determinação do tamanho de partícula e polidispersividade das MLSs

A distribuição de tamanho de partícula foi determinada por difração laser no aparelho modelo LS TM 13 320 (Beckman Coulter, Miami, EUA). O meio de dispersão utilizado água destilada, pois tanto as ceras quanto os filtros solares estudados são insolúveis em meio aquoso. Os valores de D_{10} , D_{50} e D_{90} foram determinados e usados para calcular a polidispersividade (*SPAN*), de acordo com a Equação (1). *SPAN* representa uma medida da largura da distribuição de tamanho (ILIC et al., 2009) onde D_{10} , D_{50} e D_{90} são os tamanhos em que 10, 50 e 90 % das partículas apresentam. O valor de *SPAN* indica a extensão da distribuição de tamanho das partículas (GAVINI et al., 2006).

$$SPAN = \frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}}$$

Eq. (1)

3.2.4. Determinação da eficiência de encapsulação das MLSs

Foi pesada uma quantidade de 25 mg de MLSs e adicionados em 25 mL de etanol:água destilada (1:1). As amostras foram deixadas em sonicação por 15 minutos. Após esse período as soluções foram filtradas, com auxílio de filtros Millipore de 0,22 µm, e a quantidade de AVO e/ou B-3 foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A eficiência de encapsulação foi obtida pela Equação (2).

$$EE \% = \left(\frac{Q_{obtida}}{Q_{teórica}} \right) \times 100$$

Eq. (2)

Onde: EE % é a eficiência de encapsulação do filtro solar (AVO ou B-3) nas MLSs; Q_{obtida} é a quantidade de filtro solar extraída das MLSs; $Q_{teórica}$ é a quantidade de filtro solar que teoricamente está presente em 25 mg das MLSs.

3.2.5. Estudo de difração de raios X de pó das MLSs contendo B-3 e AVO

A B-3 pura, a cera de abelha, cera de carnaúba e as MLSs contendo 30, 50 e 70 % de ativo foram analisadas por difração de raios-X. No caso do estudo com a AVO, apenas foi realizado a análise das MLSs obtidas nas condições otimizadas e comparadas com a AVO pura, cera de carnaúba e MLSs de cera de carnaúba. O equipamento usado nas análises foi um difratômetro de raios X modelo D5005 Bruker-Siemens, equipado com uma fonte selada de cobre ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) na faixa entre os ângulos de incidência 2θ entre 2° e 50° a uma velocidade angular de $0,02^\circ/\text{s}$ operando numa voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA.

3.2.6. Calorimetria exploratória diferencial das MLSs contendo B-3

As MLSs de cera de abelha e cera de carnaúba contendo 30, 50 e 70 de B-3, as ceras de abelha e de carnaúba pura e benzofenona-3 e as MLSs otimizadas de AVO,

cera de carnaúba, mistura física e MLSs de cera de carnaúba foram submetidas a análises por calorimetria exploratória diferencial (DSC) no equipamento DSC-50 (Shimadzu Inc, Kyoto, Japão). 4 mg $\pm$ 0,05 de cada amostra foi pesada e selada em porta-amostra de alumínio. Estas foram submetidas a um aquecimento na razão de 10 °C/min de 25 a 150 °C em atmosfera de nitrogênio a 50 mL/min. Os dados obtidos foram avaliados com o software TA-60 (Shimadzu Inc, Kyoto, Japão).

3.2.7. Microscopia eletrônica de varredura das MLSs contendo avobenzona

As características morfológicas das MLSs contendo benzofenona e avobenzona foram observadas por microscopia electrónica de varredura (MEV) utilizando um microscópio XL30 FEG-SEM (Phillips Co., Eindhoven, Holanda). As amostras foram cobertas com ouro / paládio, sob uma atmosfera de árgônio, utilizando um revestidor por crepitação Bal-Tec SCD 005 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As fotomicrografias foram feitas a uma voltagem de aceleração de 25 kV.

3.2.8. Liberação *in vitro* das MLSs contendo B-3

A dissolução da B-3 e a liberação das MLSs de cera de abelha e cera de carnaúba foram feitas de acordo com Gomaa e colaboradores (2010) com modificações. Foi pesado 5 mg de B-3 e quantidades de massa corrigidas de MLSs para este conteúdo de B-3 em frascos (Erlenmeyer) de 100 mL. Em seguida foi adicionado 50 mL de uma solução de tampão acetato com 40 % de metanol (pH = 5) sob agitação magnética (50 ciclos/min) por 8 horas em um banho de ar termostatizado, TAB/15, (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brazil) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Aliquotas de 1mL foram retiradas a cada 1 hora filtradas e analisadas espectrofotométricamente a 290,5 nm. Os experimentos foram feitos em triplicata. Os dados foram fornecidos em porcentagem de liberação e foram obtidos através de uma curva analítica nas concentrações de 1,5; 3; 6; 9; 12 e 15

µg/mL em tampão acetato com 40 % de metanol, que apresentou coeficiente de correlação (R^2) = 0,9994 e equação da reta ($y=0,0458x + 0,1222$).

3.2.9. Linhagem celular e cultura de células

A linhagem celular L929 de fibroblastos de rato foi adquirido do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SBF), penicilina G (100 U / mL), estreptomicina (100 ug / mL) e anfotericina (25 ug / mL) como um meio de crescimento completo. As células foram incubadas a 37° C numa incubadora umidificada com 5 % de CO₂ e subcultivadas a cada dois dias, substituindo a cultura com novo meio.

3.2.10. Ensaio de captação de vermelho neutro

O ensaio de captação de vermelho neutro foi realizado de acordo com o protocolo experimental descrito por Repetto, Peso Del e Zurita (2008), com modificações. As células L929 foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de $0,5 \times 10^5$ células / poço em 200 µL de meio. Após 24 h, 20 µL de cada diluição de B-3, MLSs de cera de abelha e cera de carnaúba, MLSs de cera de abelha e cera de carnaúba contendo 70 % de B-3 foi adicionado a oito poços e incubadas durante 48 horas. Como controle de solvente foi feito a adição de 20 uL da mesma quantidade de mistura de solvente (DMSO 20 %, 5 % de palmitato de isopropila e 0,5 % de tween 80) utilizado para dissolver as amostras aos poços. O crescimento celular foi quantificado pela capacidade das células viáveis em incorporar e ligar o corante vermelho neutro supravital nos lisossomas. No final da incubação de 48 horas, o meio em cada poço foi substituído por 200 uL de solução de vermelho neutro (50 ug / mL em DMEM sem soro bovino fetal) e a placa foi incubada durante 3 horas a 37 °C. Depois, o meio foi removido e as células foram lavadas com 200 uL de CaCl₂ em solução de

formaldeído (1 % de CaCl_2 em formaldeído a 0,5 %). Após eliminação, cada poço recebeu 200 uL de solução de hidralcoólica 50 % acidificada a 1 % de ácido acético. A placa foi coberta com folha de alumínio e incubadas durante a noite no escuro, e a absorvância foi medida a 540 nm utilizando um leitor de multiplate DTX Detector 880 multimodo (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EUA). A média de oito medições para cada concentração foi determinada ($n = 3$) e as amostras foram quantificadas como a percentagem da absorvância controle do vermelho neutro de acordo com a Equação (3) e expressa em termos de CI_{50} .

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{\text{Act} \times 100}{C^+}$$

Eq. (3)

Onde Act = absorvância das concentrações testadas; C^+ = absorvância do controle positivo.

3.2.11. Estudo de fotoestabilidade das MLSs contendo B-3 por CLAE e em cultura de células

40 mg de B-3 e a massa correspondente de MLSs de cera de abelha e cera de carnaúba contendo 70 % de B-3 foram dispersas em água, adicionadas em uma superfície circular com $9,6 \text{ cm}^2$ de diâmetro e deixadas secarem. Posteriormente, as amostras foram irradiadas em uma caixa de radiação a 5,5 cm da fonte de irradiação constituída por 4 lâmpadas TLK 40W/10R (Philips, Holland, 60 cm). As amostras foram submetidas a três doses de exposição 12, 25 e 35 J/cm^2 . Posteriormente, cada amostra foi avaliada em cultura de células L929 ($n=3$) como descrito no item 3.2.10. A quantificação da B-3 pura e presente nas MLSs foram analisados por CLAE de acordo com o item 2.2.14.

3.2.12. Preparação de formulações tópicas contendo MLSs de benzofenona-3

Quatro formulações foram preparadas usando um agitador mecânico modelo 713 D (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil) a 425 rpm com adição ou não de 4 % de B-3. Para as formulações contendo MLSs a quantidade adicionada de MLSs foram maiores para corrigir a porcentagem de B-3. As MLSs usadas nesse estudo foram preparadas com cera de carnaúba e cera de abelha contendo 70 % de B-3. Os excipientes da formulação foram Hostacerin SAF (4 %), óleo de macadâmia (3 %), propilenoglicol (2 %), phenova (0,5 %) e água (86,5 %). A B-3 foi fundida, juntamente com os excipientes da fase oleosa, enquanto que a água foi adicionada lentamente sob agitação até a formação da emulsão. Para as formulações contendo MLSs foi preparado primeiramente a emulsão em seguida foi adicionado as MLSs sob agitação. Uma formulação contendo apenas os excipientes foi produzida para controle.

3.2.13. Estudo de estabilidade das formulações contendo MLSs de B-3 por comportamento reológico

Amostras das quatro formulações contendo ou não MLSs de B-3 foram armazenados a 40 ° C e 4 ° C em ciclos alternados (cada ciclo correspondeu a dois dias) durante um período de 28 dias. A viscosidade aparente, índice de fluxo e o comportamento reológico das formulações foram determinadas a cada dois ciclos (quatro dias) usando um reômetro cone/prato R/S Plus (Brookfield, Co. Middleboro, MA, EUA) e uma haste CP-25. A taxa de cisalhamento variou de 0 a 500 s⁻¹ (cisalhamento crescente) e 500 a 0 s⁻¹ (cisalhamento decrescente), para um tempo total de 120 s a 25 °C. Os reogramas resultantes foram ajustados à equação de Ostwald, $\tau = k\gamma^n$, onde τ é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de cisalhamento, k é o índice de consistência e n é o índice de fluxo. Quando $n = 1$, o fluxo é considerado newtoniano, ao passo que $n > 1$ é classificado como plástico, e $n < 1$ é pseudoplástico (MARTINS et

al., 2013). O software versão RHEOCALC V 1,01 (Brookfield, Co. Middeboro, MA, EUA) foi utilizado para calcular o índice de fluxo, a tixotropia e valores de viscosidade aparente. A viscosidade aparente foi determinada a 500 s^{-1} . A tixotropia (área de histerese) foi calculada a partir da área sob a curva para os reogramas obtidos para cada formulação. O pH das formulações foi obtido, por uma diluição 1:10 em água destilada, usando um peagâmetro, modelo DM 20 (Digmed, São Paulo, SP, Brasil). O comportamento reológico de cada formulação foi determinado em quadruplicata.

3.2.14. Estudo da permeação/retenção usando pele de orelha de porco

Para realizar este estudo, foi usado pele a partir da superfície externa de orelhas de porco. Estas orelhas foram obtidas após 2 horas do abate dos animais (Olhos D'Água Indústria e Comércio de Carnes Ltda, Ipuã, SP, Brasil). A membrana de pele total foi cuidadosamente removida a partir da cartilagem subjacente usando um bisturi. Além disso, os tecidos subcutâneos foram removidos e a pele foi armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período máximo de 30 dias antes da utilização. Uma célula de difusão de Franz com uma área de difusão de $1,77\text{ cm}^2$ foi utilizada para realizar o estudo, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador em que a formulação foi aplicada, e a derme voltado para o compartimento receptor. A câmara receptora continha 150 mM de tampão fosfato (pH 7,2) em monolaurato de polioxietileno sorbitano (Tween 80[®], 0,5 %, v / v), e o líquido foi continuamente agitada e mantida a uma temperatura constante ($37 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

As formulações contendo ou não MLSs de B-3 foram aplicadas com o auxílio de uma seringa (350 mg de cada) na superfície do estrato córneo (Figura 7). Doze horas após a aplicação das formulações, elas foram removidas. Para separar o estrato córneo da epiderme e da derme restante, as secções de pele foram sujeitas ao *tape stripping* usando 15 pedaços de fita adesiva. A epiderme e a derme restantes foram cortadas em

pequenos pedaços, deixadas em banho de ultrassom durante 30 minutos com cinco mililitros de metanol. Em seguida foram agitadas em vortex durante 2 minutos e centrifugadas por 30 minutos a 1157 G. O sobrenadante foi depois transferido para um balão volumétrico. Cinco mililitros de metanol foram adicionados ao precipitado residual, e o procedimento de extração foi repetido. O sobrenadante da segunda extração foi adicionado à amostra anterior no frasco volumétrico, e estas amostras foram secas e diluídas em um mililitro de metanol. A mistura resultante foi filtrada através de uma membrana de 0,45 μm (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), e o teor de B-3 foi analisada por CLAE (Figura 7). A solução receptora de cada experimento foi recolhida após 12 horas e liofilizadas, extraídas com metanol, filtradas com filtros 0,45 μm (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) e analisadas por CLAE.

Figura 7. Esquema representativo do ensaio de permeação/retenção usando célula de Franz.

3.2.15. Condições cromatográficas

Para a determinação da quantidade de B-3 nas MLSs e em pele de porco, de AVO nas MLSs e rutina nas NLSs utilizou-se um cromatógrafo líquido modelo LC-

10AT (Shimadzu, Inc, Kyoto, Japão) acoplado á detector UV/VIS, modelo SPD-10A, integrador, modelo C-R6A, injetor Rheodyne e coluna C18 Shim-pack, CLC- ODS (280 mm×4.6 mm, 5 µm). A fase móvel constituiu-se de ácido acético 0,5 %, metanol e água (85:15), na vazão de 1 mL/min. O volume injetado foi de 20 µL e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 305 nm. Os resultados obtidos para a B-3 foram calculados usando uma curva analítica nas concentrações de 2,5; 5; 10; 15 e 20 µg/mL apresentando uma equação da reta ($y = 0,0416x + 0,0294$) e coeficiente de correlação ($R^2 = 0,996$). Para os resultados das MLSs contendo AVO a curva analítica foi feita nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL com uma equação da reta ($y = 14124x - 26846$) e coeficiente de correlação ($R^2 = 0,997$). Os resultados obtidos para a rotina foram calculados usando uma curva analítica nas concentrações de 1; 5; 10; 15, 20 e 25 µg/mL apresentando uma equação da reta ($y = 8487x - 3095$) e coeficiente de correlação ($R^2 = 0,999$). A metodologia analítica utilizada para a quantificação dos ativos foi validada nos parâmetros analíticos de linearidade, precisão, exatidão (BRASIL, 2003).

3.2.16. Estudo de fotoproteção das formulações contendo MLSs de B-3 e AVO

O estudo de fotoproteção das formulações contendo MLSs de B-3 e AVO foi realizado usando o ensaio de captação de vermelho neutro como descrito no item 3.2.10. As células L929 foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 8×10^5 células / poço em 2 mL de meio. Após 24 horas cada formulação foi aplicada numa concentração de 2 mg/cm² numa placa de quartzo exatamente acima de cada poço contendo as células semeadas. Essa placa contendo as formulações foi colocada em cima da placa de seis poços de acordo com a Figura 8. Em seguida foi exposta a fonte de radiação ultravioleta UVA ou UVB. Para a radiação UVA foi usado 4 lâmpadas TLK 40W/10R (Medical-Holland, Amsterdam, Holanda) e para UVB 4 lâmpadas TL/12RS

40 W (Medical-Holland, Amsterdam, Holanda), a uma distância de 20 cm. A dose de radiação UVA foi 50 J/cm^2 , e a dose de UVB foi 400 mJ/cm^2 medida por um radiômetro IL 1700 (Newburyport, MA, EUA), equipado com UV detector. Antes da placa ser exposta a radiação UV o meio de cada poço foi substituído com 1 mL de tampão Hanks. Após o período de radiação o meio dos poços foi novamente substituído por DMEM sem soro bovino fetal e a placa foi incubada por um período de 48 horas. A viabilidade celular foi quantificada pela capacidade das células viáveis em incorporar e ligar o corante vermelho neutro supravital nos lisossomas. No final da incubação de 48 horas, o meio em cada poço foi substituído por 1 mL de solução de vermelho neutro (50 ug/mL em DMEM sem soro bovino fetal) e a placa foi incubada durante 3 horas a 37°C . Depois, o meio foi removido e as células foram lavadas com 1mL de CaCl_2 em solução de formaldeído (1 % de CaCl_2 em formaldeído a 0,5 %). Após eliminação, cada poço recebeu 1 mL de solução hidralcóica 50 % acidificada a 1 % de ácido acético. A placa foi coberta com folha de alumínio e incubada durante a noite no escuro, e a absorvância foi medida a 540 nm utilizando um leitor de multiplate DTX Detector 880 multimodo (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EUA). Os experimentos foram feitos em sextuplicata para cada formulação com três repetições experimentais ($n = 3$) e as amostras foram quantificadas como a percentagem da absorbância controle do vermelho neutro de acordo com a Equação (3) e expressa em termos de CI_{50} .

Figura 8. Esquema representativo do ensaio de fotoproteção das formulações contendo MLSs de B-3 e AVO ou não. Onde (A) representa a aplicação das formulações na placa de quartzo. (B) A placa de quartzo é colocada sobre a placa de 6 poços contendo os fibroblastos semeados sendo posteriormente irradiada com UVA ou UVB. Depois de 48 horas a viabilidade celular foi determinada em cada poço.

3.2.17. Planejamento experimental para produção das MLSs contendo avobenzona por *spray congealing*

Os experimentos foram realizados seguindo um planejamento composto central, PCC, com três fatores, o qual se caracteriza por ser constituído por uma parte fatorial (ou cúbica), uma parte axial e o ponto central, onde são feitas as réplicas experimentais (Figura 9) (JOHN, 1971).

As variáveis dependentes escolhidas foram tamanho médio de partícula, o qual deveria apresentar valores entre 10-50 μm de diâmetro, eficiência de encapsulação, que deveria ser a maior possível (100 %) e polidispersividade, a qual deveria ser a menor possível. Os fatores escolhidos foram: vazão do ar de resfriamento (VAR), vazão de alimentação da dispersão (VAD) e conteúdo de filtro solar ($\text{AVO}_{\text{cont.}}$). Esses fatores

mostraram influências nessas respostas através de estudos preliminares. A Tabela 2 mostra a matriz do PCC com variáveis codificadas e não codificadas, onde X_1 corresponde a $AVO_{cont.}$, X_2 a VAR e X_3 a VAD.

Figura 9. Representação esquemática do cubo multidimensional com os pontos do planejamento composto central, onde $\alpha = 1,68$.

As variáveis estudadas foram decodificadas para a análise de superfície de resposta. A decodificação foi obtida pela Equação (4).

$$\text{Variável codificada} = \left(\frac{\text{nível não codificado} - 0,5 \times (\text{nível alto} + \text{nível baixo})}{0,5 \times (\text{nível alto} - \text{nível baixo})} \right)$$

Eq. (4)

Os dados fornecidos pela Equação 4 foram ajustados à equação polinomial quadrática de uma superfície de resposta conforme a Equação (5).

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_4X_1X_2 + A_5X_1X_3 + A_6X_2X_3 + A_7X_1^2 + A_8X_2^2 + A_9X_3^2$$

Eq. (5)

Onde: Y = variável dependente; X_1 = conteúdo de AVO ($AVO_{cont.}$); X_2 = vazão do ar de resfriamento (VAR); X_3 = vazão de alimentação da dispersão (VAD). Os termos X_1X_2 e X_i^2 ($i = 1, 2$ ou 3) representam a interação e os termos quadráticos, respectivamente. A_0 é a interseção; A_1 a A_9 = são os coeficientes regressão obtidos em relação aos valores de Y .

Os demais parâmetros foram monitorados ou mantidos fixos e são apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Planejamento composto central com fatores estudados para produção de MLS contendo avobenzona.

Exp.	$X_1=AVO_{cont.}$ (%)	$X_2=VAR$ (m ³ /min)	$X_3=VAD$ (mL/min)
1	-1 (30)	-1 (1,5)	-1 (3)
2	1 (70)	-1 (1,5)	-1 (3)
3	-1 (30)	1 (2,5)	-1 (3)
4	1 (70)	1 (2,5)	-1 (3)
5	-1 (30)	-1 (1,5)	1 (6)
6	1 (70)	-1 (1,5)	1 (6)
7	-1 (30)	1 (2,5)	1 (6)
8	1 (70)	1 (2,5)	1 (6)
9	$-\alpha$ (16,36)	0 (2)	0 (4,5)
10	α (83,64)	0 (2)	0 (4,5)
11	0 (50)	$-\alpha$ (1,16)	0 (4,5)
12	0 (50)	α (2,84)	0 (4,5)
13	0 (50)	0 (2)	$-\alpha$ (1,98)
14	0 (50)	0 (2)	α (7,02)
15	0 (50)	0 (2)	0 (4,5)
16	0 (50)	0 (2)	0 (4,5)
17	0 (50)	0 (2)	0 (4,5)

*onde: $AVO_{cont.}$:concentração de avobenzona; VAR: vazão de ar de resfriamento; VAD:

vazão de alimentação da dispersão.

Tabela 3. Valores fixados para obtenção das MLSs contendo AVO por *spray congealing*.

Parâmetros	Valores fixos
Pressão do ar de atomização	6 bar
Vazão do ar de atomização	40 L/min
Temperatura da fita aquecedora	110 °C
Temperatura do banho de óleo vegetal	150 °C
Temperatura da dispersão	95 °C
Temperatura do ar de saída*	30 °C

*Nota: este parâmetro foi apenas monitorado.

3.2.18. Otimização da obtenção das MLSs contendo avobenzona

Os níveis de parâmetros ótimos para a obtenção de MLSs, ideais para uso em formulações tópicas, foram determinados usando o método da desejabilidade (D) de acordo com a Equação (6).

$$D = (d_1^{r_1} \times d_2^{r_2} \times \dots d_n^{r_n}) \sum_i^1 r$$

Eq. (6)

Onde $d_1, d_2, \dots, d_n$ são as respostas ($d_i = 0$, menos desejável, e $d_i = 1$, mais desejável), n é o número total de respostas na medida e r_i é a importância relativa de cada resposta (AMIRI-RIGI, et al., 2012; NATH & CHATTOPADHYAY, 2007). As variáveis independentes foram mantidas dentro dos valores obtidos e as respostas foram maximizadas ou minimizadas. As D s do processo foram desenvolvidas para os seguintes critérios: máximo EE e mínimo D_{50} e $SPAN$. As condições otimizadas foram determinados utilizando o módulo *Response optimizer* do *software* Minitab 15 (Minitab Inc., State College, PA).

3.2.19. Estudos de fotodegradação das MLSs contendo AVO em formulação tópica

Experimentos de fotólise foram realizados em formulações do tipo gel-creme contendo AVO não microparticuladas (3 % m/m) e MLSs otimizadas (MLS_{OT}) contendo AVO. Em adição, foram preparadas formulações contendo 0,5; 0,75 e 1 % de

rutina em associação ou não com MLS_{OT} . Os excipientes utilizados para a preparação da formulação do tipo gel-creme foram: hostacerin SAF (7,5 %), esqualeno (1,5 %), propilenoglicol (5 %), nipaguard (0,05 %) e água destilada (qsp). O gel-creme foi preparado pela adição dos componentes em água e homogeneizado, com o auxílio de um bastão de vidro, por 15 minutos. Após a incorporação das amostras no gel-creme cada formulação foi pesada de acordo com a relação de 2 mg/cm^2 e dispersa em água destilada. Em seguida, cada amostra foi adicionada em uma superfície circular com $9,6 \text{ cm}^2$ de diâmetro e deixada para secar. Posteriormente, as amostras foram irradiadas em uma caixa de radiação a 5,5 cm da fonte de irradiação UVA constituída por 4 lâmpadas TLK 40W/10R (Philips, Holland, 60 cm). A dose de exposição foi de 50 J/cm^2 . Amostras controles de cada formulação foram submetidas às mesmas condições, entretanto, foram deixadas na ausência de luz durante os testes de fotodegradação. Após a exposição à radiação UVA o teor de AVO foi determinado por CLAE. Os resultados de fotodegradação de cada amostra são representados pela relação do teor de AVO controle (sem exposição à radiação UVA) pelo teor de AVO das amostras irradiadas. Os resultados correspondem à média de três experimentos para cada amostra.

3.2.20. Preparação das NLSs contendo rutina pela técnica da microemulsão

As NLSs contendo rutina foram preparadas utilizando o método da microemulsão proposto por Ugazio e colaboradores (2002) com modificações. Para cada experimento foi preparado dois gramas de NLSs dispersos em 40 mL de água. Os componentes utilizados no preparo das NLS foram cera de abelha e cera de carnaúba (80 %:20 %) como fase lipídica, proporção uma em relação a outra, lecitina de ovo e polissorbato 80 como emulsificantes, ácido oléico como agente promotor de absorção, água como fase aquosa e rutina como ativo. A proporção de material a ser utilizado em cada experimento foi feito através do cálculo do equilíbrio hidrófilo:lipófilo e a

quantidade de ativo foi escolhida de acordo com o planejamento experimental apresentado no item 3.2.21. Por exemplo, para preparar NLSs contendo 22 % de rutina foi pesado 0,578 gramas de cera de abelha, 0,144 gramas de cera de carnaúba, 0,224 gramas de lecitina de ovo, 0,175 gramas de polisorbato 80, 0,038 gramas de ácido oléico, 0,4 gramas de água e 0,44 gramas de rutina. Primeiramente, a cera de abelha e cera de carnaúba foram fundidas juntamente com a lecitina de ovo por volta de 100 °C. Após a total fusão a fase lipídica foi homogeneizada com a fase aquosa contendo água e polissorbato 80 previamente preparados. Após a formação da emulsão a rutina foi adicionada aos poucos sob agitação magnética. Em seguida a emulsão foi transferida para 40 mL de água a 0 °C sob agitação usando um dispersor T 18 digital Ultra-Turrax® (IKA, Wilmington, EUA) a 20000 rpm por 10 minutos. Após esse processo ser concluído a dispersão foi submetida a uma homogeneização usando um homogeneizador de alta pressão Emulsiflex-C3 (Avestin, Ottawa, Canadá) de acordo com as condições descritas no item 3.2.21.

3.2.21. Planejamento experimental para produção das NLSs contendo rutina usando homogeneizador de alta pressão

Os experimentos usando o homogeneizador de alta pressão (HAP) foram realizados seguindo um PCC, previamente apresentado no item 3.2.17 (Figura 9). As variáveis dependentes escolhidas foram D_{50} que representa o diâmetro médio da NLSs, índice de polidispersividade (IPD), eficácia de encapsulação (EE), conteúdo de ativo (CA), ativo recuperado (AR) e potencial zeta (PZ). Os fatores escolhidos foram: conteúdo de rutina ($Rut_{cont.}$), tempo de homogeneização (T) e pressão de homogeneização (P). Esses fatores mostraram influências nessas respostas através de estudos preliminares. A Tabela 4 mostra a matriz do PCC com variáveis codificadas e não codificadas, onde X_1 corresponde a $Rut_{cont.}$, X_2 a T e X_3 a P.

Tabela 4. Planejamento composto central com fatores estudados.

Exp	Fatores		
	X ₁ (%)	X ₂ (min)	X ₃ (bar)
1	-1 (10)	-1 (10)	-1 (300)
2	1 (20)	-1 (10)	-1 (300)
3	-1 (10)	1 (20)	-1 (300)
4	1 (20)	1 (20)	-1 (300)
5	-1 (10)	-1 (10)	1 (700)
6	1 (20)	-1 (10)	1 (700)
7	-1 (10)	1 (20)	1 (700)
8	1 (20)	1 (20)	1 (700)
9	-1,68 (6,59)	0 (15)	0 (500)
10	1,68 (23,41)	0 (15)	0 (500)
11	0 (15)	-1,68 (6,59)	0 (500)
12	0 (15)	1,68 (23,41)	0 (500)
13	0 (15)	0 (15)	-1,68 (163,5)
14	0 (15)	0 (15)	1,68 (836,4)
15	0 (15)	0 (15)	0 (500)
16	0 (15)	0 (15)	0 (500)
17	0 (15)	0 (15)	0 (500)
18	0 (15)	0 (15)	0 (500)
19	0 (15)	0 (15)	0 (500)

3.2.22. Determinação do tamanho médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das NLSs

O D₅₀, IPD e PZ de cada experimento foram determinados por difração a laser usando Zetasizer Nano Series modelo Nano ZS90 (Malvern). Cada amostra foi diluída

em água (1:10) e mantida sob agitação até sua análise. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

3.2.23. Determinação da eficiência de encapsulação, conteúdo ativo e porcentagem de ativo recuperada das NLSs

Para determinar a quantidade de rutina nas NLSs, 1 mL de cada dispersão contendo NLSs obtida no planejamento fatorial foram submetidos a ultrafiltração 2 Vivaspín® (Sartorius, EUA) durante 40 minutos a 4000 g a 25° C usando uma centrífuga. Filtrado contendo o fármaco livre foi retirado para análise por CLAE como descrito no item 3.2.14. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Quantidade total de rutina presente nas NLSs foi determinada pela ruptura dos lipídios com metanol seguido de sonicação por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram filtradas em filtros de 0,45 µm e quantificadas por CLAE. A eficácia de encapsulação (EE), o conteúdo de ativo (CA), e ativo recuperado (AR) foram determinadas usando as seguintes equações:

$$EE (\% m/m) = \frac{\text{Quantidade de rutina nanoencapsulada na dispersão} - \text{quantidade de rutina livre}}{\text{Quantidade de rutina nanoencapsulada na dispersão}} \times 100$$

Eq. (7)

$$CA (\%) = \frac{\text{Quantidade de rutina nanoencapsulada na dispersão} - \text{quantidade de rutina livre}}{\text{massa do lipídio}} \times 100$$

Eq. (8)

$$AR (\%) = \frac{\text{Quantidade de rutina nanoencapsulada na dispersão}}{\text{quantidade de ativo adicionada}} \times 100$$

Eq. (9)

3.2.24. Otimização da obtenção das NLSs contendo rutina

Os níveis de parâmetros ótimos para a obtenção de NLSs foram determinados usando o método da desejabilidade (*D*) de acordo com o item 3.2.18.

As variáveis independentes foram mantidas dentro dos valores obtidos e as respostas foram maximizadas ou minimizadas. As *Ds* do processo foram desenvolvidas para os seguintes critérios: máximo EE, e mínimo *D*₅₀ e IPD. As condições otimizadas foram determinados utilizando o módulo *Response optimizer* do *software* Minitab 15 (Minitab Inc., State College, PA).

3.2.25. Estudo de citotoxicidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina

O ensaio de citotoxicidade das NLSs contendo rutina, obtidas nas condições otimizadas, foi realizado usando ensaio de captação de vermelho neutro de acordo com o item 3.2.10. As células L929 de fibroblastos de ratos foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de $0,5 \times 10^5$ células / poço em 200 µL de meio. Após 24 h, 20 µL de cada diluição de NLSs contendo rutina e NLSs sem rutina foi adicionado a oito poços e incubados durante 24 horas. O crescimento celular foi quantificado pela capacidade das células viáveis em incorporar e ligar o corante vermelho neutro supravital nos lisossomas. No final da incubação de 48 horas, o meio em cada poço foi substituído por 200 uL de solução de vermelho neutro (50 ug / mL em DMEM sem soro bovino fetal) e a placa foi incubada durante 3 horas a 37 °C. Depois, o meio foi removido e as células foram lavadas com 200 uL de CaCl₂ em solução de formaldeído (1% de CaCl₂ em formaldeído a 0,5 %). Após eliminação, cada poço recebeu 200 uL de solução hidralcoólica 50 % acidificada a 1% de ácido acético. A placa foi coberta com folha de alumínio e incubadas durante a noite no escuro, e a absorvância foi medida a 540 nm utilizando um leitor de multiplate DTX Detector 880 multimodo (Beckman

Coulter, Inc., Fullerton, CA, EUA). A média de oito medições para cada concentração foi determinada ($n = 3$) e as amostras foram quantificadas como a percentagem da absorvância controle do vermelho neutro de acordo com a Equação (3) e expressa em termos de CI_{50} .

3.2.26. Avaliação da atividade fotoprotetora das NLSs contendo rutina utilizando o ensaio de captação do vermelho neutro por exposição à UV

A atividade fotoprotetora das NLSs contendo rutina foi avaliado por um tratamento com concentrações subtóxicas de NLSs contendo rutina e rutina por 4 e 24 horas, frente aos fibroblastos expostos a uma dose de radiação UVA e UVB capaz de reduzir a viabilidade celular em torno de 50 %. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços em que as células foram semeadas conforme o item 3.2.10. Após 24 horas, as células foram lavadas e tiveram o meio trocado por 100 μ L do meio DMEM sem vermelho de fenol, adicionando-se às placas diferentes concentrações de rutina e das NLSs contendo rutina. Uma hora após o tratamento, as células foram irradiadas e três horas após a irradiação, metade dos poços da placa receberam 200 μ L do meio DMEM incompleto (4 poços) enquanto que a outra metade foi novamente tratada com a rutina ou NLSs contendo rutina em 200 μ L de meio DMEM incompleto. As placas foram reincubadas a 37 °C com 5 % CO_2 e após 24 horas o ensaio de captação do vermelho neutro foi realizado conforme o item 3.2.10.

3.2.27. Preparação de formulações tópicas contendo MLSs de B-3 e AVO, octocrileno e NLSs de rutina

Nove formulações foram preparadas nas mesmas condições apresentadas no item 3.2.12. Os princípios ativos das formulações foram filtro solar OCT livre. B-3 e AVO microencapsuladas ou não e quando microencapsulados foram usados as MLSs de cera de carnaúba com 70 % de B-3 e MLSs de cera de carnaúba contendo 60,5 % de

AVO e rutina nanoencapsulada ou não. As NLSs usadas continham 23,41 % de rutina. Os excipientes das formulações foram os mesmos usados no item 3.2.12. Para o preparo das formulações controles, ou seja, sem a adição de MLSs ou NLSs a B-3, AVO e OCT foram fundidos, juntamente com os excipientes da fase oleosa. A rutina foi solubilizada no propilenoglicol e adicionada posteriormente na fase aquosa. Em seguida a fase aquosa (contendo propilenoglicol e rutina) foi adicionada lentamente sob agitação até a formação da emulsão sob a fase oleosa. Para as formulações contendo MLSs foi primeiramente preparado a emulsão e em seguida adicionado as MLSs sob agitação. Para as formulações contendo NLSs, os excipientes que constituem a formulação foram adicionados a dispersão aquosa constituída de NLSs de rutina sob agitação, após a formação da base as MLSs foram adicionadas aos poucos sob agitação. Uma formulação contendo apenas os excipientes foi produzida para usar também como controle. A Tabela 5 mostra a porcentagem e os constituintes de cada formulação.

Tabela 5. Formulações contendo MLSs e NLSs composição e porcentagem.

compostos	Formulações								
	FFR	FF_MR_N	FF	FF_M	FF_{BA}	FF_{MBA}	FR	FR_N	FP
benzofenona-3	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %	-	-	- %
avobenzona	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %	-	-	- %
octocrileno	6 %	6 %	6 %	6 %	-	-	-	-	- %
rutina	1 %	1 %	-	-	-	-	1 %	1 %	- %
Hostacerin SAF	4 %	4 %	4 %	4 %	4 %	4 %	4 %	4 %	4 %
óleo de macadâmia	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %	3 %
propilenoglicol	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %
phenova	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %
água	77,5 %	77,5 %	78,5 %	78,5 %	84,5 %	84,5 %	89,5 %	89,5 %	90,5 %

*onde: FFR - formulação contendo B-3, AVO, OCT e rutina livres; FF_MR_N - formulação contendo MLSs de B-3 e AVO, OCT livre e NLSs de rutina; FF - formulação contendo B-3, AVO, OCT livres; FF_M - formulação contendo MLSs de B-3 e AVO, OCT livre; FF_{BA} - formulação contendo B-3 e AVO livres; FF_{MBA} - formulação contendo MLSs de B-3 e AVO; FR – formulação contendo rutina livre; FR_N - formulação contendo apenas NLSs de rutina; FP – formulação placebo livre de ativos.

3.2.28. Preparação da pele humana

Todos os procedimentos envolvendo pacientes foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da *Canadian Health care Association* e seguem as instruções protocolares da Declaração de Helsinki.

Biópsias de pele humana provenientes de cirurgias plásticas da região abdominal de indivíduos caucasianos com faixa etária entre 35 e 60 anos foram usadas. As amostras foram lavadas com tampão PBS contendo 100 UI/mL de penicilina G, e seu tecido hipodérmico foi removido com auxílio de um bisturi e uma tesoura cirúrgica. Em seguida a pele foi seccionada numa área de 1,5 cm² e colocadas em suportes ar/líquido dentro de placas de 6 poços contendo meio DMEM-Ham's F12 suplementado com 5 % de SBF, 100 UI/mL de penicilina G e 25 µg/mL de gentamicina, 10 ng/ml de fator de crescimento epidermal, 5 µg/ml de insulina bovina, 5 µg/ml de transferrina humana, 2 x 10⁻⁹ de triiodo-L-thyronina, 10⁻¹⁰ de toxina colérica (SIMON et al., 2012). As biópsias foram deixadas por 24 horas antes de serem usadas nos ensaios de irradiação e incubadas a 37 °C com 5 % CO₂.

3.2.29. Preparação da pele reconstruída *in vitro*

Os tipos celulares necessários para a preparação do modelo de pele reconstruída foram isolados do mesmo paciente, sendo as células: fibroblastos e queratinócitos obtidas a partir de biópsias de pele humana.

Os fibroblastos foram cultivados em meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10 % de SBF, 100 UI/mL de penicilina G e 25 µg/mL de gentamicina, enquanto que os queratinócitos foram cultivados em meio DMEM-Ham's F12 suplementado com 5 % de SFB, 100 UI/mL de penicilina G e 25 µg/mL de gentamicina, 10 ng/ml de fator de crescimento epidermal, 5 µg/ml de insulina bovina,

5 µg/ml de transferrina humana, 2×10^{-9} de triiodo-L-thyronina, 10^{-10} de toxina colérica e 0.4 µg/ml de hidrocortisona (SIMON et al., 2012).

A preparação da pele reconstruída *in vitro* foi realizada de acordo com Simon e colaboradores (2012). Os fibroblastos foram semeados em placas de 12 poços contendo um dispositivo de ancoragem numa densidade de 56000 células/poço e deixados crescer na presença de 50 µg/mL de ácido ascorbico. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Após aproximadamente 35 dias, essas células formaram camadas espessas de fibroblastos. Duas camadas, provenientes de poços diferentes, foram superpostas e deixadas aderir por mais 7 dias em placa de 12 poços. Após esse período de cultivo os fibroblastos geraram um tecido espesso composto de células e de matriz, similar a derme humana *in vivo*. Então os queratinócitos previamente cultivados foram semeados (500000 células/poço) sobre os fibroblastos e o meio foi substituído para de cultivo de queratinócitos. O meio foi trocado a cada 48 horas. Após uma semana, o tecido foi elevado formando uma interface líquido-ar em placas de 6 poços. A interface ar/líquido induz a diferenciação dos queratinócitos na presença do meio de cultura sem o fator de crescimento epidermal. A Figura 10 mostra o esquema de cultivo da pele reconstruída similar à pele humana.

Figura 10. Esquema representativo da preparação da pele humana reconstruída *in vitro*. Adaptado de Bernerd & Asselineau (2008).

3.2.30. Estudo de fotoquimioprevenção das formulações contendo sistemas micro e nanoencapsulados em pele humana e pele reconstruída *in vitro* contra a radiação UVB

Após 24 horas as secções de pele humana, previamente mantidas em incubação, foram submetidas à administração das formulações apresentadas no item 3.2.27 (Tabela 5) numa concentração de 2 mg/cm^2 sobre o estrato corneo com o auxílio de uma pequena espátula. Após 15 minutos, as secções contendo as formulações foram expostas a fonte de radiação UVB constituída de cinco lâmpadas RPR 3000 (Southern New England Ultraviolet Co, CT). A dose de radiação foi de 500 mJ/cm^2 medida por um radiómetro IL 1700 (Newburyport, MA, EUA), equipado com UV detector. Antes de

cada amostra ser exposta a radiação UVB o meio de cada poço foi substituído por 5 mL de tampão PBS. Após o período de radiação as formulações foram removidas com auxílio de uma haste flexível embebidas com tampão PBS. O meio dos poços foi novamente substituído por DMEM-Ham's F12 e as amostras foram incubadas por um período de 24 horas. Amostras não irradiadas e irradiadas sem formulação foram preparadas com o intuito de serem usadas como controle não irradiado e controle irradiado, respectivamente. Amostras não irradiadas contendo formulações foram preparadas e mantidas por duas horas. Após esse período as formulações foram removidas e as amostras incubadas por um período de 24 horas para comparação de resultados com as amostras irradiadas. Os experimentos foram feitos em triplicata para cada tipo de formulação avaliada e foram repetidos duas vezes ($n = 2$).

Para a administração das formulações nas amostras de pele reconstruída, primeiramente cada folheto foi lavado com tampão PBS e cada formulação foi espalhada com auxílio de uma pequena espátula sob o estrato córneo das amostras de pele reconstruída, o mesmo procedimento usado para a irradiação da pele humana *in vitro* foi utilizado nos estudos de pele reconstruída apenas diferindo nas formulações testadas. Nos estudos de pele reconstruída apenas as formulações FFR, FF_MR_N, FR, FR_N e FP foram avaliadas.

3.2.31. Preparação das amostras para avaliação de ensaios imunohistoquímicos

As amostras de pele humana e pele reconstruída irradiadas ou não foram retiradas do meio de cultura e cortadas em pequenas secções. Em seguida foram embebidas no composto O.C.T *Tissue Tek* (VWR, Val de Fontenay, França) composto de glicóis e resinas hidrosolúveis e mantidas a - 80 °C para análises. Usando um criostato, as amostras de tecido congelado foram cortadas em secções de 5µm, fixadas

em lâminas e mantidas em refrigeração a – 20 °C para os ensaios histológicos e de imunohistoquímica.

3.2.32. Determinação de células apoptóticas

As células apoptóticas (*sunburn cells*) e a morfologia da pele humana e pele reconstruída foram determinadas por ensaios de coloração de hematoxilina/eosina. Primeiramente, as lâminas contendo as secções de pele foram fixadas com tolueno e coradas com posterior aplicação de hematoxilina e eosina. As *sunburns cells* e a morfologia das amostras foram observadas por microscopia de luz usando o módulo *automeasure* da *Zeiss Axiovision imaging system* (Cambridge, Inglaterra). A contagem do número de células apoptóticas foi determinado em 6 campos diferentes da epiderme de cada secção estudada.

3.2.33. Determinação e quantificação da caspase-3 e CPDs

Para os ensaios de determinação de caspase-3 as lâminas contendo as secções de pele normal humana e pele reconstruída foram primeiramente fixadas com 4 % de paraformaldeído por 20 minutos a temperatura ambiente e lavadas por 30 minutos em tampão PBS. Em seguida as lâminas foram permeabilizadas por dois minutos em uma solução de Triton X-100 e citrato de sódio a 0,1 % a frio com posterior lavagem com tampão PBS. Em seguida, as amostras de pele foram incubadas com o anticorpo policlonal de cabra anticaspase-3 por 1 hora na concentração de 0,5 µg/mL. As amostras foram lavadas novamente com tampão PBS e incubadas por 45 minutos com anticorpo conjugado de coelho anti-cabra, Alexa flúor 488 (1:600), e DAPI (0,5 µg/mL). O DAPI foi usado para contrastar os núcleos de DNA. Em seguida, as amostras foram incubadas com o corante *Evans blue* por 30 minutos e lavadas novamente com tampão PBS.

Para os ensaios de determinação de dímeros de ciclobutanodipirimidina (CPDs) as lâminas contendo as secções de pele humana e pele reconstruída foram

primeiramente fixadas com acetona:metanol (1:1) por 30 minutos a 4 °C e lavadas por 30 minutos em tampão PBS. Em seguida, as lâminas foram permeabilizadas por dois minutos em solução de Triton X-100 a 0,3 % a frio com posterior lavagem com tampão PBS. Posteriormente, as amostras foram tratadas com 100 µg/mL de RNase A e 10 µg/mL de proteinase K por 20 e 10 minutos, respectivamente. O DNA foi desnaturado usando uma solução alcalina de NaOH (0,07 % em álcool a 70 %) e as lâminas foram novamente lavadas com tampão PBS. Após esse tratamento, as amostras foram incubadas por 16 horas com anticorpo monoclonal anti-CPD a 4 °C diluído (1:10000) (CosmoBio) lavadas em PBS e incubadas por uma hora com anticorpo conjugado de coelho anti-camundongo, Alexa 594 (1:1200) a 37 °C e DAPI (0,5 µg/mL).

Os sinais de fluorescência da caspase-3 (Alexa 488), CPDs (Alexa 594) e DNA (DAPI) foram quantificados usando o módulo *automeasure* da *Zeiss Axiovision imaging system* (Cambridge, Inglaterra). Através dos sinais de fluorescência o número de núcleos de DNA caspase-3 e CPDs foram determinados. Desta maneira, pode-se calcular a razão entre o número total de núcleos de DNA e os sinais de caspase-3 ou CPDs em cada campo de secção analisada. Os dados foram expressos em percentagem. A percentagem de caspase-3 e CPDs foi determinado em 6 campos diferentes da epiderme de cada secção estudada.

3.2.34. Avaliação da fotoquimioprevenção das formulações contendo sistemas micro e nanoencapsulados em pele humana

Para avaliar a fotoquimioprevenção das formulações testadas secções de pele humana foram cultivadas de acordo com o item 3.2.28. As formulações avaliadas foram FFR, FF_MR_N, FR, FR_N e FP, sendo administradas de acordo com o item 3.2.30. Após serem submetidas à radiação UVB as amostras foram incubadas a 37 °C e deixadas em contato com as formulações por um período de 4 horas. Em seguida, as formulações

foram removidas, e as amostras de pele foram lavadas com tampão PBS e estocadas a – 80 °C para análise. Essas amostras de pele foram submetidas a um processo de cominuição por moagem criogênica usando um CryoMill® (Verder Scientific Inc, USA) até uma total pulverização. Em seguida, as amostras foram dispersas em tampão TNG-Triton 0,1 % na proporção 1:1 e estocadas a – 80 °C para análise. Essas amostras foram usadas na determinação de peroxidação lipídica e metaloproteínases totais.

3.2.35. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica em pele humana

Em meio de reação contendo KCl (130 mM) e Tris-HCL (10 mM), pH 7,4 foram adicionados 10 µL de citrato de sódio (200 mM), 10 µL de amostra teste e 10 µL de sulfato ferroso amoniacal (50 µM), seguida de incubação a 37 °C por 30 minutos (RODRIGUES et al., 2002). Para determinação do MDA formado, 1 mL de ácido tiobarbitúrico (1 %) (TBA) preparado em NaOH (50 mM), 0,1 mL NaOH (10 M) e 0,5 mL de H₃PO₄ (20 %) foram adicionados, seguido por incubação por 20 minutos a 85 °C (OHKAWA et al., 1979). O complexo MDA-TBA foi extraído com n-butanol, centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos e a absorbância determinada por espectrofotometria de fluorescência (λ de excitação de 515 nm e λ de emissão de 550 nm). Foram feitos concomitantemente o branco (ausência de amostra e ausência de ferro), controle positivo (ausência de amostra), e controle negativo (ausência de ferro).

Para o tratamento dos dados foi feita uma curva de calibração com o tetraetoxipropano, que quantitativamente libera o aduto malondialdeído-ácido tiobarbitúrico nas condições do experimento, sendo os valores expressos em equivalentes de MDA e normalizados para a quantidade de proteínas presente no sobrenadante, quantificada pelo *kit* de micro BCA de acordo com o protocolo do fabricante. Esse *kit* se baseia na capacidade do ácido bicinonínico em formar um

complexo roxo com o Cu^{+1} , que é formado após a redução do Cu^{+2} por proteínas em meio alcalino. Cada determinação foi realizada em quadruplicata com duas repetições do experimento ($n = 2$).

3.2.36. Avaliação da metaloproteinases totais em pele humana

A atividade das MMPs totais foi determinado usando alíquotas da dispersão de pele obtidas no item 3.2.34 e determinada através do *kit* de ensaio *SensoLyte*[®] 520 *Generic MMP Assay Kit-Fluorimetric* de acordo com o fabricante. Este *kit* pode detectar simultaneamente a atividade das MMP-1, 2, 7, 8, 9, 12, 13 e 14. Os resultados refletem a atividade global das MMPs e seu equilíbrio com os inibidores de metaloproteinases. Este *kit* utiliza um fluoróforo (5-FAM) e um supressor (QXL520TM) ligados a um substrato peptídico (peptídeo *FRET*, do inglês *fluorescent resonance energy transfer*). Em um peptídeo *FRET* intacto, a fluorescência de 5-FAM é extinta pelo supressor QXL520TM. Após a clivagem do péptido *FRET* pelas MMPs, a fluorescência de 5-FAM é liberada, e pode ser continuamente monitorada na excitação/emissão de 490 nm/520 nm. Os resultados foram expressos em concentração de MMPs pela concentração de proteínas, as quais foram determinadas de acordo com o item 3.2.35.

3.2.37. A análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste *t Student* ou ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni, utilizando GraphPad Prism[®], versão 4.00 (San Diego, CA, EUA). Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (epm) e foram consideradas significativamente diferentes quando foi obtido $p < 0,05$.

Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das micropartículas lipídicas sólidas contendo B-3

A distribuição do tamanho das micropartículas lipídicas sólidas (MLSs) contendo B-3 é mostrada na Tabela 6. Os valores médios de tamanho (D_{50}) variaram de $28,5 \pm 4,5$ (MLS_{CA70%}) a $60,0 \pm 3,7$ μm (MLS_{CA50%}). Todos os valores de D_{50} , com exceção de MLS_{CA70%}, foram menores que 50 μm e maiores que 25 μm , sendo considerados ideais para aplicação tópica (10-50 μm) (TURSSILI et al, 2007). Os resultados de polidispersividade mostraram que as MLSs de cera de abelha apresentaram *SPAN* mais estreito (1,24 a 1,89) do que as MLSs de cera de carnaúba (1,89 a 2,48). Analisando a Tabela 6 os valores de D_{10} das MLS_{CA30%} e MLS_{CA50%} foram maiores que as demais MLSs. Provavelmente, as gotículas menores produzidas durante a solidificação dessas MLSs aderiram na câmara de resfriamento e se perderam no processo, elevando seus valores de D_{10} . Este fato parece estar relacionado com a quantidade de cera de abelha utilizada (70 e 50 %). Essa capacidade de aderência da cera de abelha pode ser comprovada nas fotomicrografias apresentadas na Figura 11. Pode-se observar que as MLSs de cera de abelha apresentaram-se aglomeradas entre si, independente da quantidade de B-3 incorporada. Além disso, a presença de B-3 parece ter mudado a morfologia circular dessas MLSs. Isto pode ser visualizado comparando-se as MLSs contendo apenas cera de abelha (Figura 11B) com as MLSs de cera de abelha contendo diferentes concentrações de B-3 (Figura 11 C1, C2 e C3). Por outro lado, as MLSs de cera de carnaúba mostraram forma circular com baixa aglomeração e poucas irregularidades na superfície das partículas. Outro fato interessante é que as diferentes concentrações de B-3 não modificaram a morfologia dessas partículas. Em relação à presença da forma cristalina da B-3 na superfície das microesferas não foi

possível visualizar nitidamente a presença de cristais de B-3, os quais podm ser vistos na Figura 11 A e A1.

Tabela 6. Valores do tamanho de partícula, polidispersividade e eficiência de encapsulação das MLSs de cera de abelha e cera de carnaúba contendo benzofenona-3.

EXP	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)	SPAN	EE (%)
MLS _{CA30%}	19,4 ± 0,8	43,5 ± 0,9	95,8 ± 1,4	1,76 ± 0,05	97,98 ± 2,0
MLS _{CA50%}	31,5 ± 4,7	60,0 ± 3,7	106,7 ± 7,9	1,24 ± 0,10	100 ± 0,0
MLS _{CA70%}	9,0 ± 3,9	49,4 ± 2,3	103,1 ± 8,6	1,89 ± 0,18	99,65 ± 1,6
MLS _{CC30%}	8,3 ± 0,8	42,8 ± 3,3	113,3 ± 4,8	2,47 ± 0,10	98,89 ± 2,3
MLS _{CC50%}	6,1 ± 1.4	44,9 ± 9.7	114,1 ± 15,8	2.48 ± 0,22	95,53 ± 1,5
MLS _{CC70%}	1,6 ± 0,4	28,5 ± 4,5	76,3 ± 17,5	2,57 ± 0,18	100 ± 0,0

A Tabela 6 mostra os valores de eficiência de encapsulação (EE) das MLSs contendo B-3. A EE foi acima de 95 %. Portanto, a técnica de *spray congealing* foi satisfatória para a preparação de MLSs contendo B-3 sem afetar o conteúdo do ativo. Este fato pode ser atribuído à alta estabilidade térmica de B-3 e a eficiência na mistura e homogeneização das ceras com B-3.

A caracterização das MLSs contendo B-3 foi realizada por DSC e difração de raios X com o objetivo de detectar possíveis modificações do estado sólido e possíveis interações entre o filtro solar e as ceras estudadas. A Figura 12 mostra os difratogramas das MLSs da cera de abelha e cera de carnaúba contendo B-3, da cera de abelha, cera de carnaúba e benzofenona-3. O processo de produção das MLSs não modificou o estado cristalino da B-3, pois os difratogramas das MLSs apresentam seus picos característicos em 2 θ igual a 6,9; 9,9; 16 e 26°. Além disso, pode-se observar que com o aumento da concentração de B-3 (30 a 50 %) nas MLSs ocorre um aumento da intensidade desses picos característicos.

Figura 11. Fotomicrografias das micropartículas lipídicas sólidas de benzofenona-3. Onde: B-3 (A x500 e A1 x 1000 vezes de aumento), MLSs de cera de abelha e cera de carnaúba (B x 5000 e C x 500 vezes de aumento) e MLSs de cera de abelha e cera de carnaúba contendo B-3 nas porcentagens de 30 (B1 x 2000, C1 x 1000 vezes de aumento), 50 (B2 x 2000, C2 x 1000 vezes de aumento) e 70 % (B3 x 2000, C3 x 5000 vezes de aumento), respectivamente.

Por outro lado, quando se compara as MLSs contendo 50 % com as MLSs contendo 70 % não se observa essa diferença o que poderia sugerir uma diminuição da cristalinidade da B-3. No entanto, os resultados obtidos por DSC, mostrados nas Figuras 13 e 14, sugerem que com o aumento do conteúdo de B-3 nas MLSs ocorre um aumento do pico de fusão ($\approx 64\text{ }^{\circ}\text{C}$) devido à presença da forma cristalina deste filtro solar. Estes dados podem ser suportados pelos valores de entalpia (ΔH) apresentados na Tabela 7 pelas MLSs de cera de carnaúba, os quais mostraram um aumento gradativo de ΔH ($12,55 \Rightarrow 25,78 \Rightarrow 55,12\text{ J/g}$) de acordo com o aumento do conteúdo de B-3. Um fato interessante é o aparecimento de um novo pico nas MLSs produzidas com cera de carnaúba em $7,8^{\circ}$ (2θ). Analisando a Figura 6 é possível verificar um aumento deste pico à medida que ocorre o aumento da concentração de B-3 nas MLSs. Provavelmente, a presença de B-3 causou uma desestruturação do estado cristalino da cera de carnaúba. Esta hipótese pode ser sustentada pelos dados de DSC (Tabela 7) que mostram uma diminuição do pico de fusão da cera de carnaúba ($80,28 \Rightarrow 78,86 \Rightarrow 77,76\text{ }^{\circ}\text{C}$) nas MLSs de acordo com o aumento da concentração de B-3.

Portanto, os resultados de difração de raios X e DSC sugerem que a B-3 e a cera de abelha não apresentaram modificações de seus estados cristalinos na forma de MLSs. Por outro lado, a cera de carnaúba sofreu uma mudança na sua estrutura cristalina com o aparecimento de um novo pico.

Figura 12. Difrátogramas das micropartículas lipídicas sólidas de benzofenona-3, onde: benzofenona-3 (B-3), cera de carnaúba (CC), cera de abelha (CA) e suas micropartículas lipídicas sólidas contendo B-3 nas porcentagens de 30 (MLS_{CC30%}, MLS_{CA30%}), 50 (MLS_{CC50%}, MLS_{CA50%}) e 70 % (MLS_{CC70%}, MLS_{CA70%}), respectivamente.

Figura 13. Curva calorimétrica das micropartículas lipídicas sólidas de cera de carnaúba contendo benzofenona-3, onde: benzofenona-3 (B-3), cera de carnaúba (CC) e suas micropartículas lipídicas sólidas contendo B-3 nas porcentagens de 30 (MLS_{CC30%}), 50 (MLS_{CC50%}) e 70 % (MLS_{CC70%}), respectivamente, obtidas por DSC.

Figura 14. Curva calorimétrica das micropartículas lipídicas sólidas de cera de abelha contendo benzofenona-3, onde: benzofenona-3 (B-3), cera de abelha (CA) e suas micropartículas lipídicas sólidas contendo B-3 nas porcentagens de 30 ($MLS_{CA30\%}$), 50 ($MLS_{CA50\%}$) e 70 % ($MLS_{CA70\%}$), respectivamente, obtidas por DSC.

Tabela 7. Características térmicas da benzofenona-3, cera de abelha, cera de carnaúba e suas micropartículas lipídicas sólidas.

Exp.	Início da fusão (°C)	Pico de fusão	ΔH (J/g)
B-3	60,84	64,73	82,97
CA	26,42/72,59	59,04	182,43
CC	64,36	84,69	188,19
$MLS_{CA30\%}$	23,93	57,03	151,38
$MLS_{CA50\%}$	39,09/59,19	56,75/60,77	104,63
$MLS_{CA70\%}$	39,58/59,42	57,17/62,85	4,43/28,01
$MLS_{CC30\%}$	51,46/66,89	62,13/80,28	12,55/91,22
$MLS_{CC50\%}$	53,05/68,08	62,91/78,86	25,78/51,15
$MLS_{CC70\%}$	52,50/70,00	62,87/77,76	55,12/22,22

4.2. Liberação *in vitro* das MLSs contendo B-3

O objetivo deste ensaio não foi mimetizar as condições fisiológicas (com exceção do pH), mas comparar a liberação da B-3 em relação as MLSs contendo B-3. O perfil de liberação da B-3 e suas MLSs são mostrados na Figura 15. Todas as MLSs foram capazes de controlar a liberação da B-3 por um período de 5 horas. Após esse período apenas as $MLS_{CC30\%}$ promoveram uma liberação sustentada até 8 horas. Na primeira hora de ensaio B-3 apresentou 75 % de liberação e atingiu o platô em três horas enquanto as MLSs liberaram abaixo de 60 %. Na primeira hora de liberação foi observado que as MLSs contendo 30 e 50 % foram capazes de controlar a liberação de B-3 do que as MLSs contendo 70 % de filtro solar. Após 2 horas de liberação apenas $MLS_{CC50\%}$ e $MLS_{CC30\%}$ foram mais eficazes em controlar a liberação que as demais MLSs. Estes resultados sugerem que as MLSs de cera de carnaúba são capazes de controlar a liberação de B-3 de maneira mais eficaz por duas horas do que as MLSs de cera de abelha em concentrações abaixo de 50 %.

Figura 15. Perfil de dissolução *in vitro* comparativo das micropartículas lipídicas sólidas de benzofenona-3, onde: benzofenona-3 (B-3) e micropartículas lipídicas sólidas de cera de abelha (CA) e cera de carnaúba (CC) contendo B-3 nas porcentagens de 30

(MLS_{CC30%}, MLS_{CA30%}), 50 (MLS_{CC50%}, MLS_{CA50%}) e 70 % (MLS_{CC70%}, MLS_{CA70%}), respectivamente. Os resultados representam a média da triplicata $\pm$ epm.

4.3. Estudo da citotoxicidade das MLSs contendo B-3 em cultura de células de fibroblastos de rato L929

Apesar da B-3 ser considerada segura como filtro solar, o potencial citotóxico das suas MLSs foi avaliado em linhagem de células L929 de fibroblastos de rato, já que estudos na literatura mostram que a B-3 é capaz de penetrar nas camadas mais profundas da pele e que, de maneira cumulativa pode causar um efeito pró-oxidativo indesejável (HANSON; GRATTON; BARDEN, 2006). Para fins de comparação, a citotoxicidade das MLSs contendo apenas cera de abelha e cera de carnaúba foi avaliada em paralelo utilizando o ensaio de captação de vermelho neutro.

Os resultados do ensaio de captação de vermelho neutro foram plotados em termos da viabilidade celular em função de concentrações de B-3 pura, MLS_{CC70%} e MLS_{CA70%}, como mostrado na Figura 16. Todas as amostras exibiram baixa toxicidade em células L929 de fibroblastos, reduzindo a viabilidade celular a 60.23 ± 0.7 % B-3, 61.62 ± 2.4 % MLS_{CC70%} e 86.59 ± 3.0 % em altas doses na concentração de 2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ com CI_{50} s de $1090 \pm 71,2$ $\mu\text{g} / \text{mL}$, $999,0 \pm 123,8$ $\mu\text{g} / \text{mL}$ e $251,1 \pm 22,7$ $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. É interessante notar, que as MLS_{CA70%} mostraram uma citotoxicidade maior quando comparadas com as MLS_{CC70%} e B-3 pura. A Figura 17 mostra a viabilidade celular em função das concentrações de MLS_{CC} e MLS_{CA}, onde a 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ as MLS_{CC} reduziram a viabilidade celular em $27,78 \pm 2,6\%$, enquanto que as MLS_{CA} reduziram em $45,45 \pm 6,5$ %. Portanto, as MLSs produzidas com cera de abelha foram mais citotóxicas do que as MLSs produzidas com cera de carnaúba.

Embora linhagens de células diferentes possam exibir diferentes sensibilidades para o mesmo composto citotóxico, a baixa citotoxicidade das MLSs contendo B-3 sugerem que estas poderiam ser usadas com segurança em formulações tópicas.

Figura 16. Determinação da viabilidade celular de fibroblastos L929 em cultura de células na presença das micropartículas lipídicas sólidas de benzofenona-3, onde: benzofenona-3 (B-3), micropartículas lipídicas sólidas de cera de carnaúba contendo 70 % de B-3 (MLS_{CC70%}) e micropartículas lipídicas sólidas de cera de abelha contendo 70 % de B-3 (MLS_{CA70%}). Os valores representados por letras diferentes foram significativamente diferentes pelo teste *t Student*, com $p < 0,05$.

Figura 17. Determinação da viabilidade celular de fibroblastos L929 em cultura de células na presença do controle do solvente, micropartículas lipídicas sólidas de cera de carnaúba (MLS_{CC}) e micropartículas lipídicas sólidas de cera de abelha (MLS_{CA}). Os valores representados por letras diferentes foram significativamente diferentes pelo teste *t Student*, com $p < 0,05$.

4.4. Estudo de fotoestabilidade das MLSs contendo B-3 por CLAE e em cultura de células

Com o intuito de verificar a fotoestabilidade das MLSs contendo B-3, as MLS_{CC70%}, MLS_{CA70%} e B-3 foram expostas a três doses de irradiação UVA e seu perfil cromatográfico e citotoxicidade celular foram avaliados. A análise por CLAE das MLSs e B-3 pura não-irradiadas e irradiadas não mostraram mudanças no perfil cromatográfico sem nenhuma alteração significativa da concentração de B-3 quando comparados entre si, apresentando apenas o pico característico da B-3 com tempo de retenção de aproximadamente 6 minutos (Figura 18). Portanto, as MLSs e B-3 foram estáveis nas doses de irradiação UVA estudadas.

Figura 18. Perfil cromatográfico da benzofenona-3, onde A corresponde a B-3 não irradiada e B corresponde a B-3 irradiada a 35 J/cm^2 .

A Figura 19 mostra os resultados da viabilidade celular em relação às concentrações da B-3 pura, $\text{MLS}_{\text{CC70\%}}$ e $\text{MLS}_{\text{CA70\%}}$ após a exposição a três diferentes doses de irradiação UVA. Pode-se notar que a viabilidade celular das amostras não sofreu nenhuma modificação dos resultados observados nos estudos de citotoxicidade apresentados anteriormente. Isso mostra que as MLSs contendo B-3 são estáveis a altas doses de irradiação UVA garantindo sua segurança de uso.

Figura 19. Determinação da viabilidade celular de fibroblastos L929 em cultura de células após a exposição das formulações com micropartículas lipídicas sólidas contendo benzofenona-3, onde: benzofenona-3 (B-3) (A), micropartículas lipídicas sólidas de cera de carnaúba contendo 70 % de B-3 (B) e micropartículas lipídicas sólidas de cera de abelha contendo 70 % de B-3 (C) em três diferentes doses de irradiação (10, 25 e 35 J/cm²) correspondendo a aproximadamente 1, 2 e 3 horas de exposição.

4.5. Estabilidade das formulações contendo MLSs pela avaliação do comportamento reológico

A análise reológica é fundamental para o desenvolvimento, caracterização físico-química, e o controle de qualidade de formulações farmacêuticas. A caracterização físico-química de formulações tópicas semi-sólidas é usado com o objetivo de determinar os efeitos do tempo de prateleira a diferentes temperaturas, com a incorporação de substâncias ativas. Portanto, estudos reológicos com avaliação das

propriedades tixotrópicas ajudam a compreender as propriedades físicas e de estabilidade estrutural de sistemas semi-sólidos (DI MAMBRO & FONSECA, 2005).

Inicialmente, foram testadas várias formulações para averiguar qual delas seria capaz de manter estável a presença das MLSs. Os testes preliminares para verificar se as formulações eram estáveis foi feito usando testes de desafio por centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos, após 24 horas do preparo destas formulações. Após esse período as formulações foram avaliadas visualmente se houve ou não separação de fases. A formulação escolhida esta descrita no item 3.2.12 O principal componente da formulação é hostacerin[®] SAF um auto-emulsificante, que é uma associação entre doadores de viscosidade e emulsionantes desenvolvida para possibilitar a preparação de emulsões com caráter aniônico a frio. A principal característica do hostacerin[®] SAF nesse estudo é a possibilidade de adicionar os ativos à temperatura ambiente. Isto se torna um fator importante para o preparo de formulações contendo MLSs, já que estas não podem ser adicionadas na formulação a quente, pois comprometeria suas características intrínsecas.

O segundo passo foi avaliar o comportamento reológico dessa formulação contendo os dois tipos de MLSs estudadas. A Figura 20 mostra os reogramas destas formulações. O índice de fluxo de todas as formulações foi inferior a 1, o que indica um comportamento pseudoplástico. Formulações com um fluxo pseudoplástico são capazes de produzir um filme coerente cobrindo a superfície da pele, o que é importante para uma melhor proteção da superfície da pele para aplicação de formulações contendo filtro solar (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003). Neste estudo, as formulações sem B-3 ou MLSs (F-1), com B-3 (F-B3) ou com MLSs constituídas de cera de carnaúba e 70 % de B-3 (F-MLS_{CC70%}) apresentaram um índice de fluxo de aproximadamente 0,38. No entanto, a formulação contendo MLSs constituídas de cera de abelha e 70 % de B-3

(F-MLS_{CA70%}) mostrou um índice de fluxo inicial de 0,37 e diminuiu a partir do quarto dia de estudo para 0,30 (Figura 21 A). Todas as formulações foram consideradas tixotrópicas. F-MLS_{CA70%} apresentou um valor de tixotropia inicial semelhante ao de F-MLS_{CC70%}: 39200 ± 3937 e 36020 ± 1555 Pa/s, respectivamente. No entanto, o valor de tixotropia de F-MLS_{CA70%} aumentou para 48680 ± 1888 Pa/s, no quarto dia e manteve-se neste nível por 28 dias (45970 ± 2747 Pa/s), como mostrado na Figura 21 C. A redução do índice de fluxo e aumento nos valores de tixotropia apresentados pela F-MLS_{CA70%} foram provavelmente promovidos por uma interação físico-química entre a cera de abelha e os componentes da formulação e por alterações extremas de temperatura (4 a 40 °C) durante o ensaio de estabilidade.

Em contraste, a viscosidade aparente e os valores de pH (Figura 21 B e D, respectivamente), não se alteraram com o tempo de armazenamento ou de ciclos de temperatura durante o estudo de estabilidade. O pH médio foi de cerca de 5,5 para todas as formulações. A pele apresenta um pH ligeiramente ácido, variando de 4,6 a 5,8, o que contribui para a proteção bactericida e fungicida de superfície da pele (LEONARDI, et al., 2002). Assim, as formulações do presente estudo mostraram valores de pH aceitável para aplicação tópica. Os menores valores de viscosidade aparente foram observados para F-1, com um valor inicial de 3,7 e variando de 3,5 a 3,7 Pas. Os valores mais elevados foram observados para as demais formulações, com um valor inicial de 4,2 variando de 4,3 a 4,5 Pas. Este pequeno aumento na viscosidade aparente está relacionada com a presença de B-3 e MLSs nessas formulações. No entanto, não houve diferença significativa entre os valores da viscosidade das formulações que contêm B-3 ou MLSs. Em conclusão, só F-MLS_{CC70%} não alteraram as características estudadas durante o período experimental, demonstrando ser estável e adequado para aplicação tópica.

Figura 20. Reogramas das formulações com micropartículas lipídicas sólidas contendo benzofenona-3, onde: formulação sem B-3 ou MLSs (F-1), formulação contendo apenas B-3 (F-B3), formulação contendo MLSs de cera de carnaúba com 70 % de B-3 (F-MLS_{CC70%}) e formulação contendo MLSs de cera de abelha com 70 % de B-3 (F-MLS_{CA70%}).

Figura 21. Alterações no índice de fluxo (A), na viscosidade aparente (B), tixotropia (C) e pH (D) das formulações sem B-3 ou MLSs (F-1), formulação contendo apenas B-3 (F-B3), formulação contendo MLSs de cera de carnaúba com 70 % de B-3 (F-MLS_{CC70%}) e formulação contendo MLSs de cera de abelha com 70 % de B-3 (F-MLS_{CA70%}).

4.6. Retenção/permeação em pele de orelha de porco

Um estudo de retenção/permeação *in vitro* usando orelhas de porco foi realizada para verificar se MLSs contendo elevadas concentrações de filtro B-3 (70 %) seriam capazes de diminuir a penetração deste filtro solar na pele. B-3 é caracterizado por um peso molecular relativamente baixo (228,25 g/mol) com log P de 3,58 o que resulta numa boa capacidade para penetrar na pele (VILELA, et al., 2012). Os resultados deste ensaio demonstraram que a formulação contendo apenas B-3 (F-B3) apresentou uma concentração máxima de retenção de $45,53 \pm 8,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ na pele 12 horas após a

aplicação, enquanto que a formulação contendo MLSs de cera de abelha com B-3 (F-MLS_{CA70%}) apresentou uma retenção de $81,71 \pm 13,70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 22). Estes dois valores não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$). Por outro lado, a formulação contendo MLSs de cera de carnaúba com B-3 (MLS_{CC70%}) mostrou uma concentração máxima de retenção de $14,32 \pm 2,40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, representando uma redução de três vezes na penetração em comparação com o F-B3. Com base nestes resultados, as MLSs produzidas usando cera de abelha ou carnaúba não foram capazes de impedir totalmente a penetração da B-3 na pele. No entanto, elas foram capazes de inibir a permeação de B-3. F-B3 apresentou um valor de permeação de $2,41 \pm 0,65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, ao passo que B-3 não foi detectado no frasco receptor, após uma aplicação de 12 horas de formulações contendo MLSs.

Figura 22. Retenção na pele de orelha de porco de B-3 a 12 horas após a sua aplicação tópica, incluindo as formulações utilizando micropartículas lipídicas sólidas de cera de carnaúba, contendo 70 % de B-3 (F-MLS_{CC70%}) e micropartículas lipídicas sólidas de cera de abelha contendo 70 % de B-3 (F-MLS_{CA70%}). Os resultados são representados pela média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni de comparações múltiplas. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as amostras ($p < 0,05$).

Embora a cera de carnaúba e cera de abelha apresentem uma estrutura semelhante, existe uma diferença na composição química que consistem em diferentes

quantidades de ésteres de ácidos, ácidos livres, álcoois graxos, e hidrocarbonetos. Mais especificamente, a cera de carnaúba contém uma menor percentagem de ácidos graxos livres (índice de acidez de 2-7), uma maior percentagem de ésteres de ácidos graxos (valor de éster de 75-85) e resina de 5 %, enquanto que cera de abelha é composta de uma percentagem mais elevada de ésteres de ácidos graxos (valor ácido de 17-24) e uma percentagem de ésteres graxos de 72-79 % (OZYAZICI, et al., 2006). Um maior número de grupos hidroxila e de ácidos graxos livres na estrutura da cera de abelha a torna mais hidrofílica do que a cera de carnaúba aumentando a probabilidade das MLSs liberarem B-3 mais facilmente quando em contato com a pele (KHERADMANDNIA et al., 2010).

4.7. Estudo de fotoproteção das formulações contendo MLSs de B-3

Estudos de fotoproteção são de extrema importância para se avaliar o grau de proteção de protetores solares. Entretanto, esses ensaios são feitos em humanos tornando-os dispendiosos e causando dor, desconforto e riscos a saúde aos voluntários. Portanto, é importante o desenvolvimento de ensaios que substituam os convencionais. O uso de explantes de pele humana, provenientes de procedimentos cirúrgicos, explantes de pele de porco e modelos de pele reconstruídas 3D são estratégias interessantes para estudos de fotoproteção e têm sido usados nos últimos anos (GÉLIS, et al., 2003). Outra estratégia interessante que pode ser utilizada como ensaios de fotoproteção iniciais é o cultivo de cultura de células usando a aplicação das formulações em placa de quartzo, pois o quartzo permite a passagem da radiação ultravioleta.

Outro ponto que merece destaque é que na literatura científica não há trabalhos mostrando a capacidade fotoprotetora de filtros solares microencapsulados. A microencapsulação muda as propriedades físico-químicas dos filtros solares, como por

exemplo, a solubilidade destes filtros na formulação. Portanto, torna-se de extrema importância avaliar a capacidade fotoprotetora de tais formulações.

Nesse estudo, foram utilizados células de fibroblastos de rato cultivadas em placas de seis poços. As células foram irradiadas em doses de UVA e UVB previamente determinadas através de um estudo preliminar de doses crescentes de UVA ou UVB para determinar uma dose que promovesse uma diminuição da viabilidade celular para 50 a 70 %. Nos ensaios com irradiação UVA as placas foram irradiadas a 50 J/cm² e UVB 400 mJ/ cm².

A Figura 23 mostra os resultados de fotoproteção das formulações irradiadas com UVA e UVB. Pode-se notar que as formulações contendo MLSs foram capazes de proteger as células quando comparadas com a formulação contendo apenas B-3. Esse resultado mostra que o processo de microencapsulação usando altas concentrações de B-3 não comprometeu a capacidade fotoprotetora do filtro solar estudado. Em adição, as formulações contendo MLSs foram capazes de aumentar a capacidade fotoprotetora de B-3 sob a radiação UVA. Esse fenômeno pode ser explicado por um possível sinergismo de mecanismos envolvidos na proteção contra a radiação. A B-3 é capaz de absorver a radiação UV e libera-la na forma de calor. Já as ceras de abelha e cera de carnaúba tem baixa capacidade de absorção, porém na forma de micropartículas podem estar atuando como barreira física refletindo os raios UV. Além disso, pode-se verificar que as formulações contendo MLSs de cera de abelha foram mais eficazes em proteger as células da irradiação UVA e UVB do que a formulação contendo MLSs de cera de carnaúba.

Figura 23. Fotoproteção das formulações contendo micropartículas lipídicas sólidas de benzofenona-3. Onde: formulação sem B-3 ou MLSs (F-1), formulação contendo apenas B-3 (F-B3), formulação contendo MLSs de cera de carnaúba com 70 % de B-3 (F-MLS_{CC70%}), formulação contendo MLSs de cera de abelha com 70 % de B-3 (F-MLS_{CA70%}), Onde F-SPF60 é uma formulação comercial com fator de proteção solar 60, CNI - controle não irradiado e CI - controle irradiado. Os resultados são representados pela média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni de comparações múltiplas. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as amostras ($p < 0,05$).

4.8. Planejamento experimental para produção das MLSs contendo AVO por *spray congealing*

O planejamento experimental é uma ferramenta que pode ser utilizada quando se têm muitas variáveis (fatores) que se pretende estudar, na tentativa de obter o maior número de informações com o menor número de experimentos (FERREIRA, et al., 2007). Nesse estudo foi escolhido o planejamento composto central, PCC, o qual permite explorar as superfícies de resposta quadrática e construir modelos polinomiais de segunda ordem (PAGLIARUSSI; BASTOS; FREITAS, 2006).

A escolha dos fatores e respostas estudadas foi feita de acordo com a necessidade de produzir MLSs adequadas para aplicação em formulações de uso tópico. Além disso, na

literatura não existem estudos relacionados a condições ideais de preparação de MLSs por *spray congealing*.

A Tabela 8 mostra os valores obtidos das respostas estudadas. A EE variou de 70,2 a 100 %. De acordo com essa faixa de valores, ANOVA (Tabela 9) mostrou que o termo linear de VAR, os termos quadráticos de $AVO_{cont.}$ e VAD e a interação entre $AVO_{cont.}$ x VAR foram significantes a 5%. Em adição, a interação entre $AVO_{cont.}$ x VAD e VAR x VAD foram significantes a 1%. O gráfico de superfície de resposta apresentado na Figura 24 mostra que valores intermediários de $AVO_{cont.}$ (30-50 %) promovem um aumento da EE, mas que valores acima de 70% causam uma diminuição da EE. A Figura 25 mostra a interação entre VAD e VAR, onde valores elevados destes fatores conduziram um aumento de EE. Provavelmente, vazões de ar de resfriamento (VAR) maiores promovem a formação de microesferas mais rapidamente devido a um aumento da transferência de calor das gotículas para o ar frio. O aumento de VAD contribui para uma maior quantidade de gotículas na câmara de resfriamento que solidificam mais rápido devido a valores de VAR elevados conduzindo uma alta EE. A Figura 26 mostra a interação entre VAD e $AVO_{cont.}$, o quais demonstram um efeito negativo na EE, onde o aumento de EE ocorre quando $AVO_{cont.}$ e VAD diminuem. Esse efeito negativo também é observado na Figura 24.

A análise de superfície de resposta resultou na Equação (10) para a predição de EE com um coeficiente de determinação (R^2), que é definida como a razão entre a variação explicada e a variação total, de 0,909.

$$EE = 98,86 + 3,3 \times \left(\frac{W_{CA} - 2}{0,5} \right) + 5,3 \times \left(\left(\frac{W_{CA} - 2}{0,5} \right) \times \left(\frac{W_{MD} - 4,5}{1,5} \right) \right) - 3,9 \times \left(\left(\frac{AVO_{cont} - 50}{20} \right) \times \left(\frac{W_{CA} - 2}{0,5} \right) \right) - 6,5 \times \left(\left(\frac{AVO_{cont} - 50}{20} \right) \times \left(\frac{W_{MD} - 4,5}{1,5} \right) \right) - 3,4 \times \left(\frac{AVO_{cont} - 50}{20} \right)^2 - 3,1 \times \left(\frac{W_{MD} - 4,5}{1,5} \right)^2$$

Eq. (10)

Uma vez que o ajuste do modelo matemático utilizado é verificada pelo R^2 , neste estudo o valor de R^2 confirmou a validade e a adequação do modelo matemático (YANG, et al., 2011). Além disso, o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}), foi de 0,7537, que indica o grau de correlação entre os valores atuais e os valores preditos. Este valor de R^2_{adj} indica uma proximidade entre os valores reais e os valores preditos de EE, confirmando que o modelo foi significativo, indicando um bom grau de correlação entre os valores reais e previstos (GAN, MANAF & LATIFF, 2010).

Figura 24. Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação (EE) em relação à vazão de alimentação de resfriamento (VAR) e do conteúdo de avobenzona (AVO_{cont}).

Tabela 8. Planejamento composto central com fatores e respostas das variáveis dependentes estudados.

EXP.	Respostas					
	EE (%)		D ₅₀ (μm)		SPAN	
	atual	Pred.	atual	Pred.	atual	Pred.
1	85,0	87,8	28,4	28,5	1,96	2,06
2	95,5	100,8	27,7	28,5	1,99	2,06
3	77,8	83,9	32,8	28,5	2,38	2,48
4	99,3	96,9	47,2	28,5	2,49	2,48
5	90,6	90,2	20,1	28,5	2,10	1,98
6	70,2	77,2	41,4	28,5	1,81	1,98
7	100	107,6	39,4	28,5	2,10	1,92
8	100	94,6	28,7	28,5	1,80	1,92
9	93,6	89,2	22,8	44,6	1,84	2,02
10	87,7	89,2	58,9	44,6	1,64	2,02
11	93,1	93,1	30,1	19,7	1,84	2,12
12	98,6	104,5	15,6	19,7	2,01	2,42
13	89,1	90,1	13,8	19,7	2,60	2,29
14	93,7	90,1	17,8	19,7	1,86	1,75
15	100	98,8	18,5	19,7	2,04	2,02
16	96,1	98,8	20,7	19,7	2,09	2,02
17	100	98,8	21,1	19,7	1,96	2,02

*onde: EE: eficiência de encapsulação; D₅₀: diâmetro médio das MLSs; SPAN: polidispersividade.

Tabela 9. Análise de variância da eficiência de encapsulação das micropartículas lipídicas sólidas contendo avobenzona obtidas por *spray congealing*.

Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	p
AVO _{cont.}	0,21	1	0,21	0,014	0,908989
AVO _{cont.} ²	129,90	1	129,90	8,737	0,021228
VAR	148,67	1	148,67	10,000	0,015878
VAR ²	27,25	1	27,25	1,833	0,217892
VAD	8,75	1	8,75	0,589	0,468011
VAD ²	110,38	1	110,38	7,425	0,029559
AVO _{cont.} x VAR	123,24	1	123,24	8,290	0,023679
AVO _{cont.} x VAD	343,22	1	343,22	23,086	0,001955
VAR x VAD	226,85	1	226,85	15,258	0,005852
Erro	104,07	7	14,87

Figura 25. Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação (EE) em relação à vazão de alimentação de dispersão (VAD) e da vazão do ar de resfriamento (VAR).

Figura 26. Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação (EE) em relação à vazão de alimentação de dispersão (VAD) e do conteúdo de avobenzona (AVO_{cont.}).

Os valores de D_{50} das MLSs contendo AVO variaram de 13,8 a 58,9 μm (Tabela 8). Todos os experimentos produzidos nas condições estudadas apresentaram D_{50} apropriados para aplicação tópica (10 a 50 μm) com exceção do experimento 10 (58,9 μm). No entanto, valores de D_{50} mais próximos de 10 μm seriam interessantes para a aplicação tópica, pois diminuiria a percepção sensorial quando aplicados na pele (TURSSILI et al, 2007). A Tabela 10 mostra a análise ANOVA dos fatores estudados em relação ao tamanho médio de partícula (D_{50}). Apenas o termo quadrático do AVO_{cont} foi significativo a 5 %. A Figura 27 mostra que conteúdos de AVO intermediários (≈ 50 %) produziram MLSs com D_{50} reduzidos (≈ 20 μm). A análise de superfície de resposta resultou numa Equação (11) de predição com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,6510.

$$D_{50} = 19,7 + 8,8 \times \left(\frac{AVO - 50}{20} \right)^2$$

Eq. (11)

Neste estudo, o valor de R^2 para D_{50} indicou que a variação total do planejamento experimental não foi completamente explicada pelo modelo. Mesmo que o grau de correlação não tenha sido bom, o modelo foi útil para prever as tendências para D_{50} em função das variáveis independentes.

Em relação aos valores obtidos de polidispersividade, $SPAN$, ANOVA (Tabela 11) mostrou que o termo linear de VAR, o termo quadrático de VAD e a interação entre VAR e VAD foram significantes a 5 %. Em adição, o termo linear de VAD foi significativo a 0,5 %. A Figura 28 mostra que a interação entre VAR e VAD promove uma diminuição do $SPAN$ quando VAR diminui ($3 \Rightarrow 1 \text{ m}^3/\text{min}$) e o VAD aumenta ($1 \Rightarrow 7$

mL/min). A Figura 29 mostra que quando VAD aumenta (≈ 7 mL/min) o *SPAN* diminui para valores entre 1,4 a 1,6.

Tabela 10. Análise de variância do tamanho médio das micropartículas lipídicas sólidas contendo avobenzona obtidas por *spray congealing*.

Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	p
AVO _{cont.}	528,858	1	528,858	4,426946	0,073433
AVO _{cont.} ²	862,663	1	862,663	7,221150	0,031211
VAR	2,763	1	2,763	0,023128	0,883416
VAR ²	63,799	1	63,799	0,534046	0,488644
VAD	0,004	1	0,004	0,000030	0,995804
VAD ²	0,150	1	0,150	0,001259	0,972683
AVO _{cont.} x VAR	35,701	1	35,701	0,298847	0,601589
AVO _{cont.} x VAD	1,201	1	1,201	0,010055	0,922936
VAR x VAD	37,411	1	37,411	0,313161	0,593193
Erro	836,244	7	119,463

Figura 27. Gráfico de superfície de resposta do diâmetro médio das partículas (D_{50}) em relação à vazão do ar de resfriamento (VAR) e do conteúdo de avobenzona ($\text{AVO}_{\text{cont.}}$).

Tabela 11. Análise de variância da polidispersividade (*SPAN*) das micropartículas lipídicas sólidas contendo avobenzona obtidas por *spray congealing*.

Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	p
AVO _{cont.}	0,04528	1	0,04528	3,2939	0,112405
AVO _{cont.} ²	0,06572	1	0,06572	4,7810	0,065009
VAR	0,10476	1	0,10476	7,6214	0,028068
VAR ²	0,00134	1	0,00134	0,0973	0,764128
VAD	0,37208	1	0,37208	27,0683	0,001249
VAD ²	0,10612	1	0,10612	7,7199	0,027358
AVO _{cont.} x VAR	0,00061	1	0,00061	0,0446	0,838831
AVO _{cont.} x VAD	0,06661	1	0,06661	4,8460	0,063602
VAR x VAD	0,10811	1	0,10811	7,8651	0,026354
Erro	0,09622	7	0,01375		

A análise de superfície de resposta resultou na Equação. (12) para a predição do *SPAN* com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9078, o qual confirma a validade e a adequação do modelo matemático (YANG, et al., 2011). Em adição o R^2_{adj} foi de 0,7892 indicando uma boa proximidade entre os valores atuais e os valores preditos de *SPAN*, confirmando que o modelo foi significativo (GAN, MANAF, E LATIFF, 2010).

$$\begin{aligned}
 SPAN = & 2,02 + 0,09 \times \left(\frac{VAR - 2}{0,5} \right) - 0,16 \times \left(\frac{VAD - 4,5}{1,5} \right) + 0,09 \times \left(\frac{VAD - 4,5}{1,5} \right)^2 \\
 & - 0,12 \times \left(\left(\frac{VAR - 2}{0,5} \right) \times \left(\frac{VAD - 4,5}{1,5} \right) \right)
 \end{aligned}$$

Eq. (12)

Figura 28. Gráfico de superfície de resposta da polidispersividade (SPAN) em relação à vazão do ar de resfriamento (VAR) e a vazão de alimentação da dispersão (VAD).

Figura 29. Gráfico de superfície de resposta da polidispersividade (SPAN) em relação à concentração de avobenzona (AVO_{cont.}) e a vazão de alimentação de dispersão (VAD).

4.9. Otimização da produção MLSs contendo AVO e verificação do modelo

Uma ferramenta usada com frequência para a otimização de multi-respostas é a abordagem do método da desejabilidade (D). A técnica envolve a modelagem de cada característica usando a metodologia de superfície de resposta e, em seguida, transformando as características em uma medida única de desempenho. Esta técnica atribui pesos de 0,1 a 10 das variáveis dependentes estudadas de maneira a definir a forma da função de desejabilidade para a resposta. Um peso (p) pode ser selecionado como $0,1 < p = 1$, o que coloca menos ênfase na resposta visada; $p = 1$, o que coloca a mesma importância na resposta específica, ou como $1 < p = 10$, o que coloca mais ênfase sobre a resposta alvo (TIWARI, et al., 2007). Utilizando a técnica de D , o processo de produção foi otimizado definindo uma importância igual ($p = 1$) nas respostas EE, D_{50} e $SPAN$. Após a determinação das condições de produção ótima (Tabela 12), três experimentos foram realizados e os dados para EE, D_{50} e $SPAN$ foram determinados e comparados com os valores previstos. Os resultados de D , condições ótimas de produção de MLSs contendo AVO e os valores previstos e atuais são apresentados na Tabela 12. Uma análise de t -teste foi conduzida para comparar os valores reais das respostas com os valores previstos e Tabela 12 mostra a média de três experimentos para cada resposta. O D_{50} para MLSs otimizadas contendo AVO (MLS_{OT}) foi significativamente diferente do valor previsto. No entanto, o D_{50} foi adequado ≈ 30 μm . Por outro lado, o valor real médio de EE e $SPAN$ para a MLS_{OT} foi semelhante aos respectivos valores previstos e não houve diferença significativa ($p < 0,05$), demonstrando que o modelo matemático utilizado pode ser considerado adequado.

Tabela 12. Condições otimizadas para a produção de MLSs contendo AVO usando o método da desejabilidade com os valores preditos e atuais.

Otimização das MLSs contendo Avobenzona

	Objetivo	Baixo	Alvo	Alto	Peso	Valores Preditos	Valores atuais
EE	Máximo	67,4	100	100	1	99,60	100
D ₅₀	Mínimo	25	25	58,9	1	24,92	29,60 ± 0,1
SPAN	Mínimo	1,64	1,64	2,6	1	1,70	1,74 ± 0,09

Desejabilidade composta= 0,97

Solução global:

AVO_{cont.} (%) = 60,5

VAR (m³/min) = 2,84

VAD (mL/min) = 6,76

4.10. Caracterização físico-química das MLS_{OT} contendo AVO

A Figura 30 mostra os difratogramas das amostras microparticuladas contendo AVO obtidas do estudo de otimização, as quais foram comparadas com a AVO pura, cera de carnaúba e MLSs contendo apenas cera de carnaúba. Os picos característicos da AVO em 10,8; 13,2; 16,5; 17,2; 19,5; 20,2 e 25° (2θ) estão presentes na amostra AVO e corrobora com outros estudos na literatura (ALBERTINI, et al., 2009). As MLS_{CC} não sofreram nenhuma mudança quando comparadas a cera de carnaúba pura que apresentou seus picos característicos em 21,5 e 23,6° (2θ). Por outro lado, no difratograma das MLS_{OTs} não foi observado a presença dos picos característicos da AVO o que pode indicar que o filtro solar estava disperso nas MLSs em um estado amorfo. Além disso, as MLS_{OT} apresentaram dois novos picos 4,2 e 8,9° (2θ), os quais podem indicar uma mudança polimórfica da cera de carnaúba. Essa mudança na estrutura cristalina da cera de carnaúba poderia ser atribuída a uma desordem cristalina causada pela incorporação da AVO. Esta hipótese é consistente com estudos anteriores na literatura de difração de raios X da cera de carnaúba, mostrando o aparecimento de novos picos desta quando foi incorporado oleato de dodecila ou dióxido de titânio na cera (VILLALOBOS-HERNANDEZ & MULLER-GOYMANN, 2006).

A Figura 31 mostra as curvas calorimétricas das MLSs contendo avobenzona obtido do estudo de otimização, as quais foram comparadas com a AVO e cera de carnaúba. A AVO, mostrou um pico de fusão em 85,05 °C. A cera de carnaúba (CC) exibiu um pico endotérmico a 86,21°C, enquanto que as MLSs contendo AVO mostraram dois picos endotérmicos em 75,59 e 78.61°C, provavelmente correspondendo a fusão da cera de carnaúba e da AVO. Esse resultado poderia sugerir que a AVO estaria presente nas MLSs em sua forma cristalina. Em adição, a Figura 32 mostra as fotomicrografias das MLSs contendo AVO. Pode-se perceber a presença de alguns cristais de avobenzona na superfície das MLSs. Portanto, com os resultados apresentados por difração de raios X, DSC e MEV provavelmente a AVO esta presente na forma amorfa e uma pequena parte na forma cristalina.

Figura 30. Difratomogramas das micropartículas lipídicas sólidas contendo AVO, onde: avobenzona (AVO), cera de carnauba (CC), MLSsotimizadas de cera de carnaúba (MLS_{CC}) e suas micropartículas lipídicas sólidas otimizadas contendo AVO (MLS_{OT}).

Figura 31. Curva calorimétrica das micropartículas lipídicas sólidas contendo AVO, onde: avobenzona (AVO), cera de carnaúba (CC), mistura física (MF), micropartículas lipídicas sólidas otimizadas de cera de carnaúba (MLS_{CC}) e suas micropartículas lipídicas sólidas otimizadas contendo AVO (MLS_{OT}) obtidas por DSC.

Figura 32. Fotomicrografias das micropartículas lipídicas sólidas contendo AVO, onde: (AVO) avobenzona (A x1000 e A1 x 3000 vezes de aumento), (MLSCC) micropartículas lipídicas sólidas otimizadas de cera de carnaúba (B x1000 e B1 x 3000 vezes de aumento) e (MLSOT) suas micropartículas lipídicas sólidas otimizadas contendo AVO (C x1000 e C1 x 3000 vezes de aumento).

4.11. Estudo de fotoestabilidade das MLSOT de AVO

Com o intuito de verificar a fotoestabilidade das MLSOTs contendo AVO, as amostras foram expostas a dose de radiação UVA de 50 J/cm^2 e seus perfis cromatográficos foram avaliados. Nesse estudo optou-se por verificar se a rutina poderia aumentar a fotoestabilidade da AVO na forma de MLSs. Portanto, formulações contendo MLSOT e 0,5 (MLSOTrut0,5); 0,75 (MLSOTrut0,75) e (MLSOTrut1.0) 1 % de rutina foram preparadas. Para efeito de comparação foram preparadas formulações contendo AVO pura e formulações contendo 0,5 (Rutina 0,5 %); 0,75 (Rutina 0,75 %) e 1 % (Rutina

1,0 %) de rutina. As concentrações de AVO de cada formulação avaliada foram determinadas por CLAE. A Figura 33 mostra o perfil cromatográfico da AVO com um tempo de retenção de ≈ 13 minutos (Figura 33 A) e o efeito da radiação UVA após a dose de 50 J/cm^2 , conduzindo a uma perda de $\approx 60 \%$ de sua concentração inicial (Figura 33 B). Analisando a Figura 34 pode-se notar que as MLS_{OTs} foram capazes de reduzir a fotodegradação da AVO para $\approx 30 \%$. É interessante notar, que as formulações contendo apenas rutina também foram capazes de evitar a fotodegradação de maneira semelhante às formulações contendo MLS_{OTs} . Entretanto, a porcentagem de rutina incorporada nessas formulações não mostrou diferença significativa quando comparadas entre si. Por outro lado, as formulações contendo a associação de MLS_{OTs} e rutina foram mais eficazes em proteger a AVO contra a radiação UVA do que as demais formulações. Além disso, foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre estas formulações, uma vez que, a formulação $\text{MLS}_{\text{OTrut1.0}}$ foi capaz de proteger a fotodegradação da AVO em $\approx 95 \%$ quando comparada a formulação $\text{MLS}_{\text{OTrut0.5}}$ que protegeu $\approx 90 \%$.

Figura 33. Perfil cromatográfico da Avobenzona, onde A corresponde a AVO não irradiada e B corresponde a AVO irradiada a 50 J/cm^2 .

Figura 34. Resultados da fotodegradação das formulações contendo micropartículas lipídicas sólidas otimizadas de avobenzona. Onde F-AVO é uma formulação que contém apenas avobenzona, F-MLS_{OT} é a formulação contendo MLS otimizadas de AVO, formulações contendo micropartículas lipídicas sólidas otimizadas com 0,5 (MLS_{OTrut}0.5); 0,75 (MLS_{OTrut}0.75) e (MLS_{OTrut}1.0) 1,0 % de rutina pura e formulações contendo apenas rutina com 0,5 (Rutina 0,5 %); 0,75 (Rutina 0,75 %) e 1,0 % (Rutina 1,0 %). Os valores representados por letras diferentes foram significativamente diferentes pelo teste *t Student*, com $p < 0,05$.

4.12. Estudo de fotoproteção das formulações contendo MLS_{OT} de AVO

A radiação UV pode penetrar na pele em função do seu comprimento de onda. Os raios UVA, (320 a 400 nm) podem penetrar mais profundamente na pele afetando a epiderme e principalmente as células da derme (VICENTINI et al, 2008), o que indica que os fibroblastos são mais sensíveis ao estresse oxidativo induzido por UVA do que os queratinócitos (VIOUX-CHAGNOLEAU et al, 2006). Portanto, a linhagem de célula L929 de fibroblasto de ratos foram cultivadas e irradiadas com radiação UVA e a fotoproteção das formulações contendo filtro solar (AVO) microparticulada (MLSs) foram avaliadas. A Figura 35 mostra a formulação contendo MLSs de AVO (F-MLS_{OT}) a qual foi capaz de proteger de maneira similar as células

quando comparadas a formulação contendo apenas avobenzona (F-AVO). Em adição, F-MLS_{OT} previniu a morte celular contra a radiação UVA não sendo significativamente diferente ($p>0.05$) da formulação comercial com fator de proteção solar igual a 30. AVO apresenta forte absorção com valor máximo entre 340–350 nm, a qual diminui sob a ação da radiação UV, resultando em perda do efeito protetor UVA (PARIS et al, 2009). Entretanto, o processo de microencapsulação é capaz de evitar a fotodegradação contra longos períodos de radiação UVA como mostrado por Albertini e colaboradores (ALBERTINI et al. 2009) e confirmado por nossos estudos. Portanto, esses resultados mostram que o processo de microencapsulação não comprometeu a capacidade fotoprotetora do filtro solar na forma de MLSs.

Figura 35. Fotoproteção da formulação contendo MLS_{OT} de avobenzona (F-MLS_{OT}), das formulações sem AVO ou MLSs (F-P), formulação contendo apenas AVO (F-AVO), Onde F_{SPF30} é uma formulação comercial com fator de proteção solar 30, CNI - controle não irradiado e CI - controle irradiado. Os resultados são representados pela média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni de comparações múltiplas. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as amostras ($p < 0,05$).

4.13. Planejamento experimental para produção das nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina

Nesse estudo foi escolhido o planejamento composto central, PCC, o mesmo utilizado para a obtenção de MLSs contendo AVO. A escolha dos fatores e respostas estudadas foi feita de acordo com as principais características das NLSs para a obtenção de partículas com o menor tamanho possível, baixo índice de polidispersividade e alta eficiência de encapsulação. A Tabela 13 mostra os valores obtidos das respostas estudadas. O D_{50} variou de 440,5 a 117,2 nm, EE variou de 97,4 a 99,3 % e CA de 5,8 a 26,6 %. De acordo com essa faixa de valores, ANOVA (Tabelas 14, 15 e 16) mostrou que apenas o termo linear da % de rutina foi significativo a 5 %. Esses resultados são mais evidentes quando se observa as Figuras 36, 37 e 38. O gráfico de superfície de resposta apresentado na Figura 36 mostra que valores de rutina maiores promoveram uma diminuição dos valores de D_{50} . Por outro lado, tanto a EE quanto o CA aumentaram com aumento da % de rutina nas NLSs. Esses resultados sugerem que um aumento da % de rutina no preparo das NLSs promoveria uma diminuição do tamanho de partícula, sendo favoráveis as necessidades desse trabalho. Entretanto, quantidades superiores de rutina impossibilitaram a formação da emulsão no processo inicial de obtenção das NLSs. Portanto, valores maiores de rutina não podem ser usados para a produção de NLSs nessas condições.

Figura 36. Gráfico de superfície de resposta do diâmetro médio das NLSs contendo rutina (D_{50}) em relação à porcentagem de rutina e do tempo.

Tabela 13. Planejamento composto central e resultados das variáveis dependentes estudadas.

.	Fatores				Respostas				
	X ₁ (%)	X ₂ (min)	X ₃ (bar)	D ₅₀ (nm)	EE (%)	CA (%)	AR (%)	IPD	PZ (mV)
1	-1 (10)	-1 (10)	-1 (300)	335,0	98,6	10,9	65,9	0,121	-42,2
2	1 (20)	-1 (10)	-1 (300)	188,3	99,1	18,3	65,7	0,155	-42,0
3	-1 (10)	1 (20)	-1 (300)	334,6	98,7	10,8	64,9	0,188	-50,7
4	1 (20)	1 (20)	-1 (300)	172,0	99,3	19,8	72,1	0,494	-48,5
5	-1 (10)	-1 (10)	1 (700)	382,4	98,4	11,2	67,3	0,273	-45,7
6	1 (20)	-1 (10)	1 (700)	122,5	98,7	14,4	49,4	0,393	-43,2
7	-1 (10)	1 (20)	1 (700)	440,5	97,4	5,8	33,4	0,225	-53,0
8	1 (20)	1 (20)	1 (700)	213,3	99,0	14,1	47,9	0,100	-47,0
9	-1,68 (6,59)	0 (15)	0 (500)	324,7	98,2	8,3	81,7	0,123	-53,5
10	1,68 (23,41)	0 (15)	0 (500)	133,7	99,3	26,6	90,2	0,310	-41,0
11	0 (15)	-1,68 (6,59)	0 (500)	154,9	99,1	16,0	74,6	0,230	-43,1
12	0 (15)	1,68 (23,41)	0 (500)	268,6	98,7	14,7	67,4	0,215	-44,7
13	0 (15)	0 (15)	-1,68 (163,5)	117,7	98,9	15,7	73,2	0,199	-42,7
14	0 (15)	0 (15)	1,68 (836,4)	127,8	98,9	16,7	78,1	0,370	-43,2
15	0 (15)	0 (15)	0 (500)	267,0	98,9	15,5	71,5	0,131	-47,3
16	0 (15)	0 (15)	0 (500)	247,8	98,7	13,7	62,4	0,126	-50,2
17	0 (15)	0 (15)	0 (500)	293,0	98,9	14,2	64,5	0,150	-47,9
18	0 (15)	0 (15)	0 (500)	279,7	98,8	14,7	67,4	0,190	-47,5
19	0 (15)	0 (15)	0 (500)	296,0	98,9	15,9	73,7	0,062	-47,0

Nota: X₁, porcentagem de rutina nas NLSs (%); X₂, tempo (minutos); X₃, pressão (bar), D₅₀, diâmetro médio das NLSs (nm); EE, eficiência de encapsulação (% w/w), CA, conteúdo de ativo (% m/m), AR, ativo recuperado (% m/m), IPD, índice de podispersividade e PZ, potencial zeta (mV).

Tabela 14. Análise de variância do tamanho médio (D₅₀) das NLSs contendo rutina.

Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	P
%Rutina	91486,5	1	91486,5	22,88166	0,000996*
%Rutina ²	99,5	1	99,5	0,02488	0,878156
T	7656,3	1	7656,3	1,91491	0,199771
T ²	164,7	1	164,7	0,04120	0,843671
P	1557,2	1	1557,2	0,38948	0,548062
P ²	16681,9	1	16681,9	4,17232	0,071461
%Rutina x T	35,3	1	35,3	0,00882	0,927218
%Rutina x P	3951,6	1	3951,6	0,98834	0,346125
T x P	3427,9	1	3427,9	0,85736	0,378639
Erro	35984,2	9	3998,2		

Tabela 15. Análise de variância da eficiência de encapsulação (EE) das NLSs contendo rutina.

Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	P
%Rutina	1,70	1	1,70	24,8	0,000756*
%Rutina ²	0,11	1	0,11	1,6	0,236208
T	0,05	1	0,05	0,7	0,409852
T ²	0,02	1	0,02	0,2	0,650212
P	0,30	1	0,30	4,4	0,065215
P ²	0,00	1	0,00	0,0	0,850519
%Rutina x T	0,28	1	0,28	4,1	0,073023
%Rutina x P	0,06	1	0,06	0,9	0,355489
T x P	0,15	1	0,15	2,2	0,170898
Erro	0,61	9	0,07

Figura 37. Gráfico de superfície de resposta da eficiência de encapsulação (EE) em relação à porcentagem de rutina e do tempo.

Tabela 16. Análise de variância do conteúdo de ativo (CA) das NLSs contendo rutina.

Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	P
%Rutina	249,720	1	249,720	34,3048	0,000242*
%Rutina ²	0,808	1	0,808	0,1110	0,746648
T	3,216	1	3,216	0,4419	0,522894
T ²	3,383	1	3,383	0,4648	0,512571
P	12,261	1	12,261	1,6843	0,226624
P ²	0,531	1	0,531	0,0729	0,793278
%Rutina x T	5,478	1	5,478	0,7525	0,408208
%Rutina x P	2,928	1	2,928	0,4023	0,541710
T x P	6,195	1	6,195	0,8511	0,380321
Erro	65,515	9	7,279

Figura 38. Gráfico de superfície de resposta do conteúdo de ativo (CA) em relação à porcentagem de rutina e da pressão de homogeneização.

Em relação ao índice de polispersividade (IPD) tanto a % de rutina quanto a pressão de homogeneização, bem como a interação entre a temperatura e a pressão influenciaram os resultados de IPD (Tabela 17). O gráfico de superfície na Figura 39 mostra que valores menores de pressão e tempo conduzem a uma leve diminuição dos valores de IPD. Por outro lado, a Figura 40 mostra que maiores % de rutina e pressões elevadas conduziram a um aumento dos valores de IPD. Valores de IPD inferiores a 0,2 são considerados adequados para produção de NLSs, pois apresentam uma distribuição de tamanho médio bem estreito (NASSIMI, et al., 2010).

Tabela 17. Análise de variância do índice de polidispersividade (IPD) das NLSs contendo rutina.

Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	P
%Rutina ₁	0,030884	1	0,030884	5,50521	0,043567*
%Rutina ₂	0,011494	1	0,011494	2,04890	0,186111
T	0,000116	1	0,000116	0,02069	0,888786
T ²	0,013237	1	0,013237	2,35960	0,158889
P	0,007518	1	0,007518	1,34008	0,276818
P ²	0,038451	1	0,038451	6,85396	0,027902*
%Rutina ₁ x T	0,000091	1	0,000091	0,01624	0,901387
%Rutina ₁ x P	0,014878	1	0,014878	2,65207	0,137856
T x P	0,069751	1	0,069751	12,43336	0,006453*
Erro	0,050490	9	0,005610

Figura 39. Gráfico de superfície de resposta do índice de polidispersividade (IPD) em relação à pressão e do tempo de homogeneização.

Figura 40. Gráfico de superfície de resposta do índice de polidispersividade (IPD) em relação à pressão de homogeneização e da porcentagem de rutina.

Em relação aos valores de potencial zeta as NLSs contendo rutina apresentaram valores que variaram de -41,0 a -53,5 mV (Tabela 13). Esses valores estão dentro da faixa (- 40 a - 60 mV) ideais para estabilizar as NLSs em dispersão apenas por repulsão eletrostática. Potenciais zeta > 30 mV (em módulo), e > 60 mV (valor ótimo), são necessários para uma completa estabilização eletrostática. Já potenciais zeta entre 5 e 1,5 mV são valores muito baixos que podem promover floculação e entre -5 e +3 mV ocorre floculação máxima (SCHWARZ, et al, 1994). Os valores ótimos de PZ dos experimentos são devido à presença do ácido oléico. Esse promotor de absorção também é capaz de promover características aniônicas a nanopartículas. NLSs produzidas sem ácido oléico apresentaram valores de PZ abaixo de -15 mV. Em relação aos fatores estudados, a % de rutina e o tempo de homogeneização foram os fatores que influenciaram os resultados de PZ (Tabela 18). A Figura 41 mostra que % de rutina mais baixos e maior tempo de agitação conduziram a valores maiores em módulo de PZ.

Tabela 18. Análise de variância do potencial zeta (PZ) das NLSs contendo rutina.

Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	P
%Rutina	74,58	1	74,58	10,291	0,010693*
%Rutina ²	0,44	1	0,44	0,060	0,811925
T	60,74	1	60,74	8,381	0,017738*
T ²	13,83	1	13,83	1,908	0,200466
P	2,95	1	2,95	0,407	0,539629
P ²	24,61	1	24,61	3,396	0,098488
%Rutina x T	3,78	1	3,78	0,522	0,488426
%Rutina x P	4,65	1	4,65	0,642	0,443683
T x P	1,90	1	1,90	0,262	0,620838
Erro	65,22	9	7,25

Figura 41. Gráfico de superfície de resposta ao potencial Zeta (PZ) em relação à porcentagem de rutina e do tempo de homogeneização.

Finalmente, em relação aos valores de ativo recuperado (AR) o tratamento estatístico mostrou que nenhuma das variáveis estudadas (Tabela 19) influenciaram os valores obtidos.

Tabela 19. Análise de variância do ativo recuperado (AR) das NLSs contendo rotina.

Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	P
%Rotina ₁	22,93	1	22,93	0,1153	0,742015
%Rotina ₂	62,85	1	62,85	0,3160	0,587762
T	129,87	1	129,87	0,6529	0,439902
T ²	135,45	1	135,45	0,6810	0,430582
P	284,34	1	284,34	1,4295	0,262392
P ²	30,63	1	30,63	0,1540	0,703877
%Rotina ₁ x T	197,61	1	197,61	0,9935	0,344938
%Rotina ₁ x P	13,31	1	13,31	0,0669	0,801680
T x P	208,28	1	208,28	1,0471	0,332882
Erro	1790,16	9	198,91		

4.14. Otimização da produção NLSs contendo rotina

Utilizando a técnica de desejabilidade, D, o processo de produção foi otimizado definindo uma importância igual ($p = 1$) nas respostas D₅₀, EE, e IPD. As demais respostas não foram selecionadas ou porque estavam de acordo com o desejado, como por exemplo, PZ ótimo ou porque não mostraram significância no tratamento estatístico como AR. Após a determinação das condições de produção ótima (Tabela 20), três experimentos foram realizados e os dados para D₅₀, EE, e IPD foram determinados e comparados com os valores previstos. Os resultados de D, condições ótimas de produção de NLSs contendo rotina e os valores previstos e atuais são apresentados na Tabela 20. Uma análise usando *t teste* não pareado foi conduzida para comparar os valores reais das respostas com os valores previstos e Tabela 20 mostra a média de três experimentos para cada resposta. O D₅₀ para NLSs otimizadas produzidas sob as condições ótimas foi significativamente diferente do valor previsto. No entanto, o D₅₀

foi adequado já que nas condições otimizadas produziu nanopartículas de menor tamanho ($74,22 \pm 2,77$). A Figura 42 mostra a distribuição de tamanho do experimento produzido em condições otimizadas. Por outro lado, o valor real médio de EE e IPD para a NLSs contendo rutina foi semelhante aos respectivos valores previstos e não houve diferença significativa ($p < 0,05$), demonstrando que o modelo matemático utilizado pode ser considerado adequado.

Tabela 20. Condições otimizadas para a produção de NLSs contendo rutina usando o método da desejabilidade com os valores preditos e atuais.

Otimização das NLSs contendo rutina							
	Objetivo	Baixo	Alvo	Alto	Peso	Valores Preditos	Valores atuais
EE	Máximo	97,4	100	100	1	99,25	$98,90 \pm 0,25$
D_{50}	Mínimo	117,7	440,5	117,7	1	117,45	$74,22 \pm 2,77$
IPD	Mínimo	1,64	1,64	2,6	1	0,199	$0,161 \pm 0,34$

Desejabilidade composta= 0,995
Solução global:
 % rutina (%) = 23,41
 Tempo (min)= 21,87
 Pressão (bar) =774,9

Figura 42. Distribuição de tamanho de NLS contendo rutina obtidas em condições otimizadas.

4.15. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina

O potencial citotóxico das NLSs contendo rutina e NLSs sem rutina foram avaliadas em linhagem de fibroblastos L929 utilizando o ensaio de captação de vermelho neutro. Os resultados do ensaio de captação de vermelho neutro foram traçados em termos da viabilidade celular em função das concentrações de NLSs, como mostrado na Figura 43. Essas concentrações foram escolhidas de acordo com resultados anteriores obtidos de citotoxicidade da rutina, a qual apresentou uma baixa toxicidade, reduzindo a viabilidade celular em $79,49 \pm 2,19$ % a 2,0 mg/mL (alta concentração). Por outro lado, as NLSs não mostraram nenhuma diminuição da viabilidade celular mesmo em doses maiores, assim como as NLSs sem rutina. Portanto, as NLSs não apresentaram citotoxicidade nas doses estudadas, mostrando-se seguro para uso em aplicações tópicas.

Figura 43. Determinação da viabilidade celular de fibroblastos L929 em cultura de células na presença das NLSs sem rutina (A) e NLSs contendo rutina (B).

Para avaliar se o tratamento com NLSs contendo rutina e rutina livre teriam alguma influência na viabilidade de fibroblastos L929 irradiados com 50 J/cm² de UVA e 400 mJ/cm², as células foram pré-tratadas 1 h antes da radiação, sendo que as amostras permaneceram em contato com as células por 3 ou 23 h após a irradiação (tempo de tratamento total de 4 ou 24 horas) em doses subtóxicas escolhidas com base nos resultados de citotoxicidade. Pode-se visualizar na Figura 44 e 45, independente do tipo de tratamento, com exceção nas concentrações de 7,81; 15,62 e 31,25 que o tratamento com 24 horas foi mais eficaz do que com 4 horas, e do tipo de radiação, a rutina livre evitou significativamente a morte celular induzida pela radiação UV em cerca de 12 a 40 % em doses crescentes de concentração (0,24 a 15,62 µg/mL), o que mostra a capacidade fotoprotetora da rutina. Entretanto, nas doses de 31,25; 62,5 e 125 µg/mL a rutina não foi capaz de evitar a morte celular induzida pela radiação UV. Além disso, em 62,25 e 125 µg/mL, no tratamento com 24 horas, houve uma diminuição da viabilidade quando comparada com o controle irradiado. A ação da radiação UV e o longo período de contato com as células, polifenóis como no caso da rutina, podem ter uma ação levemente pro-oxidante, causando a diminuição da viabilidade celular. Com relação à NLSs contendo rutina, o tratamento dos fibroblastos por 4 h ou 24 h não mostrou diferença significativa entre as duas formas de tratamento. Por outro lado, todas as concentrações testadas contendo NLSs desse flavonóide foram capazes de proteger os danos causados pela radiação UV evitando a morte celular de 14 a 24 % contra a radiação UVB e de 14 a 36 %, a partir da concentração de 0,49 µg/mL contra a radiação UVA. As NLSs contendo rutina não mostraram diferenças contra os tipos de UV avaliados. Por outro lado, diferentemente da rutina livre as NLSs contendo rutina não promoveram efeitos pró-oxidativos nas maiores doses estudadas. Esse fato deve estar relacionado ao uso de materiais lipídicos como a cera de abelha, presente em maior

quantidade nas NLSs. Interessantemente, a cera de abelha possui propriedades antimicrobianas bem como propriedades de proteção solar, com um comprimento absorção de 220 a 400 nm e um pico máximo de absorção em 292 nm o que provavelmente ajudou a proteger as células da ação dos raios UV (NGUYEN, et al., 2012).

Figura 44. Medida da viabilidade dos fibroblastos de ratos L929 tratados com concentrações crescentes de rutina (A) e NLSs contendo rutina (B) por 4 e 24 h e submetidos a uma única dose de radiação UVB (400 mJ/cm²). Os resultados representam a média de três determinações (realizadas em quadruplicata) ± epm.

Figura 45. Medida da viabilidade dos fibroblastos de ratos L929 tratados com concentrações crescentes de rutina (A) e NLSs contendo rutina (B) por 4 e 24 h e

submetidos a uma única dose de radiação UVA (50 J/cm^2). Os resultados representam a média de três determinações (realizadas em quadruplicata) $\pm$ epm.

4.16. Avaliação das células apoptóticas em pele humana

É bem conhecido que células apoptóticas (*sunburn cells*) são formadas na epiderme, geralmente na camada basal, depois da exposição à radiação UV. Essas células têm morfologia distinta com citoplasma densamente corado (eosinófilo) caracterizadas por um encolhimento celular e uma condensação de seu núcleo (TSAI, et al, 2012). Esse fenômeno pode se visualizado na Figura 46 (b) e (c), identificados pelas setas amarelas, os quais representam a pele irradiada (CI) e a pele tratada com a formulação placebo (IP). Por outro lado, as peles tratadas com as formulações não apresentaram um nível significativo de expressão de células apoptóticas, com valores abaixo de $4,9 \pm 0,8 \%$ (IFR), como o CI ($19,98 \pm 0,9 \%$) e IP ($17,89 \pm 1,3 \%$) permanecendo com níveis semelhantes ao controle não irradiado (Figura 48). Portanto, o desenvolvimento tecnológico da microencapsulação e nanoencapsulação dos filtros solares e rotina, respectivamente, mantiveram a atividade fotoquimioprotetora desses ativos avaliados. Em adição, as amostras tratadas com formulações que não foram irradiadas não apresentaram células apoptóticas e nenhuma alteração morfológica (Figura 47 1).

Figura 46. Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra os efeitos induzidos pela radiação UVB (500 mJ/cm^2) após 24 horas da exposição em secções histológicas de pele humana coradas com hematoxilina-eosina. (a) controle não irradiado, (b) controle irradiado, (c) pele irradiada tratada com formulação placebo, (d) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rutina, (e) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT. e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (f) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas filtros solares B-3, AVO e OCT.

Figura 47. Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra os efeitos induzidos pela radiação UVB (500 mJ/cm^2) após 24 horas da exposição em secções histológicas de pele humana coradas com hematoxilina-eosina. (g) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO microencapsulada e OCT livre, (h) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e avobenzona, (i) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas B-3 e AVO microencapsulada, (j) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas rutina, (k) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (l) pele não irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT e nanopartículas lipídicas sólidas de

rutina. As setas em (b) e (c) indicam a presença de células apoptóticas formadas pela exposição à irradiação UVB.

Figura 48. Inibição da formação de células apoptóticas induzidas pela radiação UVB ($500\text{mJ}/\text{cm}^2$) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina. Onde: (CNI) controle não irradiado, (CI) controle irradiado, (IP) pele irradiada tratada com formulação placebo, (IFR) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rutina, (IF_MR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (IF) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas filtros solares B-3, AVO e OCT, (IF_M) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO microencapsulada e OCT, (IF_{BA}) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO, (IF_{MBA}) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO microencapsulada, (IR) pele irradiada tratada com formulação contendo rutina, (IR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina. A porcentagem de células apoptóticas foi determinada pela relação de queratinócitos viáveis e pela presença de queratinócitos apoptóticos. Os resultados representam a média da triplicata ($n=3$) $\pm$ epm. Valores acompanhados por letras diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA fator único, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

4.17. Avaliação da formação de caspase-3 em pele humana

A caspase-3 é um membro da família ds caspases que desempenham um importante papel no processo de apoptose. A caspase-3 é um importante efetor de caspase por destruir seletivamente proteínas estruturais e funcionais. Assim como a *sunburn cells*, a caspase-3 é formada pela exposição à radiação UVB (XU, et al, 2008).

A Figura 49 (b) e (c) mostra a presença de caspase-3 marcadas em verde na pele irradiada sem formulação (CI) e pele irradiada com formulação sem ativos (IP). A Figura 51 mostra que o CI e IP apresentaram $14,0 \pm 0,9 \%$ e $13 \pm 1,6 \%$ de caspase-3 por núcleo de DNA. Por outro lado, as amostras tratadas com as formulações com ou sem o desenvolvimento tecnológico foram capazes de evitar a formação de caspase-3 expostas a uma alta dose de radiação UVB. Além disso, as amostras tratadas com formulações que não foram irradiadas não apresentaram caspase-3 (Figura 50 l).

Figura 49. A radiação UVB (500 mJ/cm^2), 24 horas após sua exposição induz a formação de Caspase-3 detectados por imunohistoquímica (verde) em secções de pele humana. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). (a) controle não irradiado, (b) controle irradiado, (c) pele irradiada tratada com formulação placebo, (d) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rutina, (e) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (f) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas filtros solares B-3, AVO e OCT.

Figura 50. A radiação UVB (500 mJ/cm^2), 24 horas após sua exposição induz a formação de Caspase-3 detectados por imunohistoquímica (verde) em secções de pele humana. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). (g) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO microencapsulada e OCT livre, (h) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e avobenzona, (i) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas B-3 e AVO microencapsulada, (j) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas rutina, (k) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (l) pele não irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina.

Figura 51. Inibição da formação de caspase-3 induzidas pela radiação UVB (500 mJ/cm²) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina. Onde: (CNI) controle não irradiado, (CI) controle irradiado, (IP) pele irradiada tratada com formulação placebo, (IFR) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rutina, (IF_MR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (IF) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas filtros solares B-3, AVO e OCT, (IF_M) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO microencapsulada e OCT, (IF_{BA}) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO, (IF_{MBA}) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO microencapsulada, (IR) pele irradiada tratada com formulação contendo rutina, (IR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina. A percentagem de caspase-3 foi determinada por uma relação do número de queratinócitos envolvidos pela caspase-3 (verde) e o número de queratinócitos marcados por DAPI (azul). Os resultados representam a média da triplicata (n=3) ± epm. Valores acompanhados por letras diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA fator único, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

4.18. Avaliação da formação de CPDs em pele humana

A formação de CPDs ocorre quando bases pirimidínicas adjacentes absorvem a energia da radiação UV, formando um anel ciclobutano pela ligação covalente entre os átomos de C5 e C6 de ambas as bases nitrogenadas das pirimidinas 5' e 3', respectivamente. Ambos os fotoprodutos são responsáveis por grandes distorções estruturais no DNA, interferindo em mecanismos celulares constitutivos, como replicação e transcrição contribuindo para processos mutagênicos e teratogênicos (MALLET & ROCHETTE, 2013).

As Figuras 52 e 53 mostram as amostras submetidas à radiação UVB e a formação ou não de CPDs marcadas em vermelho. Diferentemente dos resultados observados para células apoptóticas e caspase-3 algumas formulações não foram capazes de evitar a formação de CPDs. As formulações FFR, FF_MR_N, FF e FF_M foram às únicas capazes de evitar 100 % à formação de CPDs. Esse fato está relacionado tanto a presença dos filtros microencapsulados e a rotina nanoencapsulada que agem por ambos os mecanismos de reflexão e absorção e a presença do OCT livre, o qual confere as formulações um alto poder de proteção UVB. No caso das formulações FFAB, FFAB_M, FFR e FFR_N, que não possuem na sua constituição o OCT o poder de proteção a radiação UV diminuiu. Isso mostra a importância da presença de filtros solares de alta proteção UVB como o OCT. Por outro lado, essas formulações foram capazes de diminuir a formação de CPDs de maneira significativa quando comparadas as amostras do CI e IP que apresentaram porcentagens de CPDs de $65,02 \pm 5,3$ e $58,7 \pm 5,5$ %, respectivamente (Figura 54). Além disso, esses resultados foram de grande importância porque mostrou que o desenvolvimento farmacotécnico na produção de micropartículas e nanopartículas aumentou a capacidade fotoprotetora dos ativos. Por exemplo, comparando a amostra tratada com a formulação FFAB_M com a amostra tratada com

FFAB, a primeira permitiu a formação de CPDs em $11,21 \pm 3,6 \%$ enquanto que a segunda permitiu a formação de CPDs em $23,47 \pm 2,6 \%$. O processo de microencapsulação dos filtros B-3 e AVO proporcionaram um aumento da fotoproteção destes frente à radiação UVB tornando a microencapsulação um processo atrativo para aumentar o FPS. O mesmo foi observado para as amostras tratadas com a formulação constituída de nanopartículas lipídicas sólidas de rutina (FR_N). Ela foi muito mais eficaz em proteger a pele da formação de CPDs ($12,12 \pm 2,8 \%$) do que a formulação com rutina livre (FR), a qual permitiu a formação de $30,93 \pm 4,4 \%$ de CPDs. Isso pode ser explicado pela capacidade das NLSs de aumentar a superfície reativa da rutina devido a um aumento da superfície de contato, uma característica de sistemas nanométricos, associado ao seu efeito oclusivo que forma uma camada na superfície da pele e pode atuar por mais tempo absorvendo a radiação e/ou como barreira física.

Figura 52. Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra CPDs induzidas pela radiação UVB em pele humana por imunofluorescência usando anticorpo contra CPDs. (a) controle não irradiado, (b) controle irradiado, (c) pele irradiada tratada com formulação placebo, (d) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e

rutina, (e) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (f) pele não irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina.

Figura 53. Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra CPDs induzidas pela radiação UVB em pele humana normal por imunofluorescência usando anticorpo contra CPDs. (g) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas filtros solares B-3, AVO e OCT, (h) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO microencapsulada e OCT

livre, (i) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO, (j) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas B-3 e AVO microencapsulada, (k) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas rutina, (l) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina.

Figura 54. Inibição da formação de CPDs induzidas pela radiação UVB (500 mJ/cm^2) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina. Onde: (CNI) controle não irradiado, (CI) controle irradiado, (IP) pele irradiada tratada com formulação placebo, (IFR) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rutina, (IF_MR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT livre e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (IF) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas filtros solares B-3, AVO e OCT, (IF_M) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO microencapsulada e OCT, (IF_{BA}) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO, (IF_{MBA}) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO microencapsulada, (IR) pele irradiada tratada com formulação contendo rutina, (IR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina. A percentagem de CPDs foi determinada por uma relação do número de queratinócitos marcados por CPDs (vermelho) e o número de queratinócitos marcados por DAPI (azul). Os resultados representam a média da triplicata ($n=3$) $\pm$ epm. Valores acompanhados por letras diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA fator único, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

4.19. Avaliação das células apoptóticas em pele reconstruída

Nos últimos anos o modelo de pele reconstruída tem sido usado nos mais diversos estudos relacionados a eventos biológicos que ocorrem depois da exposição a radiação UV. Basicamente, o modelo de pele reconstruída é constituído de uma camada de epiderme totalmente diferenciada sobre uma camada densa de fibroblastos, os quais formam a derme. A presença da camada córnea nesses sistemas tridimensionais permite que compostos sejam aplicados tópicamente a fim de mimetizar uma situação mais realista e tornando esse modelo uma ferramenta útil em estudos de novos filtros solares ou formulações tópicas contendo ativos frente à ação da radiação UV.

Uma das principais características que refletem a ação da radiação UVB é a formação de células apoptóticas, as quais podem ser reconhecidas por seu formato redondo com citoplasma eosinófilo, núcleo condensado e localização suprabasal na epiderme (BERNERD & ASSELINEAU, 2008).

Amostras de pele reconstruída foram submetidas à dose de 500 mJ/cm^2 de radiação UVB, a qual induziu a formação de células apoptóticas e promoveu mudanças morfológicas na camada dérmica e epidérmica. A Figura 55 (b) mostra que a alta dose de radiação UVB foi capaz de promover um desprendimento das duas camadas comprometendo toda a estrutura da pele. Por outro lado, a pele reconstruída tratada com a formulação placebo (livre de ativos), assim como mostrado para o controle irradiado, promoveu a formação de células apoptóticas, mostradas pelas setas amarelas, na camada basal da epiderme, mas não causou modificações estruturais como observado na amostra CI. As amostras tratadas com as formulações FFR e $\text{FF}_\text{M}\text{R}_\text{N}$ foram capazes de proteger a pele da formação de células apoptóticas induzidas pela radiação UVB. Por outro lado, as amostras tratadas com as formulações FR e FR_N apresentaram células apoptóticas induzidas pela radiação UVB com valores de porcentagem de células

apoptóticas de $11,97 \pm 0,3$ e $4,8 \pm 0,7$ %, significativamente diferentes do controle não irradiado que apresentou $1,6 \pm 0,7$ % de células apoptóticas (Figura 57). Comparando-se os valores de FR e FR_N mostrou que a formulação contendo NLSs (FR_N) foi capaz de diminuir a formação de células apoptóticas de maneira significativa. Esse resultado pode estar ligado ao fato das NLSs agirem como protetor físico atuando em sinergismo com a rutina que absorve fracamente a radiação UVB.

Esses resultados diferem dos obtidos com pele humana, os quais mostraram que todas as formulações foram capazes de evitar a formação de células apoptóticas induzidas pela radiação UVB. Esse fato pode ser explicado pela dose de radiação empregada ter sido muito alta comprometendo a estrutura da pele reconstruída, já que esta, não tem a mesma complexidade de uma pele normal, como compostos presentes que proporcionam maior resistência estrutural. Porém, essa característica mais frágil da pele reconstruída proporcionou a observação de diferenças de proteção não observadas na pele humana para as formulações testadas.

Figura 55. Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra os efeitos induzidos pela radiação

UVB (500 mJ/cm^2) após 24 horas da exposição em seções histológicas de pele reconstruída coradas com hematoxilina-eosina. (a) controle não irradiado, (b) controle irradiado, (c) pele irradiada tratada com formulação placebo, (d) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rotina, As setas em (b1), (c1), indicam a presença de células apoptóticas formadas pela exposição à irradiação UVB. Letras indicam um aumento de 10 vezes e letras com número indicam um aumento da ordem de 20 vezes.

Figura 56. Avaliação do efeito protetor das formulações contendo filtros solares microencapsulados e rutina nanoencapsulada contra os efeitos induzidos pela radiação UVB (500 mJ/cm^2) após 24 horas da exposição em seções histológicas de pele

reconstruída coradas com hematoxilina-eosina. (e) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT livre e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (f) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas filtros solares B-3, AVO e OCT, (g) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO microencapsulada e OCT livre, (h) pele irradiada tratada com formulação contendo B-3 e AVO, (i) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas B-3 e AVO microencapsulada, (j) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas rutina, (k) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (l) pele não irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (benzofenona-3 e avobenzona), octocrileno e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina. As setas em (g1) e (h1) indicam a presença de células apoptóticas formadas pela exposição à irradiação UVB. Letras indicam um aumento de 10 vezes e letras com número indicam um aumento da ordem de 20 vezes.

Figura 57. Inibição da formação de células apoptóticas induzidas pela radiação UVB (500 mJ/cm²) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina em pele reconstruída humana. Onde: (CNI) controle não irradiado, (CI) controle irradiado, (IP) pele irradiada tratada com formulação placebo, (IFR) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rutina, (IF_MR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT

e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (IR) pele irradiada tratada com formulação contendo rutina, (IR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina. A porcentagem de células apoptóticas foi determinada pela relação de queratinócitos viáveis e pela presença de queratinócitos apoptóticos. Os resultados representam a média da triplicata ($n=3$) $\pm$ epm. Valores acompanhados por letras diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA fator único, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

4.20. Avaliação da formação de caspase-3 em pele reconstruída

A Figura 58 (b) e (c) mostra a presença de caspase-3 marcadas em verde na pele irradiada sem formulação (CI) e pele irradiada com formulação sem ativos (IP) formadas pela radiação UVB. Em adição, A Figura 58 (d) e (e) mostra as amostras tratadas com as formulações FF_MR_N e FFR, as quais evitaram a formação de caspase-3. Ao contrário das formulações FR e FR_N que não foram capazes de evitar a formação de caspase-3 em todos os campos analisados. A Figura 59 mostra que o CI e IP apresentaram valores de $17,90 \pm 3,2 \%$ e $11,99 \pm 1,1 \%$ de caspase-3 por núcleo de DNA, os quais são semelhantes aos obtidos para pele humana normal. Em relação às amostras tratadas com FR e FR_N estas apresentaram valores de $4,9 \pm 2,8 \%$ e $2,3 \pm 0,5 \%$ de caspase-3, respectivamente, não sendo diferentes significativamente entre si, porém foram capazes de diminuir consideravelmente a formação de caspase induzidas por UVB em modelo de pele humana reconstruída.

Figura 58. A radiação UVB (500 mJ/cm^2), 24 horas após sua exposição induz a formação de Caspase-3 detectados por imunohistoquímica (verde) em secções de pele reconstruída. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). (a) controle não

irradiado, (b) controle irradiado, (c) pele irradiada tratada com formulação placebo, (d) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rutina, (e), pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT livre e nanoparticulas lipídicas sólidas de rutina, (f) pele não irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT e nanoparticulas lipídicas sólidas de rutina, (g) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas rutina, (h) pele irradiada tratada com formulação contendo nanoparticulas lipídicas sólidas de rutina.

Figura 59. Inibição da formação de caspase-3 induzidas pela radiação UVB (500 mJ/cm²) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e nanoparticulas lipídicas sólidas de rutina em pele reconstruída humana. Onde: (CNI) controle não irradiado, (CI) controle irradiado, (IP) pele irradiada tratada com formulação placebo, (IFR) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rutina, (IF_MR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT e nanoparticulas lipídicas sólidas de rutina, (IR) pele irradiada tratada com formulação contendo rutina, (IR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo nanoparticulas lipídicas sólidas de rutina. A porcentagem de caspase-3 foi determinada pela relação de queratinócitos envolvidos por caspase-3 (verde) e por núcleos dos queratinócitos marcados com DAPI (azul). Os resultados representam a média da triplicata (n=3) ±

epm. Valores acompanhados por letras diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA fator único, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

4.21. Avaliação da formação de CPDs em pele reconstruída

As Figuras 60 e 61 mostram as amostras submetidas à radiação UVB e a formação de CPDs marcadas em vermelho. A Figura 62 mostra que o CI e o IP tiveram formação de 100 % de CPDs por núcleo celular. Esse resultado foi bem expressivo quando comparado aos valores obtidos na pele humana, os quais ficaram em torno de 60 %. Danos no DNA induzidos por radiação UVB formando dímeros de pirimidina em pele reconstruída é mostrado em doses acima de 50 mJ/cm^2 (VIOUX-CHAGNOLEAU, et al, 2006). Portanto, a alta dose avaliada somada à fragilidade da pele reconstruída quando comparada à pele humana justificam esse resultado. Todas as formulações testadas foram capazes de diminuir significativamente a porcentagem de CPDs formadas, onde a formulação constituída de filtros solares microencapsulados e NLSs de rutina ($\text{FF}_\text{M}\text{R}_\text{N}$) foi capaz de evitar 100 % da indução de CPDs. Da mesma forma, a formulação contendo NLSs de rutina (FR_N) reduziu em $78,3 \pm 1,2 \%$ a formação de CPDs enquanto que a formulação sem NLSs (FR) reduziu apenas $60,9 \pm 1,2 \%$ (Figura 62). Esses resultados mostram que o processo empregado de microencapsulação e nanoencapsulação foi eficiente em promover uma maior proteção contra a formação de CPDs induzidas pela radiação UVB do que as formulações sem o emprego dessas tecnologias.

Figura 60. A radiação UVB (500 mJ/cm^2), 24 horas após sua exposição induz a formação de CPDs detectados por imunofluorescência em secções de pele reconstruída. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) e a presença de CPDs foram marcados em vermelho (Alexa 594). (a) controle não irradiado, (b) controle irradiado, (c) pele irradiada tratada com formulação placebo, (d) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rotina.

Figura 61. A radiação UVB (500 mJ/cm^2), 24 horas após sua exposição induz a formação de CPDs detectados por imunofluorescência em secções de pele reconstruída. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) e a presença de CPDs foram marcados em vermelho (Alexa 594). (e), pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT livre e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (f) pele irradiada tratada com formulação contendo apenas rutina, (g) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (h) pele não irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT livre e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina.

Figura 62. Inibição da formação de CPDs induzidas pela radiação UVB ($500\text{mJ}/\text{cm}^2$) 24 horas após a exposição pelas formulações contendo ou não filtros solares microencapsulados e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina em pele reconstruída. Onde: (CNI) controle não irradiado, (CI) controle irradiado, (IP) pele irradiada tratada com formulação placebo, (IFR) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rutina, (IF_MR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), octocrileno e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (IR) pele irradiada tratada com formulação contendo rutina, (IR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina. A porcentagem de CPDs foi determinada pela presença de CPDs (vermelho) e por núcleos dos queratinócitos marcados com DAPI (azul). Os resultados representam a média da triplicata ($n=3$) $\pm$ epm. Valores acompanhados por letras diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA fator único, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

4.22. Avaliação da formação peroxidação lipídica em pele humana tratadas com formulação por 4 horas após a radiação UVB

A Figura 63 mostra a porcentagem de peroxidação lipídica, a qual é proporcional a concentração de MDA formada, produzida pelas amostras expostas a radiação UVB.

Os resultados mostraram que as formulações foram capazes de diminuir a porcentagem de peroxidação lipídica, com exceção de FR_N, quando comparado ao CI e IP. F_MR_N, FFR e FR inibiram $41,16 \pm 6,7 \%$, $50,42 \pm 11,3 \%$ e $51,5 \pm 2,9 \%$, respectivamente. Esses valores foram todos semelhantes. Por outro lado, as amostras tratadas com FR_N mostraram valores de inibição de apenas $23,29 \pm 12,4 \%$ e semelhança tanto com as demais amostras, quanto com os CI e IP, os quais apresentaram 100 % de indução da peroxidação lipídica. Portanto, FR_N não foi capaz de inibir a peroxidação lipídica como as outras formulações. Isso pode ser explicado pela presença de compostos surfactantes (polisorbato 80) em FR_N, que devido ao seu caráter anfifílico reagem com grupamentos lipídicos causando modificações estruturais e favorecendo a peroxidação lipídica. Esses agentes surfactantes são provenientes do processo de preparo das NLSs, os quais permanecem na dispersão final e, conseqüentemente, passam a fazer parte da formulação, uma vez que os excipientes são apenas adicionados na dispersão de NLSs.

A peroxidação lipídica é o processo pelo qual as espécies reativas de oxigênio agredem os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídeos das membranas das células, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares. As ações deletérias dos peróxidos lipídicos causam a ruptura das membranas celulares, mutações do DNA, oxidação dos lipídios insaturados e formação de produtos tóxicos (MOURE et al., 2001).

Em relação à capacidade das demais formulações de diminuírem a peroxidação lipídica induzida pela radiação UVB se deve a proteção dos filtros solares por absorção e pela ação reflexiva das MLSs e NLSs atuando como barreiras físicas. E possivelmente a atividade antioxidante do flavonóide rutina presente na pele.

Figura 63. Indução da peroxidação lipídica pela radiação UVB (500 mJ/cm²) após 4 horas da exposição a de radiação UVB em pele humana. Onde: (CNI) controle não irradiado, (CI) controle irradiado, (IP) pele irradiada tratada com formulação placebo, (IFR) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rutina, (IF_MR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT livre e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (IR) pele irradiada tratada com formulação contendo rutina, (IR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina. Os resultados representam a média da quaduplicata (n=2) ± epm. Valores acompanhados por letras diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA fator único, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

4.23. Avaliação da formação metaloproteínas totais em pele humana tratadas com formulação por 4 horas após a radiação UVB

A dose de radiação usada nesse estudo foi capaz de induzir a produção de metaloproteínas após quatro horas de exposição à radiação UVB (Figura 64). As MMPs são capazes de digerir as proteínas da matriz extracelular promovendo remodelação, degradação ou modificação da matriz extracelular (VIOUX-

CHAGNOLEAU, et al, 2006). O controle irradiado (CI) e a IP (irradiado placebo) apresentaram valores de $13,89 \pm 1,3$ e $14,99 \pm 1,9$ ng de MMP/ng de proteína sendo significativamente semelhantes. Por outro lado, as amostras tratadas com as formulações contendo ativos mostraram concentrações de MMPs semelhantes ao controle não irradiado (CNI). Os valores variaram de $3,4 \pm 0,9$ (IFR) a $6,3 \pm 1,9$ ng de MMP/ng de proteína (IR). Portanto, todas as formulações foram capazes de evitar a formação de MMPs nas peles irradiadas a 500 mJ/cm^2 .

Figura 64. Indução da MMPs pela radiação UVB (500 mJ/cm^2) após 4 horas da exposição a de radiação UVB em pele humana. (CNI) controle não irradiado, (CI) controle irradiado, (IP) pele irradiada tratada com formulação placebo, (IFR) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares (B-3, AVO e OCT) e rutina, (IF_MR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo filtros solares microencapsulados (B-3 e AVO), OCT livre e nanopartículas lipídicas sólidas de rutina, (IR) pele irradiada tratada com formulação contendo rutina, (IR_N) pele irradiada tratada com formulação contendo nanopartículas lipídicas sólidas de rutina. Os resultados representam a média da quaduplicata ($n=2$) $\pm$ epm. Valores acompanhados por letras

diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA fator único, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- ✓ Na primeira etapa foi possível produzir MLSs contendo os filtros solares benzofenona-3 e avobenzona com características adequadas para aplicação em formulações tópicas;
- ✓ As MLSs contendo B-3 apresentaram baixa citotoxicidade e alta fotoestabilidade em linhagens L929 de cultura de fibroblastos mostrando seu potencial de uso como um produto seguro;
- ✓ Os parâmetros avaliados do comportamento reológico das formulações contendo MLSs de cera de carnaúba ou cera de abelha contendo B-3 mostraram que as MLSs de cera de carnaúba foi estável o que não aconteceu com a formulação contendo cera de abelha;
- ✓ A formulação contendo MLSs de cera de carnaúba foi capaz de diminuir a penetração da B-3 em pele de porco;
- ✓ Em relação às MLSs contendo AVO pode-se constatar que as MLS_{OT} de avobenzona em associação com a rutina foi capaz de aumentar a fotoestabilidade desse filtro solar após a radiação UVA;
- ✓ Nos estudos de fotoproteção ambas as formulações contendo MLSs de benzofenona-3 e avobenzona foram capazes de proteger a viabilidade celular de fibroblastos de rato L929 contra a radiação UVA/UVB e UVA, respectivamente, mantendo a eficácia desses filtros solares quando comparadas a formulação contendo apenas filtros solares livres;
- ✓ Os fatores estudados no processo de obtenção das NLSs de rutina influenciaram o tamanho médio de partícula (117,2 a 440,5 nm), índice de polispersividade (0,062 a 0,494) e eficiência de encapsulação (97,4 a 99,3 %);

- ✓ Uma otimização da produção NLSs contendo rutina, usando o método da desejabilidade, promoveu condições ótimas e proporcionaram a obtenção de NLSs com tamanho de $74,22 \pm 2,77$ nm, índice de polispersividade de $0,161 \pm 0,34$ e eficiência de encapsulação de $98,90 \pm 0,25$ %;
- ✓ As NLSs contendo rutina mostraram serem capazes de proteger a viabilidade celular de fibroblastos de ratos L929 irradiados com radiação UVA e UVB.
- ✓ Quanto à eficácia fotoquimiopreventiva da formulação tópica contendo os filtros solares B-3 e AVO microencapsulados em associação com filtro solar não encapsulado OCT e nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina em pele humana e pele reconstruída expostos a UVB evitou a formação de células apoptóticas, caspase-3, CPDs e metaloproteinases e diminuiu consideravelmente a peroxidação lipídica;
- ✓ O processo tecnológico de microencapsulação e nanoencapsulação dos ativos avaliados mostrou ser eficaz, não comprometendo as propriedades de fotoproteção dos filtros solares e rutina, apresentando resultados similares ou melhores do que as formulações contendo os ativos na forma livre;
- ✓ Portanto, o desenvolvimento de formulações contendo ativos microencapsulados e nanoencapsulados é uma alternativa interessante para o emprego em produtos comerciais para proteção solar, por diminuir as características indesejáveis como penetração e instabilidade, melhorando as propriedades fotoprotetoras e evitando a necessidade de desenvolver novos compostos com propriedades fotoprotetoras.

Referências

REFERÊNCIAS

ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; PATTARINO, F.; RODRIGUEZ, L. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 348-357, 2008.

ALBERTINI, B; MEZZENA, M.; PASSERINI, N.; RODRIGUEZ,; LSCALIA, S. Evaluation of spray congealing as technique for the preparation of highly loaded solid lipid microparticles containing the sunscreen agent, Avobenzone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 2759-2768, 2009.

AMIRI-RIGI, A.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MOHAMMADI, M. Spray drying of low-phenylalanine skim milk: optimisation of process conditions for improving solubility and particle size, **International Journal of Food Science & Technology**, 47, 495-503, 2012,

ARAUJO, R. R.; TEIXEIRA, C. C. C.; FREITAS, L. A. P. The Preparation of Ternary Solid Dispersions of an Herbal Drug via Spray Drying of Liquid Feed. **Drying Technology**, v. 28 (3), p. 412-421, 2010.

ASIKAINEN, T. M.; HUANG, T. T.; TASKINEN, E.; LEVONEN, A. L.; CARLSON, E.; LAPATTO, R.; EPSTEIN, C. J.; RAIVIO, K. O. Increased sensitivity of homozygous *Sod2* mutant mice to oxygen toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32 (2), p. 175-186, 2002.

BABY, A. R., HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A., SARRUF, F. D., TAVANTE-JÚNIOR, C. R. PINTO, C. A. S. O., ZAGUE, V., ARÊAS, E. P. G., KANEKOI, T. M., VELASCO, M. V. R. Stability and in vitro penetration study of rutin incorporated in a

cosmetic emulsion through an alternative model biomembrane. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**. v.44 (2), 2008.

BERNERD, F.; ASSELINEAU, D. An organotypic model of skin to study photodamage and photoprotection *in vitro*. *J Am Acad Dermatol*, S155-S159, 2008.

BRENNAN, M.; BHATTI, H.; NERUSU, K.C; BHAGAVATHULA, N.; KANG, S.; FISHER, G.J.; VARANI, J.; VOORHEES, J.J. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. **Photochemistry and Photobiology**, Oxfor, v. 78 (1), p.43-48, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Brasília, 2003.

CALAFAT, A. M.; WONG, L-Y.; YE, X.; REIDY, J. A.; NEEDHAM, L. L. Concentrations of the Sunscreen Agent Benzophenone-3 in Residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, (7), 2008.

CROCE, P.; 1999. **Vivisection or Science? An investigation into testing drugs and safeguarding health**. New York: Zed Books.

CROSS, C. E.; VIIET, A.; LOUIE S.; THIELE, J. J.; HALLIWELL B. Oxidative stress and antioxidants at biosurfaces: plants, skin, and respiratory tract surfaces. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, (5), p. 1241-1251, 1998.

CROTEAU, D.L.; BOHR, V.A. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. **Journal Biology Chemistry**, v. 272 (41), p. 25409-25412, 1997.

DI MAMBRO, V. M.; FONSECA M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2005; 37: 287-295.

EMAS, M.; NYQVIST, H. Methods of studying aging and stabilization of spray congealing solid dispersions with carnauba wax. I. Microcalorimetric investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v, 197, p. 117-127, 2000.

F.D.A. United States of America Department of Health and Human Services. In: Guidance Documents, Guidance for Industry: SUPAC-SS Nonsterile Semisolid Dosage Forms. Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, manufacturing, and controls; In vitro Release Testing and In vivo Bioequivalence Documentation, 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov>.

FÉRES, C. A. O.; MADALOSSO, R. C.; ROCHA, O. A.; LEITE, J. P. V. GUIMARÃES, T. M. D. P.; TOLEDO, V. P. P. TAGLIATI, C. A. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphanthera mollis* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, (3), p. 450–456, 2006.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDAO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, v. 597, (2), 179-186, 2007.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153 -158, jan./fev. 2007.

GAN, CY.; MANAF, N. HJ.; A.; LATIFF, A. A.. Optimization of alcohol insoluble polysaccharides (AIPS) extraction from the *Parkia speciosa* pod using response surface methodology (RSM). **Carbohydrate polymers**, v. 79, p. 825-831, 2010.

GASPAR L. R., MAIA, CAMPOS P. M. B. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal Pharmaceutics**, v. 250, 35-44, 2003.

GAVINI, E.; HEGGE, AB.; RASSU, G.; SANNA, V.; TESTA, C.; PIRISINO, G.; KARLSEN, J.; GIUNCHEDI, P. Nasal administration of Carbamazepine using chitosan microspheres: In vitro/in vivo studies. **International Journal Pharmaceutics**, v. 307, p. 9-15, 2006.

GÉLIS, C.; GIRARD, S.; MAVON, A.; DELVERDIER, M.; PAILLOUS, N.; VICENDO, P. Assessment of the skin photoprotective capacities of an organo-mineral broad-spectrum sunblock on two ex vivo skin models. **Photodermatol Photoimmunol Photomedicine**, v. 3, 242–253, 2003.

GOMAA, Y. A.; DARWISH, I. A.; BORAEI, N. A.; EL-KHORDAGUI, L. K. Formulation of wax oxybenzone microparticles using a factorial approach. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, (7), p. 628-639, 2010.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; e COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30 (1), p. 206-213, 2007.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; e COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30 (1), p. 206-213, 2007.

HANSO, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v 41, (8), p. 1205–1212, 2006.

ILIC, I.; DREU, R.; BURJAK, M.; HOMAR, M.; KERC, J.; SRCIC, S. Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology.

International Journal Pharmaceutics, v. 381, p. 176-83, 2009.

INAL, M.E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, Amsterdam, v. 305, p. 75-80, 2001.

JANJUA, N. R., MONGENSEN, B., ANDERSSON A. M., PETERSEN, J. H., HENRIKSEN, M., SKAKKEBAEK, N. E., WULF, H. C. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl methoxycinnamate, and 3-(4-methylbenzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. **The journal of investigative dermatology**, v. 123, p.57-61, 2004.

JOHN, P. W.M.; **Statistical Design and Analysis of Experiments**. New York: The Macmillan Company, 1971, 204-208p.

KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine**. 2010; 6: 753-759.

KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v. 148, p.149-157, 2000.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H.; PITTELKOW, M. MALLET, J. D.; ROCHETTE, P. J. Photoprotection. The Wavelength-dependent ultraviolet induction of cyclobutane pyrimidine dimers in the human córnea. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 2013.

LEONARDI, G. R., GASPAR, L. R., MAIA CAMPOS P. M. B. G. Estudo de variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas

A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, 563-569, 2002.

MAHNS, A.; WOLBER, R.; STÄB, F.; KLOTZ, L-O.; SIES, H. Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis. **Photochemistry Photobiology Science**, v. 3, 257 – 262, 2004.

MALLET, J. D.; ROCHETTE, P. J. Wavelength-dependent ultraviolet induction of cyclobutane pyrimidine dimers in the human córnea, **Photochemical & Photobiological Sciences**,

MARQUELE-OLIVEIRA, F. **Desenvolvimento de formulações tópicos fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo***. Ribeirão Preto: Doutorado (Tese). Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

MARTINS, R.M., SIQUEIRA, S., FREITAS, L.A.P. Spray congealing of pharmaceuticals: study on production of solid dispersions using Box-Behnken design. **Drying. Technology**, v. 30, 935-945, 2012.

MARTINS, R. M.; SIQUEIRA, S.; MACHADO, M. O; FREITAS, L. A. P. The effect of homogenization method on the properties of carbamazepine microparticles prepared by spray congealing. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, (7), 692-700, 2013.

MARTINS, R. R.; PEREIRA, S. V.; SIQUEIRA, S.; SALOMÃO, W. F.; FREITAS, L. A. P. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. **Food Research International**, v. 50, 657-663 2013.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJO, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

NASSIMI M., SCHLEH, C., LAUENSTEIN, H.D., HUSSEIN, R., HOYMAN, H.G., KOCH, W., POHLMANN, G., KRUG, N., SEWALD, K., RITTINGHAUSEN, S., BRAUN, A., MÜLLER-GOYMANN, C. A toxicological evaluation of inhaled solid lipid nanoparticles used as a potential drug delivery system for the lung. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 75, 107–116, 2010.

NATH, A.; CHATTOPADHYAY. P.K. Optimization of oven toasting for improving crispness and other quality attributes of ready to eat potato-soy snack using response surface methodology, *Journal of Food Engineering* 2007, 80, 1282–1292.

NETZLAFF, F.; LEHR, C. M.; WERTZ, P.W.; SCHAEFER, U.F. The human epidermis models EpiSkin[®], SkinEthic[®] and EpiDerm[®]: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 60, p. 167-178, 2005.

NGUYEN H. M., HWANG, I-C., Park, J-W., Park, H-J. Photoprotection for deltamethrin using chitosan-coated beeswax solid lipid nanoparticles. *Pest Management Science*, 68, 1062–1068, 2012.

NISHIGORI, C. Cellular aspects of photocarcinogenesis, **Photochemical & Photobiological Science**, v. 5, p. 208 – 214, 2006.

OHKAWA, H.; OSHINI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytica chimica**, Amsterdam, v. 95, p. 351-388, 1979.

OLIVEIRA, F. M.; FONSECA, Y. M.; FONSECA, M. J. V.; Desenvolvimento de formulações tópicas antioxidantes. *Revista de Cosméticos e Tecnologia Cosmetics & Toiletries*, v. 20 (4), p. 64-68, 2008.

OZYAZICI, M.; GOKCE, E. H.; ERTAN, G. Release and diffusional modeling of metronidazole lipid matrices. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006; 63: 331-339.

PAGLIARUSSI, R. S.; BASTOS, J. K.; FREITAS, L. A. P. Fluid bed drying of Guarana (*Paullinia cupana* HBK.) extract: effect of process factors on caffeine content. *AAPS PharmaSciTech*. 7 (2), article - 54, 2006.

PARIS, C.; LHIAUBET-VALLET, V.; JIMÉNEZ, O.; TRULLAS, C.; MIRANDA, M. A. A Blocked Diketo Form of Avobenzone: Photostability, Photosensitizing properties and Triplet Quenching by a Triazine-derived UVB-filter. *Photochemical and Photobiology*, 85 178–184, 2009.

PASSERINI, N.; ALBERTINI, B.; PERISSUTI, B.; RODRIGUEZ, L. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 318, p. 92-102, 2006.

PASSERINI, N.; GAVINI, E.; ALBERTINI, B.; RASSU, G.; SABATINO, M. D.; SANNA, V.; GIUNCHEDI, P.; RODRIGUEZ, L. Evaluation solid microparticles produced by spray congealing for topical application of econazole nitrate. *Journal of pharmacy and pharmacology*. v.61, p. 559-567, 2009.

PIZZOFERRATO, A.; CIAPETTI, G.; STEA, S.; CENNI, E.; ARCIOLA, C. R. Cell culture methods for testing Biocompatibility. *Clinical Materials*, v. 15, 3, 173-180, 1994.

- .PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. *Toxicological Sciences*. v.43, n.2, p.86-101, 1998.
- RAMOS, M. F. S.; SANTOS, E. P.; ORTIZ, G. M. D.; Photoprotective activity and preliminary studies on photodegradation of *Aloe* spp. and *Hamamelis virginiana* extracts. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 24 (2), p.179-187, 2003.
- RANGEL, V. L. B. I. & CORRÊA, M. C.; Fotoproteção. *Cosmetics & Toiletries*, v. 14, p. 88-95, 2002.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, 3, p. 1125 – 1131, 2008.
- RODRIGUES, M. R. A.; CAMARÃO, E. B.; DOS SANTOS, J. G.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V.; The effects of temperature and pressure of the characteristics of the extracts from high-pressure CO₂ extraction of *Majorana hortensis* Moench. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n.2. p. 453-456. 2003.
- RODRIGUES, M. R. A.; CAMARÃO, E. B.; DOS SANTOS, J. G.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V.; The effects of temperature and pressure of the characteristics of the extracts from high-pressure CO₂ extraction of *Majorana hortensis* Moench. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n.2. p. 453-456. 2003.
- SARAN, M.; BORS, W. Radical reactions *in vivo* – an overview. **Radiativity Environment Biophysics**., v. 29, p. 249-262, 1990.
- SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination butyl methoxydibenzoylmethane-octyl methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 273-278, 2010.

SCALIA, S.; MEZZENA, M., IANNUCELLI, V. Influence of solid lipid microparticle carriers on skin penetration of the sunscreen agent, 4- methylbenzylidene camphor. **Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1621-1627, 2007.

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

SCHWARZ, C., MEHNERT, W., LUCKS, J.S., MILLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *Journal of Controlled Release*, 30, 83-96, 1994.

SHAATH, N. A.; **The Encyclopedia of Ultraviolet Filters**. Ed: Allured Publishing Corporation, New York, U.S., 2007.

SHINDO, Y.; WITT, E.; HAN, D.; PACKER, L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **The Journal of Investigative Dermatology**, Cambridge, v. 102, p. 469-475, 1994.

SIMON, F.; BERGERON, D.; LAROCHELLE, S.; LOPEZ-VALLE, C. A.; GENEST, H.; ARMOUR, A.; MOULIN, V. J. Enhanced secretion of TIMP-1 by human hypertrophic scar keratinocytes could contribute to fibrosis. **Burns**, v. 38, p. 421–427, 2012.

STEENVOORDEN, D. P. T.; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M. J. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **Journal of Photochemistry and photobiology**, v. 41 (1-2), p. 1-10, 1997.

TIWARI, B.K.; JAGANMOHAN, R.; VENKATACHALAPATHY, N.; ANAND, M. T.; SURABI, A.; ALAGUSUNDARAM, K. Optimisation of hydrothermal treatment for dehulling pigeon pea. **Food Research International**, v. 43, p. 496-500, 2010.

- TSAL, K-D.; LIN, J-C.; YANG, S-M; TSENG, M-J; HSU, J-D.; LEE, Y-J.; CHERNG, J-M. Curcumin Protects against UVB-Induced Skin Cancers in SKH-1 Hairless Mouse: Analysis of Early Molecular Markers in Carcinogenesis, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 1-11, 2012,
- TURSILLI, R.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; SCALIA, S. Solid lipid microparticles containing the sunscreen agent, octyl-dimethylaminobenzoate: Effect of the vehicle. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 483-487, 2007.
- UGAZIO, E., CAVALLI, R. GASCO, M. R. Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). **International journal of pharmaceutics**, v. 241, (2), 341–344, 2002.
- VELASCO, M.; ROBLES V.; SARRUF, F. D.; SALGADO-SANTOS, I. M. N.; HAROUTIOUNIANFILHO, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Broad spectrum bioactive sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v.363, p. 50–57, 2008.
- VICENTINI, F. T. M. C.; SIMI, T. R. M.; DEL CIAMPO, J. O. ; WOLGA, N. O.; PITOL, D. L.; IYOMASA, M. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; FONSECA, M. J. V. Quercetin w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 948-957, 2008.
- VILELA, F. M.; FONSECA, Y. M.; JABOR, J. R.; VICENTINI, F. T.; FONSECA, M. J. V. Effect of ultraviolet filters on skin superoxide dismutase activity in hairless mice after a single dose of ultraviolet radiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 2012; 80: 387-392.
- VILLALOBOS-HERNANDEZ, J. R.; MULLER-GOYMANN, C. C. Novel nanoparticulate carrier system based on carnauba wax and decyloleate for the dispersion

of inorganic sunscreens in aqueous media. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 60 p. 113–122, 2005.

VIOUX-CHAGNOLEAU, C.; LEUJENE, F.; SOK, J.; PIERRARD, C.; MARIONNET, C.; BERNERD, F. Reconstructed human skin: From photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. *Journal of Dermatological Science supplement*, v. 2, S1-S12, 2006.

WANG, H.; KOICHEVAR, I. E. Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF- β biosynthesis and activation in keratinocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 38, p.890-897, 2005.

XU, H.; YAN Y.; LI L.; PENG, S.; QU, T. WANG, B. Ultraviolet B-induced apoptosis of human skin fibroblasts involves activation of caspase-8 and -3 with increased expression of vimentin. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine** v. 26, 198–204, 2008.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, 1660-1666, 2008.