UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento, caracterização, avaliação da estabilidade e da
penetração cutânea de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas
em formulação cosmética

Mariana Mandelli de Almeida

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a Dr^a Maria Valéria Robles Velasco
Co-Orientadora:
Prof^a Dr^a Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Almeida, Mariana Mandelli de
A447de Desenvolvimento, caracterização, avaliação da estabilidade
e da penetração cutânea de nanopartículas de ácido ursólico
incorporadas em formulação cosmética / Mariana Mandelli
de Almeida. -- São Paulo, 2012.
156p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Velasco, Maria Valéria Robles

1. Cosméticos : Tecnologia 2. Surfactante : Cosméticos :
Tecnologia I. T. II. Velasco, Maria Valéria Robles, orientador.

668.55 CDD

Mariana Mandelli de Almeida

Desenvolvimento, caracterização, avaliação da estabilidade e da penetração cutânea de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a Associada Dr^a Maria Valéria Robles Velasco
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

A Deus e aos Espíritos de Luz que me iluminaram e me guiaram até aqui, me dando força, determinação e fé na minha capacidade de realização.

Ao meu pai, Mário, modelo de profissional dedicado e honesto. Pelo amor a nossa família e apoio na realização dos meus sonhos.

À minha mãe, Sônia, pela constante dedicação e amor a nossa família. Por estar sempre presente quando preciso de conselhos e incentivo.

Ao meu amor, Nicolas, por tornar minha vida completa, pelo apoio e carinho.

Agradecimento especial

À Profa. Associada Dra. Maria Valéria Robles Velasco e a Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra pela orientação, contribuição para a minha formação como pesquisadora e pelo apoio à realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À aluna de iniciação científica Juliana Denise Conte, pela grande ajuda na realização deste trabalho de doutorado.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Silva Costa Teixeira e aos pós-doutorandos Dennis e Verônica do Laboratório de Simulação e Controle de Processos - Departamento de Engenharia Química - USP (EPUSP), pela ajuda na realização das medidas das nanopartículas e uso do cromatógrafo à líquido.

À técnica Márcia Aparecida da Silva e a Profa. Associada Dra. Iolanda Midea Cuccovia do Laboratório de Sistema Biomiméticos - Departamento de Bioquímica – Instituto de Química – USP, pelo uso do *Zetasizer*.

A querida Profa. Dra. Vânia Leite e Silva, pela ajuda na orientação e realização do doutorado-sanduíche na Austrália.

Ao Prof. Dr. Michael Roberts e Dr. Jeffrey Grice, pelo aceite e realização do doutorado-sanduíche no *Therapeutics Research Unit – University of Queensland – Brisbane/AUS*, para realização da etapa final de penetração cutânea da tese.

À técnica Jenny Ordonez, a pós-doutoranda Liz Ryan, as estagiárias Julie Poirier, Audrey Colliou, Guillemette Joubert, Marie Neveu, Clara Obispo e Anais pela ajuda e amizade durante o intercâmbio na Austrália.

Ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos, pela ajuda com a análise térmica.

Ao técnico Charles, pelo ajuda no uso do rotaevaporador.

À querida amiga Msc. Cibele Lima pela amizade, apoio e ajuda com as tabelas.

Às colegas e amigas Msc. Joyce Quenca, Msc. Túlia Botelho, Msc. Vanessa Tavares, Msc. Helen Leite, Msc. Carolina Zanolini, Msc. Fernanda Fialho, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos técnicos Edgar Muniz Machado Junior e Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto, pela colaboração e amizade.

À empresa HighChem, em especial a Dra. Vera, pela doação do ácido ursólico.

À empresa Mapric, a amiga Ana Carolina, pela doação das matérias-primas.

À empresa Basf, ao Fábio Ito, pela doação das matérias-primas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro recebido.

A todas as demais pessoas que direta ou indiretamente tornaram a realização deste trabalho possível.

“Vive de tal forma que deixes pegadas luminosas no caminho percorrido, como estrelas apontando o rumo da felicidade e não deixes ninguém afastar-se de ti sem que leve um traço de bondade, ou um sinal de paz da tua vida.”

Joanna de Ângelis

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE QUADROS E TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XII
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
REFERÊNCIAS	5

CAPÍTULO I - DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO LIVRE E EM NANOPARTÍCULAS

RESUMO	8
1 REVISÃO DA LITERATURA	9
1.1 ÁCIDO URSÓLICO – CONSIDERAÇÕES GERAIS	9
1.1.1 CARACTERÍSTICAS DO ÁCIDO URSÓLICO	11
1.1.2 ATIVIDADES DO ÁCIDO URSÓLICO	12
1.2 SISTEMAS NANOPARTICULADOS	14
1.3 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	16
1.4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO	16
1.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	18
1.5.1 ESPECIFICIDADE OU SELETIVIDADE	18
1.5.2 LINEARIDADE	18
1.5.3 PRECISÃO	19
1.5.4 EXATIDÃO	19
1.5.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	19
2 OBJETIVO	19
3 MATERIAL	20
3.1 MATÉRIAS-PRIMAS - (INCI – INTERNATIONAL NOMENCLATURE OF COSMETIC INGREDIENTS) E GRAU DE PUREZA.	20
3.2 PADRÃO DE REFERÊNCIA	20
3.3 SOLVENTES E REAGENTES	20
3.4 APARELHOS, EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	20
4 MÉTODOS	21
4.1 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DO ÁCIDO URSÓLICO	21
4.1.1 CURVA ANALÍTICA	21
4.1.2 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	22
4.1.3 ESPECIFICIDADE	23
4.1.4 PRECISÃO	23
4.1.5 EXATIDÃO – TESTE DE RECUPERAÇÃO	24
4.1.5.1 SOLUÇÃO PADRÃO	24
4.1.5.2 SOLUÇÃO AMOSTRA	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 LINEARIDADE	25
5.2 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	26
5.3 ESPECIFICIDADE	26
5.4 PRECISÃO	28
5.5 EXATIDÃO	28

6 CONCLUSÕES	29
7 REFERÊNCIAS	30

CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO

RESUMO	38
1 REVISÃO DA LITERATURA	39
1.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	39
1.2 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN)	41
1.3 PREPARO DE NANOPARTÍCULAS	43
1.3.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	43
1.3.2 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS	44
1.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	45
1.4.1 TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA	45
1.4.2 POTENCIAL ZETA (ζ)	46
1.4.3 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC), TERMOGRAVIMETRIA (TG) E TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (DTG)	46
2 OBJETIVOS	48
3 MATERIAL	48
3.1 MATÉRIAS-PRIMAS - (<i>INCI – INTERNATIONAL NOMENCLATURE OF COSMETIC INGREDIENTS</i>) E GRAU DE PUREZA.	48
3.2 SOLVENTES E REAGENTES	49
3.3 APARELHOS, EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	49
3.4 FORMULAÇÃO-BASE	50
4 MÉTODOS	51
4.1 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	51
4.2 MATRIZ DE ENSAIOS PARA OBTENÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS	51
4.3 PREPARAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN)	53
4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS	55
4.4.1 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO ÀS NANOPARTÍCULAS	55
4.4.2 TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA E O ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE	55
4.4.3 POTENCIAL ZETA	56
4.4.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC), TERMOGRAVIMETRIA (TG) E TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (DTG)	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS	57
5.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC), TERMOGRAVIMETRIA E TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG)	71
6 CONCLUSÕES	78
7 REFERÊNCIAS	79

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO URSÓLICO EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

RESUMO	85
1 REVISÃO DA LITERATURA	86
1.1 PELE – CONSIDERAÇÕES GERAIS	86
1.2 ENVELHECIMENTO CUTÂNEO	88
1.3 PRODUTOS COSMÉTICOS	89
1.3.1 EMULSÕES	90

1.4 NANOCOSMÉTICOS	91
1.5 ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS	92
2 OBJETIVOS	94
3 MATERIAL	94
3.1 MATÉRIAS-PRIMAS	94
3.2 APARELHOS, EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	95
3.3 FORMULAÇÕES COSMÉTICAS	95
4 MÉTODOS	99
4.1 PREPARO DAS FORMULAÇÕES	99
4.2 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (APE)	99
4.2.1 TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO	99
4.2.2 TESTE DE ESTRESSE TÉRMICO	100
4.3 TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL (TEN)	100
4.3.1 CONDIÇÕES DOS TESTES	100
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
5.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (APE)	102
5.2 TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL (TEN)	103
5.2.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS, VALOR DE PH E DE VISCOSIDADE	103
5.3 VARIAÇÃO DA VISCOSIDADE X TEMPO (FORMULAÇÃO 1)	108
5.4 VARIAÇÃO DA VISCOSIDADE X TEMPO (FORMULAÇÃO 2)	110
5.5 VARIAÇÃO PH X TEMPO (FORMULAÇÃO 1)	112
5.6 VARIAÇÃO PH X TEMPO (FORMULAÇÃO 2)	114
5.7 VARIAÇÃO DA VISCOSIDADE X TEMPO (AUC)	116
5.8 VARIAÇÃO PH X TEMPO (AUC)	118
6 CONCLUSÕES	120
7 REFERÊNCIAS	121

CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO URSÓLICO EM FORMULAÇÃO COSMÉTICA 128

RESUMO	129
1 REVISÃO DA LITERATURA	130
1.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA	130
1.2 PENETRAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO	131
1.2.1 ROTAS PARA PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS	132
1.2.1.1 ROTA TRANSEPIDÉRMICA	133
1.2.1.2 ROTA FOLICULAR	135
1.3 FATORES FÍSICO-QUÍMICOS DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA	137
1.4 NANOTECNOLOGIA NA PENETRAÇÃO CUTÂNEA	138
2 OBJETIVOS	139
3 MATERIAL	139
3.1 MATÉRIAS-PRIMAS - (<i>INCI – INTERNATIONAL NOMENCLATURE OF COSMETIC INGREDIENTS</i>) E GRAU DE PUREZA.	139
3.2 PADRÃO DE REFERÊNCIA	140
3.3 SOLVENTES E REAGENTES	140
3.4 APARELHOS, EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	141
4 MÉTODOS	141
4.1 PENETRAÇÃO CUTÂNEA – PROCEDIMENTO	141
4.2 ANÁLISE DO AU NA PELE	142
4.3 EXTRAÇÃO DO AU	143
4.3.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	143

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	144
5.1 PENETRAÇÃO CUTÂNEA	144
5.1.1 EXTRAÇÃO DO AU	147
5.1.1.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	147
6 CONCLUSÕES	149
7 REFERÊNCIAS	150
<u>ANEXO</u>	<u>156</u>

RESUMO

A indústria cosmética tem investido em tecnologias inovadoras na busca de maior eficácia de seus produtos. A Nanotecnologia tem sido utilizada com o propósito de desenvolver formulações de menor risco de irritação cutânea e que promovam a liberação modificada do componente ativo. Este trabalho teve como objetivo geral desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética. Nesta pesquisa, para determinar a eficiência de encapsulação do AU (ácido ursólico) livre e nas nanopartículas poliméricas, foi validada uma metodologia que empregou a CLAE (Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência) e os resultados obtidos indicaram boa reprodutibilidade do método e concordância entre os resultados obtidos, sendo a metodologia empregada na avaliação do AU livre e nanoparticulado. As nanopartículas contendo AU apresentaram características de potencial estabilidade química, obtendo eficiência de encapsulação de 80% de AU para as nanopartículas poliméricas e 100% para os carreadores lipídicos nanoestruturados. A caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas contendo AU foi realizada determinando-se diâmetro da partícula ($353,4 \pm 1,4$ nm), índice de polidispersividade ($0,106 \pm 0,008$) e potencial zeta ($-35,6 \pm 1,2$ mV). Os resultados obtidos para os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo AU nas formulações foram: tamanho de partícula entre $125,3 \pm 40,4$ e $237,4 \pm 62,7$ nm, índice de polidispersividade entre 0,01 e 0,38 e potencial zeta entre $-20,5 \pm 9,2$ e $-50,7 \pm 9,5$ mV. Os resultados obtidos indicaram estabilidade das nanopartículas desenvolvidas. O resultado relativo ao planejamento fatorial para otimização dos agentes tensoativos revelou modelo matemático de segunda ordem para a previsão de valores de potencial zeta em função das concentrações de SDS. Dessa forma, foi possível a preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo reduzida concentração de SDS e valor de potencial zeta menor que -40 mV. Por meio das técnicas de TG/DTG e DSC, observou-se que o AU se manteve estável nas diversas formas de apresentação. Formulações cosméticas contendo ácido ursólico livre (AUL), e incorporados a nanopartículas poliméricas (AUE) e carreadores lipídicos nanoestruturados (AUC) foram submetidas a Avaliação Preliminar da Estabilidade e ao Teste Estabilidade Normal. Observou-se que o AUC obteve melhor estabilidade físico-química em comparação ao AUL tanto na variação de viscosidade como na variação do pH, além de ter obtido melhor estabilidade em relação a AUE na variação de pH x tempo. A partir dos resultados obtidos, a Formulação 2 foi selecionada para o teste de penetração cutânea. A avaliação da penetração cutânea *in vitro* do AU não apresentou tendência para favorecer o transporte da substância ativa para a fase receptora. A maior concentração de AU na pele foi obtida das amostras de AU livre + emulsão (65%) seguidas das amostras de CLN + emulsão (33%) e das NP + emulsão (20%). A penetração cutânea obteve resultado ideal, pois, por se tratar de nanopartículas contendo um componente ativo antioxidante na superfície da pele, se associado a um filtro solar, atuaria contra os radicais livres resultando na maior proteção contra a radiação ultravioleta.

Palavras-chave: ácido ursólico, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanopartículas poliméricas, planejamento experimental, estudo termoanalítico, penetração cutânea

ABSTRACT

The cosmetic industry has invested in innovative technologies in search of greater effectiveness of their products. Nanotechnology has been used with this propose to reduce the risk of skin irritation by promoting the modified release of the active component. This study had as main objective development, characterization and evaluation of ursolic acid nanoparticles incorporated in cosmetic formulation. In this research, to determine the entrapment efficiency of UA (ursolic acid) free and in polymeric nanoparticles, a methodology was validated using HPLC (high performance liquid chromatography) and the results indicated good reproducibility of the method and agreement between the results, the methodology employed could be assessed in the evaluation of free and UA nanoparticles. Nanoparticles containing UA showed characteristics of potential chemical stability obtaining entrapment efficiency of 80% for UA polymer nanoparticles and 100% for the nanostructured lipid carriers. The physicochemical characterization of polymeric nanoparticles containing UA was accomplished by determining the particle diameter (353.4 ± 1.4 nm), polydispersity index (0.106 ± 0.008) and zeta potential (-35.6 ± 1.2 mV). The results obtained for the nanostructured lipid carriers containing UA formulations were: particle size between 125.3 ± 40.4 and 237.4 ± 62.7 nm, polydispersity index between 0.01 and 0.38, and zeta potential between -20.5 ± 9.2 and -50.7 ± 9.5 mV. The results indicated stability of the developed nanoparticles. The result for the factorial design for optimization of surfactant revealed a quadratic effect of the independent variable sodium dodecyl sulfate in zeta potential. Thus, it was possible to prepare nanostructured lipid carrier containing reduced concentrations of SDS and zeta potential value of less than -40 mV. By means of the techniques of TG/DTG and DSC, was observed that the UA remained stable. Cosmetic formulations containing free ursolic acid (AUL) and incorporated in polymeric nanoparticles (AUE) and nanostructured lipid carriers (AUC) were submitted to Preliminary Assessment Stability and Normal Stability Test. It was observed that the AUC obtained better physical and chemical stability compared to AUL on the variation of viscosity as on the pH variation, besides having obtained a higher stability compared to the AUE in the pH variation versus time. From the results obtained Formulation 2 was selected for the realization of the skin penetration test. The evaluation of the *in vitro* penetration of UA showed that ursolic acid remained on the skin surface. The dermal penetration showed no tendency to favor the transport of active substance to the receptor phase. The highest concentration of UA in the skin samples was obtained UA + free emulsion (65%) followed samples NLC + emulsion (33%) and PN + emulsion (20%). The skin penetration achieved optimal outcome because, as it is nanoparticles containing antioxidant active compound on the skin surface, if associated with a solar filter would act against free radicals resulting in greater protection against ultraviolet radiation.

Keywords: ursolic acid, nanostructured lipid carriers, polymeric nanoparticles, experimental design, thermal analytical study, skin penetration

LISTA DE FIGURAS

<u>CAPÍTULO I - DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO LIVRE E EM NANOPARTÍCULAS</u>	7
Figura 1. Fórmula estrutural do Isopreno	9
Figura 2. Formação de terpenos e ciclização do esqualeno	10
Figura 3. Fórmula estrutural do ácido ursólico e do ácido oleanólico	17
Figura 4. Curva analítica do ácido ursólico padrão de referência secundário, pureza de 99%. Condições cromatográficas: coluna RP-18 (5 µm); fase móvel metanol:solução aquosa de H ₃ PO ₄ 0,1% v/v (88:12); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 30,0 µL; detecção 210 nm; temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C)	25
Figura 5. Cromatogramas referentes: (A) Padrão de referência secundário de ácido ursólico, pureza de 99% (10,0 µg/mL) (B) Amostra de ácido ursólico (10,0 µg/mL) (C) Nanopartícula polimérica de ácido ursólico. Condições cromatográficas: coluna RP-18 (5 µm); fase móvel metanol:solução aquosa de H ₃ PO ₄ 0,1% v/v (88:12); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 30,0 µL; detecção 210 nm; temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C)	27
<u>CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO</u>	37
Figura 1. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas	39
Figura 2. Carreadores tradicionais versus Nanopartículas lipídicas	41
Figura 3. NLS: tendência a formar cristais perfeitos e expulsão do ativo	42
Figura 4. Representação esquemática do método empregado na preparação de nanocápsulas baseado na precipitação do polímero pré-formado	43
Figura 5. Processo de produção de nanopartículas lipídicas usando a homogeneização à quente e à frio	44
Figura 6. Nanopartículas poliméricas	57
Figura 7. Carreadores lipídicos nanoestruturados	57
Figura 8. Gráfico do potencial zeta representa distribuição unimodal dos carreadores lipídicos nanoestruturados	60
Figura 9. Gráfico de série temporal para os valores de potencial zeta das	62

nanopartículas no estudo para a otimização das concentrações dos agentes tensoativos

- Figura 10.** Gráfico de resíduos relativos à análise de variância a) gráfico de probabilidade normal; b) dispersão dos resíduos; c) histograma; d) resíduos versus a ordem de observação 62
- Figura 11.** Gráfico de superfície de resposta do potencial zeta em função do SDS e do Lutrol® na otimização dos agentes tensoativos utilizados na preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo ácido ursólico 68
- Figura 12.** Gráfico de contorno do potencial zeta em função do SDS e do Lutrol® na otimização dos agentes tensoativos utilizados na preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo ácido ursólico 68
- Figura 13.** Otimização das concentrações de SDS e de Lutrol® na preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo ácido ursólico utilizando a função “desejo” (Formulação 1: 0,80% p/v de SDS e 4,54% p/v de Lutrol) 69
- Figura 14.** Otimização das concentrações de SDS e de Lutrol® na preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo ácido ursólico utilizando a função “desejo” (Formulação 2: 0,50% p/v de SDS e 4,00% p/v de Lutrol) 70
- Figura 15.** Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra de ácido ursólico livre 72
- Figura 16.** Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra do ácido ursólico incorporado na formulação-base (emulsão) 73
- Figura 17.** Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra de ácido ursólico em nanopartícula polimérica 74
- Figura 18.** Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra de ácido ursólico em nanopartícula polimérica na formulação-base 75
- Figura 19.** Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra do ácido ursólico em carreador lipídico nanoestruturado 76
- Figura 20.** Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra do ácido ursólico em carreador lipídico nanoestruturado na formulação-base 76

<u>CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO URSÓLICO EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS</u>	84
Figura 1. Camadas da pele humana	86
Figura 2. Formulações no Teste de Estabilidade Preliminar no intervalo de temperatura controlada entre 40 – 60°C, com progressão de elevação de 5°C/30 minutos: a) F1 a 4= Formulação 1 a 4, F1 a 4n= Formulação 1 a 4 com ácido ursólico 1% p/p em nanopartículas poliméricas	103
Figura 3. Formulações no Teste de Estabilidade Normal: a) Exposição à luz solar indireta 25,0 ± 2,0°C; b) temperatura ambiente 25,0 ± 2,0°C; c) refrigerador a 5,0 ± 2,0°C e d) estufa a 45,0 ± 2,0°C. <i>Legenda:</i> AUE= Ácido ursólico em nanopartículas poliméricas, AUL= Ácido ursólico livre, F1= Formulação 1, F2= Formulação 2	104
Figura 4. Gráfico da <i>Formulação 1</i> com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a 5,0 ± 2,0°C; temperatura ambiente a 25,0 ± 2,0°C; estufa a 45,0 ± 2,0°C e exposição a luz solar indireta 25,0 ± 2,0°C	108
Figura 5. Gráfico da <i>Formulação 1</i> com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a 5,0 ± 2,0°C; temperatura ambiente a 25,0 ± 2,0°C; estufa a 45,0 ± 2,0°C e exposição a luz solar indireta 25,0 ± 2,0°C	108
Figura 6. Comparação entre as Figuras 4 e 5 das condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a 5,0 ± 2,0°C; temperatura ambiente a 25,0 ± 2,0°C; estufa a 45,0 ± 2,0°C e exposição a luz solar indireta 25,0 ± 2,0°C da <i>Formulação 1</i> com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE)	109
Figura 7. Gráfico da <i>Formulação 2</i> com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a 5,0 ± 2,0°C; temperatura ambiente a 25,0 ± 2,0°C; estufa a 45,0 ± 2,0°C e exposição a luz solar indireta 25,0 ± 2,0°C	110
Figura 8. Gráfico da <i>Formulação 2</i> com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a 5,0 ± 2,0°C, temperatura ambiente a 25,0 ± 2,0°C;	110

estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 9. Comparação entre as Figuras 7 e 8 das condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE) 111

Figura 10. Gráfico da *Formulação 1* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ 112

Figura 11. Gráfico da *Formulação 1* com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartículas polimérica (AUE) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ 112

Figura 12. Comparação entre as Figuras 10 e 11 das condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ da *Formulação 1* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE) 113

Figura 13. Gráficos da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ 114

Figura 14. Gráficos da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ 114

Figura 15. Comparação entre as Figuras 13 e 14 das condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE) 115

Figura 16. Gráfico da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma 116

livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 17. Gráfico da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma de 116
carreador lipídico nanoestruturado (AUC) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 18. Comparação entre as Figuras 16 e 17 das condições do Teste de 117
Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de carreador lipídico nanoestruturado (AUC)

Figura 19. Gráfico da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma 118
livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 20. Gráfico da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma de 118
carreador lipídico nanoestruturado (AUC) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 21. Comparação entre as Figuras 19 e 20 das condições do Teste de 119
Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de carreador lipídico nanoestruturado (AUC)

CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE 128 **NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO URSÓLICO EM FORMULAÇÃO** **COSMÉTICA**

Figura 1. Diagrama de vias de penetração do fármaco na pele. A via 132
intercelular (1), via transcelular (2) e através dos folículos pilosos com glândulas sebáceas associados (3)

Figura 2. Representação esquemática do "tijolo e argamassa" modelo de 134

estrato córneo, a organização da bicamada lipídica e duas possíveis vias de penetração da droga através do estrato córneo, via transcelular ou intercelular

Figura 3. Representação esquemática do efeito do tamanho molecular sobre a penetração de solutos em folículos pilosos 136

Figura 4. Cromatogramas referentes: (A) Padrão de referência secundário de ácido ursólico, pureza de 99% (100,0 µg/mL) (B) Amostra do fluido receptor (4,5 µg/mL) (C) Amostra de solução do TS (D) Amostra de solução da Derme (E) Amostra de solução da Epiderme viável. Condições cromatográficas: coluna C18 150 x 4,60 mm 5 µm; fase móvel acetonitrila:solução aquosa de H₃PO₄ 0,1% v/v (88:12); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 50,0 µL; detecção 210 nm; temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C) 145

Figura 5. Curva analítica do ácido ursólico padrão de referência secundário, pureza de 99%. Condições cromatográficas: coluna C18 150 x 4,60 mm 5 µm; fase móvel acetonitrila:solução aquosa de H₃PO₄ 0,1% v/v (88:12); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 50,0 µL; detecção 210 nm; temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C) 148

LISTA DE QUADROS E TABELAS

<u>CAPÍTULO I - DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO LIVRE E EM NANOPARTÍCULAS</u>	7
Quadro 1. Características físico-químicas do ácido ursólico	12
Tabela 1. Cálculo do limite de detecção e de quantificação do método de cromatografia à líquido de alta eficiência para o ácido ursólico	26
Tabela 2 - Precisão obtida na análise do ácido ursólico usando o método de cromatografia à líquido de alta eficiência	28
Tabela 3 - Resultado obtido do teste de recuperação realizado na análise do ácido ursólico	29
 <u>CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO</u>	 37
Tabela 1. Componentes da <i>Formulação-Base</i>	50
Tabela 2. Matriz de ensaios para a obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados	52
Tabela 3. Formulação dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os agentes tensoativos e o ácido ursólico	54
Tabela 4. Diâmetro médio da partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas poliméricas contendo ácido ursólico ($\pm DP$, $n=3$)	58
Tabela 5. Tamanho e potencial zeta das nanoestruturas obtidas ($n=3$) nas preparações contendo o ácido ursólico, lipídeos, tensoativos e água	59
Tabela 6. Teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação da influência dos agentes tensoativos no potencial zeta de carreadores lipí contendo ácido ursólico	64
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para testar a significância da regressão na avaliação da influência dos agentes tensoativos no potencial zeta de nanocarreadores lipídicos contendo ácido ursólico	65
Tabela 8. Teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação da influência dos agentes tensoativos SDS e Lutrol [®] no potencial zeta de carreadores lipídeos	66

contendo ácido ursólico

Tabela 9. Análise de variância do modelo simplificado (ANOVA) para testar a significância da regressão na avaliação da influência dos agentes tensoativos SDS e Lutrol® no potencial zeta de nanocarreadores lipídicos contendo ácido ursólico	67
Tabela 10. Valores de potencial zeta (mV) previstos pelo modelo e obtidos para as Formulações otimizadas 1 e 2	71
Tabela 11. Dados de Δm das amostras obtidos das curvas TG/DTG	72
Tabela 12. Dados de ΔH , T_{onset} e T_{pico} das amostras obtidos das curvas DSC razão de aquecimento de 10°C/min, intervalo de temperatura de 25 até 600°C, sob atmosfera dinâmica de N ₂	75

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO URSÓLICO EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

Tabela 1. Componentes da <i>Formulação 1</i>	96
Tabela 2. Componentes da <i>Formulação 2</i>	97
Tabela 3. Componentes da <i>Formulação 3</i>	98
Tabela 4. Componentes da <i>Formulação 4</i>	98
Tabela 5 - Avaliação das formulações no estudo da Avaliação Preliminar da Estabilidade (teste de centrifugação e estresse térmico)	102
Tabela 6. Avaliação das características organolépticas, valor de pH e de viscosidade aparente (cP) da <i>Formulação 1</i> contendo ácido ursólico livre (AUL) e ácido ursólico em nanopartículas poliméricas (AUE) durante o Teste de Estabilidade Normal	105
Tabela 7. Avaliação das características organolépticas, valor de pH e de viscosidade aparente (cP) da <i>Formulação 2</i> contendo ácido ursólico livre (AUL) e ácido ursólico em nanopartículas poliméricas (AUE) durante o Teste de Estabilidade Normal	105
Tabela 8. Avaliação das características organolépticas, valor de pH e de viscosidade aparente (cP) da <i>Formulação 2</i> contendo ácido ursólico livre (AUL) e ácido ursólico em carreadores lipídicos nanoestruturados (AUC) durante o Teste de Estabilidade Normal	106

CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO URSÓLICO EM FORMULAÇÃO COSMÉTICA 128

Tabela 1. Áreas e concentrações de AU detectados em cotonetes na superfície da pele 146

Tabela 2. Cálculo do limite de detecção e de quantificação do método de cromatografia à líquido de alta eficiência para o ácido ursólico 148

Tabela 3. Precisão obtida na análise do ácido ursólico usando o método de cromatografia à líquido de alta eficiência 149

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CAPÍTULO I - DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO LIVRE E EM NANOPARTÍCULAS 7

AO – Ácido oleanólico

AU – Ácido ursólico

CG – Cromatografia Gasosa

CG/MS - Cromatografia acoplada a Espectrometria de Massa

CL – Cromatografia Líquida

CLAE – Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência

DMAPP - Dimetilalil difosfato

DPPH - 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

DPR – Desvio padrão relativo

F.M. – Fase móvel

H₃PO₄ – Ácido fosfórico

HPPA - 12-o-hexadecanoil-16-hidroxiforbol-13-acetato

HRMS - Espectrometria de Massa simples de alta resolução

ICH - *International Conference on Harmonization*

INCI – *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

IPP - Isopentenil difosfato

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de Quantificação

MeOH - Metanol

MS/MS - Espectrometria de Massa simples

RP – *Reverse Phase*

TPA - Agente Promotor de Tumor

USP – *The United States Pharmacopeia*

UV – Ultravioleta

CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO 37

(ζ) – Potencial zeta

ΔH – Variação de entalpia

Δm – Variação de massa

CLN – Carreador lipídico nanoestruturado
DP – Desvio padrão
DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG – Termogravimetria Derivada
LEC - Lecitina
LUT - Lutrol®
NLS – Nanopartícula lipídica sólida
PLA – Ácido polilático
PLG - Ácido poliglicólico
PLGA - ácidos poli(lático-co-glicólico)
PεCL - poli-ε-caprolactona
SDS – Dodecil sulfato de sódio
TG - Termogravimetria
T_{onset} – Temperatura de início
T_{pico} – Temperatura do pico
TW - Tween®

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO URSÓLICO EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

84

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APE – Avaliação Preliminar da Estabilidade
AUE – Ácido ursólico nanoparticulado
AUL – Ácido ursólico livre
cP – Viscosidade aparente
EHL - Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo
FA – Fase aquosa
FDA - *Food and Drug Administration*
FO – Fase oleosa
IFSCC - *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists*
L.E. – Levemente esverdeado
OTC - *Over the Counter*
SA – Substância ativa
TEN – Teste de Estabilidade Normal

CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE 128
NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO URSÓLICO EM FORMULAÇÃO
COSMÉTICA

ACN – Acetonitrila

D – Derme

EC – Estrato córneo

EV – Epiderme viável

FR – Fluido receptor

NP – Nanopartículas poliméricas

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

SP – Superfície da pele

TS – *Tape stripping*

INTRODUÇÃO

A pele é reflexo das condições de saúde e do bem-estar físico e mental do indivíduo, influenciando na sua aparência e no seu estado psíquico e, conseqüentemente, em suas atividades sociais e profissionais (BATLLE & VILA, 1988; STOCKDALE, 1991).

A maior parte dos sinais visíveis do envelhecimento é causada pelos raios ultravioleta. Não somente o excesso de sol ou as queimaduras que ocasionalmente causam danos graves, como também as doses moderadas de sol que as pessoas recebem diariamente, a longo prazo, constituem ameaça efetiva para a saúde e a beleza da pele. As radiações nocivas emitidas pelo sol são subdivididas em: ultravioleta A (UVA) 320-400nm, B (UVB) 290-320nm e C (UVC) 100-290nm (MAIA CAMPOS, 2006; BENY, 2003).

O cuidado com o bem-estar do indivíduo deixou de ser preocupação apenas dos dermatologistas e esteticistas. Aliada à beleza, existe a preocupação no Brasil do aumento da incidência do câncer de pele, reflexo do tipo de exposição à radiação solar. Cientistas de todo mundo aprofundam estudos no sentido de selecionar substâncias capazes de impedir os efeitos danosos causados na pele pelas radiações solares (PAOLA *et al*, 1998).

A incidência solar promove a produção de radicais livres que, se não forem neutralizados, favorecem reações indesejáveis e provocam alterações fisiológicas e biológicas, como: fotoenvelhecimento, degeneração das fibras de elastina em massa amorfa (elastose), perda de tensão das fibras de colágeno na derme e queratoses solares (precursores do carcinoma de células escamosas) (HARBER *et al*, 1990).

As pesquisas na área cosmética têm se voltado para o estudo de substâncias de origem natural, principalmente de plantas, como extratos e substâncias isoladas.

Dentre os diversos compostos isolados das plantas, inclui-se a classe dos triterpenóides. As plantas que os contêm possuem propriedades, principalmente, anti-inflamatórias e protetoras do sistema vascular, assim como propriedades antialérgicas, analgésicas, antipirética e anticancerígena (LIU, 1995).

A capacidade anticancerígena do ácido ursólico foi estudada em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Os trabalhos evidenciam que o ácido ursólico (AU) possui

certa capacidade inibitória no desenvolvimento de tumores. Por meio da inibição da ativação do vírus Epstein-Barr pelo TPA (12-Otetradecanolforbol 13-acetato), o AU conseguiu retardar a formação de papilomas, sendo esta ação mais importante em cânceros de pele. Estudos realizados em ratos demonstraram a diminuição significativa da ocorrência de tumores na pele em vários períodos de tempo. Este efeito foi comparável ao outro inibidor tumoral estudado, o ácido retinóico, sendo o AU mais promissor (ISHIDA *et al.*, 1990).

A Nanotecnologia tem sido apontada como promessa na área cosmética e muito se tem investido neste segmento, tendo em vista alcançar maior eficácia dos princípios ativos, quando as nanopartículas são incorporadas nas formulações cosméticas, além de oferecer características sensoriais e de apresentação diferenciadas aos produtos.

Dentre os métodos para obtenção de sistemas nanoparticulados, aqueles que utilizam polímeros biodegradáveis tem apresentado ampla aplicação no desenvolvimento de produtos cosméticos. No que se referem aos sistemas vesiculares, as nanocápsulas permitem carrear substâncias lipofílicas em seu núcleo, em geral, oleoso. Diferentes cosméticos nanoestruturados estão disponíveis no mercado. A empresa L’Oreal detém o maior número de patentes relacionadas à sistemas nanoestruturados de princípios ativos para aplicação cosmética. No Brasil, empresas como Boticário e Natura têm da mesma forma, investido nessa tecnologia inovadora.

Dentre as principais vantagens da aplicação dessa tecnologia para o desenvolvimento de produtos cosméticos, pode-se citar:

- proteção da substância ativa da degradação decorrente da exposição à luz e aos demais componentes da formulação, em função de minimizar este efeito, elevando portanto, a estabilidade do produto;
- maior desempenho da substância ativa em função de permitir liberação gradual desta e maior tempo de sua residência na pele, evitando possíveis irritações locais que poderiam ocorrer no caso de formulações convencionais (ocasionadas pela substância ativa livre) (CUA *et al.*, 1990; KUMAR, 2000; LBOUTONNE *et al.*, 2002; JIMÉNEZ *et al.*, 2004).

A literatura científica disponível relativa ao emprego de nanopartículas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos é abundante. No geral, é utilizada para a obtenção de produtos com liberação modificada da substância ativa, assim como de ação terapêutica em sítio específico (KREUTER, 1994; SOPPIMATH *et al.*, 2001). Por outro lado, ainda existem poucos trabalhos que empregam tais vesículas como sistemas carreadores para substâncias com aplicação cosmética. Dessa forma, a nanoestruturação de cosméticos pode ser considerada promissora no que se refere ao desenvolvimento, pesquisa e inovação desses produtos, de maneira que o ácido ursólico tem se destacado na área cosmética em função de sua propriedade antioxidante aliada à atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e anticancerígena.

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética, e os objetivos específicos foram divididos em capítulos. Cada capítulo contempla um ou mais objetivos, apresentando introdução, material e métodos, resultados, discussão, e conclusões. A validação do método cromatográfico para determinação do ácido ursólico é abordada no Capítulo 1. O Capítulo 2 apresenta o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas e de carreadores lipídicos nanoestruturados. O Capítulo 3 apresenta a avaliação da estabilidade de nanopartículas de ácido ursólico em formulações cosméticas. O Capítulo 4 aborda a avaliação da penetração cutânea *in vitro* do ácido ursólico presente em formulações cosméticas.

OBJETIVOS

Geral

Desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética.

Específicos

- Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas poliméricas e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo ácido ursólico.
- Validação de metodologia analítica de avaliação do ácido ursólico.
- Preparação de formulações cosméticas contendo ácido ursólico livre e nanoparticulado e avaliação de sua estabilidade.
- Avaliação da penetração cutânea *in vitro* do ácido ursólico presente em formulações cosméticas.

REFERÊNCIAS

- BATLLE, C.; VILA, O.C. Protectores solares. **Venta OTC**, p.43-46, 1988.
- BENY, M.G. Considerações sobre a pele seca. **Cosmetic & Toiletries**, São Paulo, v.15, n.3/4, p.42-46, 2003.
- CUA, A.B.; WILHEM, K.P.; MAIBACH, H.I. Elastic properties of human skin: relation to age, sex and anatomical region. **Archives of Dermatological Research**, v. 282, p.283-288, 1990.
- HARBER, L.C.; LEO, V.A.; PRYSTOWSKY, J.H. Intrinsic and extrinsic photoprotection against UVB and UVA radiation. In: LOWE, N.J., SHAATH, N.A., eds. *Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects*. New York: Marcel Dekker, p.359-378 [**Cosmetic. Science technology Series**, v.10], 1990.
- ISHIDA, M.; OKUBO, T.; KOSHIMIZU, K.; DAITO, H.; TOKUDA, H.; KIN, T.; YAMAMOTO, T.; YAMAZAKI, N. Topical preparations containing ursolic acid and/or oleanolic acid for prevention of skin cancer. **Chemical Abstract**, v. 113, 12173y, 1990.
- JIMÉNEZ, M.M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M.F.; MARTINI, M.C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v.272, p.45-55, 2004.
- KREUTER, J. Nanoparticles. In: KREUTER, **Journal of Colloidal Drug Delivery Systems**. New York: Marcel Dekker, p.219-342, 1994.
- KUMAR, M.N.V.R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.3, p.234-258, 2000.
- LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J.F.; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROT, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly (caprolactone) nanocapsule form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v.82, p.319-334, 2002.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; Vitaminas em cosméticos. **Cosmetic & Toiletries**, São Paulo, v.18, n.6, p.52-62, 2006.

PAOLA, M.V.R.V., RIBEIRO, M.E. Interação entre filtros solares. **Cosmetic & Toiletries**, Ed. Port., São Paulo, v.10, n.5, p.40-50, 1998.

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

STOCKDALE, M. Filtros solares UVA: Métodos para avaliação de sua eficácia. **Cosmetic & Toiletries**, Ed. Port, São Paulo, v.3, n.2/3, p.26-30, 1991.

CAPÍTULO I

DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO URSÓLICO LIVRE E EM NANOPARTÍCULAS

RESUMO

O ácido ursólico (AU) (ácido (3 β)-3-hydroxyurs-12-en-28-óico) é um triterpenoide pentacíclico pertencente ao grupo dos ursanos, existente em diversas plantas e ervas como alfazema (*Lavandula angustifolia*), orégano (*Origanum vulgare*), hortelã (*Mentha piperita*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), entre outras. Várias atividades biológicas desta classe foram verificadas nas últimas duas décadas, como propriedades anti-irritantes, antimicrobiana, antioxidante e anticancerígena. Na pele o ácido ursólico reforça a função barreira e atua na diferenciação dos queratinócitos na epiderme, acelerando a renovação celular. A indústria cosmética tem investido em tecnologias inovadoras na busca de maior eficácia de seus produtos. A nanotecnologia tem sido utilizada para obtenção dessa característica além de reduzir os riscos de irritação cutânea por promover a liberação modificada do componente ativo. Nesta pesquisa, objetivou-se determinar a eficiência de encapsulação do ácido ursólico livre e nas nanopartículas poliméricas. Para tanto, foi validada uma metodologia que empregou a CLAE (Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência) em fase reversa. Na validação da metodologia analítica foram obtidos os resultados: coeficiente de correlação da equação da curva analítica de 0,999; limite de detecção e de quantificação, respectivamente, 0,000417 e 0,001388 $\mu\text{g mL}^{-1}$; na especificidade, o sobrenadante da solução de nanopartícula, utilizado para determinar quantitativamente o ácido ursólico, não apresentou nenhum componente que pudesse interferir com o pico máximo do ácido ursólico, podendo o método ser aplicado para identificação e quantificação do ácido ursólico nananoparticulado; precisão intra-dia do desvio padrão relativo obtido foi 1,04% na concentração de 160,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,73% na concentração de 260,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e exatidão entre 98,70 e 101,95%, indicando boa reprodutibilidade do método e concordância entre os resultados obtidos. As pesquisas realizadas indicaram que a metodologia avaliada pode ser empregada na avaliação do ácido ursólico livre e nanoparticulado.

Palavras-chave: ácido ursólico, validação analítica, CLAE, nanopartícula.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Ácido ursólico – considerações gerais

Os triterpenoides pertencem à extensa família de produtos naturais conhecida como terpenoides (ou terpenos). Estes compostos derivam todos de unidades de isopreno C5 (**Figura 1**).

Figura 1. Fórmula estrutural do Isopreno (LOPES, 2000)

Por meio de ligações sucessivas de esqueletos de carbono, representadas por (C5)_n, obtêm-se as classes principais de terpenos, como: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40).

O isopreno é produzido naturalmente, mas não está envolvido diretamente na formação dos produtos pertencentes a estas classes. Suas unidades bioquimicamente ativas são representadas pelo dimetilalil difosfato (DMAPP) e o isopentenil difosfato (IPP) (**Figura 2**).

A maioria dos terpenoides não ocorre de forma linear, mas sob a forma de estruturas cíclicas sucessivas (LOPES, 2000).

Os triterpenos não são formados pelo processo de acréscimo IPP à cadeia existente, como ilustrado na **Figura 2**, ao invés, duas moléculas de pirofosfato de farnesilo associam-se para formar um hidrocarboneto de nome esqualeno, sendo este considerado o precursor dos triterpenóides e dos esteróides. A ciclização pode ser observada na mesma figura.

Figura 2. Formação de terpenos e ciclização do esqualeno (LOPES, 2000)

O ácido ursólico é um triterpenoide pentacíclico pertencente ao grupo dos ursanos, existente em diversas plantas e ervas, como a lavanda (*Lavandula angustifolia*), orégãos (*Origanum vulgare*), as folhas da hortelã (*Mentha piperita*), e do tomilho (*Thymus vulgaris*), entre outras (LIU, 1995). Há apenas alguns anos, se descobriu a atividade farmacológica do ácido ursólico (AU), tendo sido durante muitos anos empregado apenas como agente emulsionante na indústria alimentícia. Sua toxicidade (aguda ou crônica) é praticamente nula, sendo considerado dermatologicamente inócuo (GERBRAS, 2009).

A capacidade anticancerígena do ácido ursólico foi avaliada em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Estes concluíram que esta substância ativa possui certa capacidade inibitória contra o desenvolvimento de tumores. Por meio da inibição da ativação do vírus Epstein-Barr pelo TPA (12-Otetradecanolforbol 13-acetato), o AU conseguiu retardar a formação de papilomas, efeito mais importante em cânceros de pele. Estudos feitos em ratos demonstraram a diminuição significativa da ocorrência de tumores na pele em vários períodos de tempo. Este efeito foi comparável ao outro inibidor tumoral estudado, o ácido retinóico, sendo o AU mais promissor (TOKUDA *et al.*, 1986). O AU demonstra, assim, grande futuro no potencial de tratamento de câncer de pele (ZHAO & LUO, 2010; FILIP *et al.*, 2009; COSERI, 2009) tendo sido iniciados estudos com vista à comercialização de medicamentos baseados na sua ação no Japão.

1.1.1 Características do ácido ursólico

O ácido ursólico, de denominação química e comum ácido (3b)-3-Hidroxiurs-12-en-28-oico ; malol; micromerol; prunol e urson, tem sido utilizado em formulações cosméticas com a finalidade de ação antienvelhecimento cutâneo. A partir dos estudos realizados, não produziu toxicidade aguda ou crônica, nem irritação ou sensibilidade e tem sido considerado um fitoquímico dermatologicamente inócuo. Não foram identificadas contra-indicações na posologia terapêutica. As concentrações de uso são de 0,2 a 1,5% (ZHAO & LUO, 2010; GERBRAS, 2009).

O **Quadro 1**, apresenta as principais características físico-química do AU.

Quadro 1. Características físico-químicas do ácido ursólico (Ficha técnica Gerbras; Merck index)

Denominação INCI	MM	Fórmula Molecular	PF (°C)	Aspecto físico	Solubilidade
<i>Ursolic Acid</i>	456,68	$C_{30}H_{48}O_3$	283-285	Pó branco acinzentado	Insolúvel em água, solúvel em metanol, acetona e levemente solúvel em etanol, éter e ácido acético

Legenda: MM=Massa Molecular; PF=ponto de fusão; INCI=*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*.

1.1.2 Atividades do ácido ursólico

a) Ação antienvelhecimento

O ácido ursólico tem sido empregado objetivando melhorar o estado geral da pele e do cabelo. O AU e seus derivados formam uma barreira resistente a óleo sobre a pele e os cabelos, como estes fazem no revestimento de cera das frutas (D'AMELIO, 1999). Tem sido utilizado para tratar a pele fotoenvelhecida, pois previne e melhora a aparência de rugas e manchas da idade, restaurando as estruturas de colágeno e melhorando a elasticidade da pele, por inibir a ação da enzima elastase nas proteínas estruturais (IFSCC, 1998; MEZZETTI, ORZALES & BELLAVITA, 1971; KIKUDO *et al.*, 1993).

Um tipo de lipossoma de estrutura multilamelar tem sido amplamente utilizado em muitas indústrias farmacêuticas e cosméticas. A partir de resultados de pesquisas realizadas *in vivo* por LEE, JEONG & KIM (2005), lipossomas formados por vesículas multilamelares contendo 0,2% de ácido ursólico, reduziram em cerca de 13% no comprimento da ruga principal, 59% na sua aparência e o número de rugas foi diminuído em cerca de 36%, considerando período de 56 dias de tratamento.

NASCIMENTO e colaboradores (2010) constataram que o ácido ursólico demonstrou significativa atividade antioxidante, justificando o uso da espécie *S. australis* na medicina popular, que foi avaliada pelo método de sequestro do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), usando como padrões Trolox® e Vitamina C.

Vários triterpenos bioativos, também, foram examinados pela atividade antioxidante e todos exerceram propriedades biológicas significativas. O ácido ursólico (ácido 3 β -hidro-xy-urs-12-en-28-óico) e seu isômero, ácido oleanólico (ácido 3 β -hidroxi-olea-12-en-28-óico), que é um constituinte da resina de *Pistacia lentiscus*, estão entre os mais conhecidos triterpenos bioativos. Ambos não são tóxicos, têm sido utilizados em produtos cosméticos e de saúde e, também, foram propostos na prevenção do câncer de pele (ASSIMOPOULOU, ZLATANOS & PAPAGEORGIOU, 2005).

b) Ação estimulante do crescimento capilar

O ácido ursólico e seu isômero, ácido oleanólico, têm sido utilizado em tônicos capilares para acelerar o crescimento do cabelo, prevenir a irritação do couro cabeludo e combater os efeitos da caspa (OKAZAKI, SUETSUGU & YOSHIDA, 1987). A resposta pode estar relacionada ao estímulo do fluxo sanguíneo periférico no couro cabeludo e ativação das células germinativas formadoras da matriz do cabelo. Ele pode ser considerado como preventivo à alopecia (KIKUDO *et al.*, 1993).

c) Ação antimicrobiana

O ácido ursólico inibiu o crescimento de várias cepas de *Staphylococcus* (KOWALEWSKI *et al.*, 1976). Estudos realizados confirmam que numerosas plantas da família *Lamiaceae* contendo ácido ursólico apresentaram atividades antibacteriana e antifúngica (SATTAR *et al.*, 1995). A concentração mínima inibitória de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana* e *Lavandula officinalis* foram 500,0; 250,0; e 500,0 mg/cm³, respectivamente (SATTAR *et al.*, 1995). Em outro estudo realizado o ácido ursólico também inibiu o crescimento de *Microsporium lenosum* e *Candida albicans* em 250,0 mg/mL (ZALETOVA *et al.*, 1987).

d) Ação anti-inflamatória

O ácido ursólico é um potente agente anti-inflamatório, sendo recomendado seu uso em pomadas para queimaduras (HARRY, 1963). Este não só inibe a elastase de leucócitos humanos, mas também as atividades da 5-lipoxigenase e da ciclooxigenase (SAFAYHI *et al.*, 1997; NAJID *et al.*, 1992; ZALETOVA *et al.*, 1987).

O AU (1,0 mg/orelha) inibiu 72,4% o TPA (Agente Promotor de Tumor) induzida no edema de orelha de rato (REICO *et al.*, 1991). Estudos de Hirota e colaboradores (1990) determinaram que 200,0mg e 50,0mg de ácido ursólico inibiram a inflamação induzida pelo 12-o-hexadecanoil-16-hidroxiforbol-13-acetato (HPPA) em 49% e 33%, respectivamente. Além disso, impediu a liberação de histamina induzida pela concanavalina A (Con A), que pode causar processo inflamatório grave, 95% na concentração de 0,001 M (TSURUGA *et al.*, 1991).

e) Ação anticancerígena em tumor de pele

O ácido ursólico e seu isômero, ácido oleanólico, foram recomendados para a terapia de câncer de pele no Japão, sendo que preparações tópicas contendo ácido ursólico/ácido oleanólico foram patenteadas neste país na prevenção do câncer de pele (ISHIDA *et al.*, 1990). A aplicação tópica de ácido ursólico e de derivados do extrato de alecrim inibiram TPA induzido, a iniciação e a propagação do tumor, assim como a inflamação e a atividade da ornitina descarboxilase na pele do rato (HUANG *et al.*, 1994). Aproximadamente, 0 e 3% dos camundongos desenvolveram o câncer em 15 e 30 semanas, respectivamente, em comparação a 50% e 90% para o grupo de ratos controle (ISHIDA *et al.*, 1990).

Alguns estudos indicaram que o ácido ursólico inibiu o crescimento de tumores na pele de ratos, e de alguns micro-organismos (ZHAO & LUO, 2010; FILIP *et al.*, 2009; COSERI, 2009), apresentando também atividades antimicrobiana e antifúngica (TOKUDA *et al.*, 1986; ZALETOVA *et al.*, 1987).

1.2 Sistemas nanoparticulados

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de substâncias ativas que apresentam diâmetros entre 10 a 1000 nm. Dependendo do seu processo de preparação, podem ser obtidas nanocápsulas ou nanoesferas que diferem entre si, segundo sua composição e organização estrutural (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Existem diversos tipos de materiais poliméricos, como: poli (ácido láctico), poli (ácido láctico; co-ácido glicólico), poli (ϵ -caprolactona), copolímeros do ácido metacrílico.

A utilização de materiais poliméricos para a encapsulação de fármacos ou substâncias ativas é uma alternativa interessante para mascarar as propriedades físico-químicas intrínsecas da substância, alterar as características sensoriais dos produtos, melhorar sua interação com membranas e facilitar a sua penetração e permeação cutânea. Dentre os polímeros utilizados, a poli (ϵ -caprolactona) se destaca devido sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas, pois apresenta estrutura semi-cristalina que possui degradação mais lenta quando comparado aos polímeros amorfos (GUTERRES *et al.*, 2007).

Os sistemas nanoparticulados poliméricos podem ser classificados em nanocápsulas e nanoesferas. As primeiras são constituídas por invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo a substância ativa estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas não apresentam óleo em sua composição e são formadas por um núcleo sólido formado por uma rede polimérica sendo caracterizadas por possuírem uma estrutura matricial, onde a substância ativa pode ficar retida ou adsorvida (WEISS, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Existem vários métodos de preparação de nanopartículas descritos na literatura, dentre estes se destaca o de deposição do polímero pré-formado proposto por Fessi e colaboradores (1989), no qual um polímero biodegradável é dissolvido em um solvente orgânico juntamente com o componente oleoso, o tensoativo lipofílico e o fármaco ou substância ativa a encapsular. Esta fase oleosa é injetada, sob agitação moderada, sobre a fase aquosa, composta de água e o tensoativo hidrofílico. Esta mistura origina, de forma espontânea, as nanocápsulas, com diâmetros médios situados entre 200 e 500 nm. A vantagem de utilização deste método é a formação espontânea, simples, eficiente e reprodutível de pequenas partículas com elevada capacidade de encapsulação de substâncias ativas (WEISS, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007). A obtenção de partículas com diferentes diâmetros é dependente de vários fatores, como: concentração do polímero, a dos princípios ativos e do tensoativo; proporção de fase oleosa na fase orgânica e a velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa (COUVREUR *et al.*, 2002).

1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia pode ser conceituada como um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados em duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área, e a outra um fluído insolúvel na fase estacionária, que percorre a primeira. A fase estacionária, ou adsorvente, tem tomado várias formas no decorrer do tempo, incluindo papel, camada delgada de sólidos sobre placa de vidro, líquidos imobilizados, géis e partículas sólidas empacotadas em colunas. O componente que flui, ou fase móvel, é um líquido ou um gás (WESTON & BROWN, 1997).

A descoberta da Cromatografia como uma técnica analítica foi atribuída ao botânico russo M. Tswett, que conseguiu separar pigmentos de cloroplastos contidos em folhas de plantas utilizando um tubo de vidro preenchido com carbonato de cálcio. Ele empregou o termo “Cromatografia” para descrever as zonas coloridas que se moviam dentro da coluna de vidro (MORHY, 1976).

A Cromatografia à Líquido divide-se em dois grupos: Cromatografia Líquida clássica, feita em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, que utilizam colunas metálicas e pressões elevadas de fase móvel, obtidas com auxílio de bombas de alta pressão (SNYDER *et al.*, 1997).

A CLAE envolve um sistema onde a fase estacionária, seja uma superfície sólida, líquida, uma resina de troca iônica ou um polímero poroso, está retida em uma coluna e a fase móvel é forçada a passar através da mesma sob altas pressões. Os três mecanismos mais usados para realizar a CLAE envolvem: troca iônica, partição e adsorção.

Os detectores fotométricos UV medem as mudanças na absorção de luz monocromática na região de 190-350nm e são os mais empregados na CLAE. Determinam a absorbância, indicando a mudança de concentração ou a massa dos compostos da amostra após passagem em coluna cromatográfica (COLLINS, 1995).

1.4 Metodologias analíticas para determinação do ácido ursólico

A dificuldade de separação do ácido oleanólico (AO) e do ácido ursólico (AU) se deve a estes compostos serem isômeros, sendo os dois quase sempre encontrados simultaneamente em diversas plantas (**Figura 3**).

Figura 3. Fórmula estrutural do ácido ursólico e do ácido oleanólico (FONTANAY *et al.*, 2008) *Legenda:* UA – Ácido ursólico/ OA – Ácido oleanólico.

Existem algumas referências descrevendo o uso de métodos de CLAE para separar e determinar o AO e AU em plantas, mas estes não foram bem separados em seus sistemas (YUAN *et al.*, 1999; XIE *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2002; GAN *et al.*, 2003).

O isolamento e a identificação de compostos marcadores na avaliação quali e quantitativa de substâncias bioativas presentes nas ervas medicinais é essencial na avaliação da qualidade, lote a lote, pois a maioria destes não estão comercialmente disponíveis e exigem sua obtenção e qualificação. Métodos de extração e isolamento, incluindo a Cromatografia em partição líquido-líquido e a em Camada Delgada, dentre outros métodos cromatográficos tem sido empregados na obtenção de compostos marcadores de fitoterápicos e têm sido amplamente divulgados (GUO *et al.*, 2007; CLAUDE *et al.*, 2004). A identificação de bioativos e compostos marcadores em plantas foi realizada utilizando Espectrometria de Massas simples (MS/MS), e a de alta resolução (HRMS) (LEE *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2009). A análise HRMS tem se apresentado especialmente útil em determinar a composição elementar de compostos desconhecidos (GONG *et al.*, 2006; CLAUDE *et al.*, 2004; RAZBORSEK *et al.*, 2007; GANZERA, *et al.*, 2004).

Devido à complexa composição química dos extratos vegetais e a presença de componentes interferentes, muitos métodos cromatográficos como a Cromatografia Líquida (CL) acoplada com detectores espectrofotométricos (GONG *et al.*, 2006; CLAUDE *et al.*, 2004) e Cromatografia Gasosa (CG), utilizando derivatização química (RAZBORSEK *et al.*, 2007; JANICSAK *et al.*, 2003) tem sido vastamente aplicados para separar compostos interferentes.

Para a determinação simultânea da composição dos ácidos triterpênicos em plantas, a Cromatografia acoplada a Espectrometria de Massas (MS) tem sido utilizada. Em particular, CG/MS com ionização *electrospray* (CABRERA *et al.*, 2007; GANZERA *et al.*, 2004) tem surgido como técnica para determinação de compostos bioativos em plantas. Além disso, CG/MS, tem servido como método adequado e confiável para a determinação simultânea de compostos voláteis e ácidos triterpênicos, especialmente nas complexas matrizes naturais de extratos vegetais. Apesar da grande versatilidade do método CG/MS, a maioria exige derivatização química dos analitos antes da análise (JANICSAK *et al.*, 2003).

Métodos de CLAE, geralmente, utilizam a detecção no ultravioleta (UV) em comprimentos de onda específicos para a absorção dos princípios ativos presentes, e tem uma baixa sensibilidade para os compostos causadores da interferência. ZOU e CHEN (2008) desenvolveram um método analítico por meio do qual se determinou, simultaneamente, o ácido ursólico e o ácido oleanólico a fim de avaliar a qualidade da *P. frutescens* de forma simples, rápida e precisa por CLAE.

1.5 Validação de Métodos Analíticos

Os parâmetros analíticos preconizados pela ICH (*International Conference on Harmonization*), instrumento Q2(R1) – *Validation of analytical procedures: text and methodology* (ICH, 2005) e da USP 35 ed. (2012), para validação de métodos analíticos envolvem: exatidão; precisão; especificidade ou seletividade; linearidade; limites de detecção e quantificação; robustez e resistência.

1.5.1 Especificidade ou Seletividade

Um método é considerado específico quando mede com exatidão a substância analisada, na presença de outros componentes.

1.5.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico pode ser determinada por meio da análise de regressão linear da curva analítica, a fim de determinar se exista relação linear entre a resposta instrumental e a concentração conhecida da substância presente nas amostras, ou seja, demonstra a capacidade do método gerar

resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma variação conhecida.

1.5.3 Precisão

Obtida a partir de dez determinações para cada uma das concentrações estudadas; calcula-se a média do coeficiente de variação, expresso em porcentagem, ou desvio padrão médio relativo.

1.5.4 Exatidão

Pode ser expressa pelo percentual de recuperação dos valores experimentais em relação aos teóricos, com o emprego do método que está sendo proposto. Assim, ao serem adicionadas concentrações conhecidas da substância analisada, após a análise dessa amostra é possível determinar quanto o método foi capaz de analisar e seu grau de exatidão.

1.5.5 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção de um método analítico corresponde à mais baixa concentração da substância presente na amostra que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade e o limite de quantificação de um método analítico corresponde a mais baixa concentração da substância em exame presente na amostra que pode ser exatamente e precisamente medida.

2 OBJETIVO

Determinar quantitativamente o ácido ursólico livre e nas nanopartículas. Para essa finalidade foi realizada a validação do método analítico de acordo com os parâmetros: linearidade, limite de detecção e de quantificação, especificidade, precisão (intra-dia e inter-dia) e exatidão utilizando a Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3 MATERIAL

3.1 Matérias-primas - (INCI – International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) e grau de pureza.

Todas as matérias-primas são de grau farmacêutico.

- Ácido ursólico - (*Ursolic acid*) 90%, HighChem;
- Monoestearato de sorbitan – (*Sorbitan monoestearate*) (Span[®] 60), J.T.Baker;
- Oleato de sorbitan – (*Sorbitan oleate*) (Polissorbato 80), J.T.Baker;
- Poli ϵ -caprolactona - (*Poly ϵ -caprolactone*) MM: 65 000 Dalton, Sigma-Aldrich;
- Triglicérides dos ácidos cáprico/caprílico – (*Caprylic/capric trygliceride*), Mapric;

3.2 Padrão de referência

- Ácido ursólico com teor de pureza de 99%, grau de pureza cromatográfico, Sigma-Aldrich[®].

3.3 Solventes e reagentes

- Acetona, padrão de pureza analítico 99,5%, Synth;
- Acetonitrila grau cromatográfico, Synth;
- Ácido fosfórico grau cromatográfico, Synth;
- Água MilliQ;
- Metanol grau cromatográfico, Synth;

3.4 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Balança analítica, Shimadzu[®], precisão 1 mg-220 g;
- Centrífuga, VWR[®] – modelo Galaxy 7D;
- Coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 μ m);
- Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência, Shimadzu[®], detector ultravioleta (UV) variável com integrador CBM-20A, gerido por software LCsolution;
- Membrana filtrante com abertura 0,45 μ m, Millipore[®];
- pHmetro, Quimis[®];

4 MÉTODOS

4.1 Validação da metodologia analítica do ácido ursólico

A suspensão coloidal da nanopartícula com ácido ursólico (AU) (o método de preparo da nanopartícula polimérica encontra-se no próximo capítulo) foi tratada com acetonitrila, que ocasiona a dissolução parcial do polímero e a liberação e dissolução do AU.

O doseamento do ácido ursólico foi realizado empregando a Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE), segundo metodologia descrita por Sarveiya e colaboradores (2004), modificada por este autor.

O método foi validado segundo a Resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e a *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use* (ICH, 1995) em termos de: linearidade, limite de detecção e de quantificação, especificidade, precisão (inter e intra-dia) e exatidão.

A metodologia analítica seguiu as seguintes orientações:

- Coluna: LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)
- Equipamento: Cromatógrafo a líquido marca Shimadzu
- Modo: fase reversa
- Método: isocrático
- Fase móvel: MeOH (metanol):solução aquosa de H₃PO₄ 0,1% v/v (88:12)
- Vazão: 1,0 mL/min
- Injeção: automática
- Volume injetado ("loop"): 30 µL
- Detecção no UV: 210 nm
- Temperatura: 25°C
- Tempo de retenção aproximado: 19 minutos

4.1.1 Curva analítica

Foram pesadas exatamente cerca de 100,0 mg de ácido ursólico padrão de referência secundário, pureza de 99% e transferiram-se para balão volumétrico de 10,0 mL (balão mãe), dissolvendo-se completamente na fase móvel (F.M.): metanol: solução aquosa de ácido fosfórico 0,1% v/v (88:12). Alíquota exata de 0,77 mL foi

transferida para balão volumétrico de 25 mL, diluiu-se com a mesma F.M. obtendo-se a concentração final de $310,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (*balão A*).

Alíquotas de 0,16; 0,97; 1,77; 2,58; 3,38 e 4,19 mL do *balão A* foram transferidas para balões volumétricos de 5,0 mL completando-se com a F.M., obtendo-se concentrações finais de 10,0; 60,0; 110,0; 160,0; 210,0; 260,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido ursólico. Filtrou-se em membrana de tamanho de abertura 0,45 μm , Millipore e injetaram-se 30,0 μL no cromatógrafo a líquido de alta eficiência e foram determinadas as concentrações de AU. Essas medidas foram realizadas em triplicatas.

A curva analítica para o ácido ursólico foi construída com valores da concentração versus a área do pico. A equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

4.1.2 Determinação do limite de detecção e quantificação

Os cálculos para determinação do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram baseados na estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica a partir das equações abaixo (**Equação 1** e **Equação 2**):

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Equação 1 - Limite de detecção

Onde: “s” é a estimativa do desvio padrão da resposta e “S” é a inclinação (“*slope*”) ou coeficiente angular da curva analítica. O mesmo critério do LD foi adotado para o LQ utilizando a relação 10:1

$$\text{LQ} = 10 \times \frac{s}{S}$$

Equação 2 - Limite de quantificação

Onde: “s” é a estimativa do desvio padrão da resposta e “S” é a inclinação (“*slope*”) ou coeficiente angular da curva analítica.

O método baseado nos parâmetros da curva analítica é estatisticamente confiável. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada,

utilizando um determinado procedimento experimental, enquanto que o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al*, 2004).

4.1.3 Especificidade

Preparou-se uma solução padrão de referência do ácido ursólico na concentração final de $310,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, como foi descrito no item 4.1.1 na preparação do *balão A*. Alíquota exata de 0,16 mL deste *balão* foi transferida para *balão* volumétrico de 5,0 mL, completando-se com a F.M. e obtendo-se concentração final de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Solução I). De forma semelhante, preparou-se uma conforme descrito no item 4.1.1 na concentração $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando-se amostra de ácido ursólico com teor de pureza de 90% doado pela empresa HighChem (Solução amostra de ácido ursólico II). Para o preparo da nanopartícula, a suspensão foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos. Foram medidos exatamente 200,0 μL do sobrenadante que foi transferido para *via* acrescentando-se em seguida 200,0 μL de acetonitrila, que promoveu a dissolução parcial do polímero e a liberação e dissolução do ácido ursólico contido no interior das nanopartículas, e por fim, 200,0 μL da fase móvel (Solução III). Desta maneira foi preparada a solução da nanopartícula de ácido ursólico.

As três soluções preparadas (Solução I, II e III) foram filtradas em membrana filtrante de tamanho de abertura 0,45 μm , Millipore® e injetadas (30,0 μL) no cromatógrafo a líquido de alta eficiência em triplicatas.

4.1.4 Precisão

Foi utilizada solução contendo $310,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ padrão de referência secundário, pureza de 99% de ácido ursólico. A seguir, transferiram-se 2,58 mL e 4,19 mL desta solução padrão para *balões* volumétricos de 5,0 mL e completou-se o volume com a fase móvel, obtendo-se 160,0 e 260,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Estes valores foram escolhidos porque 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é o ponto médio da curva analítica e 260,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o ponto seguinte da curva, e ambos geraram picos cromatográficos de boa resolução.

Todas as amostras foram previamente filtradas em membrana filtrante de tamanho de abertura 0,45 μm , Millipore e, então, injetadas no cromatógrafo.

Foram realizadas dez determinações e os resultados analisados estatisticamente.

4.1.5 Exatidão – Teste de recuperação

4.1.5.1 Solução padrão

Foram pesados exatamente 1,05 mg do padrão de referência secundário, pureza de 99% de ácido ursólico e transferidos para balão volumétrico de 5,0 mL, obtendo-se 210,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de solução padrão de ácido ursólico.

Alíquotas de 0,24 mL e 2,62 mL desta preparação foram transferidas para balões volumétricos de 5,0 mL, completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se concentrações finais de 10,0 e 110,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Estes valores foram escolhidos devido a boa reprodutibilidade dos picos cromatográficos obtidos.

4.1.5.2 Solução amostra

Foi pesado exatamente o equivalente a 1,0 mg da amostra de ácido ursólico 90% doado pela empresa HighChem (amostra de ácido ursólico) e transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL, obtendo-se concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Alíquotas das soluções padrão e amostra foram transferidas para balões volumétricos, conforme esquema a seguir:

Balão	Ácido ursólico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Solução padrão	Solução amostra
1	10,0	-----
2	-----	10,0
3	10,0	10,0
4	110,0	10,0
5	210,0	10,0

As soluções de ácido ursólico (padrão e amostra) foram filtradas em membrana filtrante de tamanho de abertura 0,45 μm , Millipore® e injetadas (30,0 μL) no cromatógrafo a líquido de alta eficiência em triplicatas.

Por meio do teste de recuperação se obteve a exatidão do método.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, estão apresentados os resultados da validação da metodologia analítica.

5.1 Linearidade

A curva analítica foi construída no intervalo de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $310,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para estudar a linearidade do método. Os resultados indicaram que a resposta foi linear (área pico x concentração) e a equação da reta apresentou o coeficiente de correlação de 0,999; dentro das especificações da ANVISA que recomenda valor acima de 0,99 (ANVISA, 2003) (**Figura 4 e Equação 3**).

Figura 4. Curva analítica do ácido ursólico padrão de referência secundário, pureza de 99%. Condições cromatográficas: coluna RP-18 (5 μm); fase móvel metanol:solução aquosa de H_3PO_4 0,1% v/v (88:12); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 30,0 μL ; detecção 210 nm; temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$)

(a)	(b)
$y = 6705,1x - 29957$	
$R^2 = 0,999$	

Equação 3 – Equação da curva analítica

Onde: “a” representa sua inclinação e “b” o valor da ordenada; R^2 = coeficiente de correlação linear

5.2 Limite de detecção e quantificação

A **Tabela 1** apresenta os resultados obtidos para o limite de detecção e de quantificação do ácido ursólico no método de cromatografia à líquido de alta eficiência. O desvio padrão foi dividido pela inclinação da curva de calibração para se obter uma estimativa do ruído associado ao método. O limite de detecção aceitável é de três vezes o valor do sinal-ruído do método e o limite de quantificação deve ser dez vezes o valor do sinal-ruído, obtendo-se resultados dentro dos limites estabelecidos (SWARTZ & KRULL, 1998; USP, 2012).

Tabela 1. Cálculo do limite de detecção e de quantificação do método de cromatografia à líquido de alta eficiência para o ácido ursólico

Ácido ursólico	Limites ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Detecção	Quantificação
	0,000417	0,001388

5.3 Especificidade

A **Figura 5** representa os resultados da pesquisa de interferentes. Pode-se observar que o sobrenadante da solução de nanopartícula, utilizado para determinar quantitativamente o ácido ursólico, não apresentou nenhum componente que pudesse interferir com o pico máximo do ácido ursólico. Portanto, o método pode ser aplicado para a identificação e a quantificação do ácido ursólico nananoparticulado.

Figura 5. Cromatogramas referentes: (A) Padrão de referência secundário de ácido ursólico, pureza de 99% (10,0 µg/mL) (B) Amostra de ácido ursólico (10,0 µg/mL) (C)

Nanopartícula polimérica de ácido ursólico. Condições cromatográficas: coluna RP-18 (5 μm); fase móvel metanol:solução aquosa de H_3PO_4 0,1% v/v (88:12); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 30,0 μL ; detecção 210 nm; temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$)

5.4 Precisão

A **Tabela 2** apresenta os resultados obtidos na determinação do ácido ursólico padrão de referência, pureza de 99% a partir de 10 determinações. Os valores apresentados são para cada dia, valor médio e desvio padrão relativo (DPR). A média intra-dia do DPR foi 1,00% na concentração de 160,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,73% na concentração de 260,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O desvio padrão relativo tanto intra-dia como inter-dia, foram menores do que 2%, indicando assim pouca variabilidade do método durante três dias consecutivos, quando executado. Estes resultados indicaram uma boa reprodutibilidade do método e a concordância entre os resultados obtidos (VALENTE, 2001; ICH, 2005; INMETRO, 2003).

Tabela 2. Precisão obtida na análise do ácido ursólico usando o método de cromatografia à líquido de alta eficiência

Intra-dia	Ácido ursólico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
<i>Dia 1</i>	160,11	259,46
DPR (%)	1,01	0,58
<i>Dia 2</i>	158,50	257,81
DPR (%)	1,14	0,57
<i>Dia 3</i>	158,26	257,05
DPR (%)	0,87	1,03
Inter-dia	158,96	258,11
DPR (%)	1,04	0,73

DPR – Desvio padrão relativo

5.5 Exatidão

A **Tabela 3** apresenta os resultados obtidos no cálculo da exatidão que correlaciona valor adicionado e encontrado do teste de recuperação. Observou-se boa dispersão nos resultados, obtendo-se valores entre 98,70 e 101,95% para a amostra de ácido ursólico, estando dentro dos limites estabelecidos. Com base nesse resultado pode-se afirmar que o método pode ser aplicado no doseamento do

ácido ursólico nas nanopartículas. Considerou-se que quanto mais a medida se aproxima do valor verdadeiro mais exato é o método (BRITTAİN, 1998; ICH, 2005).

Tabela 3. Resultado obtido do teste de recuperação realizado na análise do ácido ursólico

	Amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	Valor		Recuperação (%)	DPR ^(a)	Média da recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado			
Ácido ursólico	20,00	20,39	101,95	0,12	100,17
	120,00	118,45	98,70	0,10	
	220,00	219,66	99,84	0,01	

(a) média de 10 preparações independentes

6 CONCLUSÕES

- O método cromatográfico descrito para se determinar a eficiência de encapsulação da substância ativa nas nanopartículas poliméricas foi desenvolvido e validado obtendo-se os parâmetros: linearidade de 10,0 a 310,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; coeficiente de correlação de 0,999; limites de detecção e de quantificação, respectivamente, 0,000417 e 0,001388 $\mu\text{g mL}^{-1}$; na avaliação da especificidade, o sobrenadante da solução de nanopartícula não apresentou nenhum componente que interferisse; média intra-dia do desvio padrão relativo da precisão de 1,00% para a concentração de 160,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,73% para 260,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e a taxa de recuperação foi de 98,70 a 101,95%.

7 REFERÊNCIAS

* As referências estão de acordo com a norma NBR6023/2002, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

ASSIMOPOULOU, A. N.; ZLATANOS, S. N.; PAPAGEORGIOU, V. P. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. **Food Chemistry**, v. 92, p. 721-727, 2005

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 10 jun. 2009.

BRITTAİN, H.G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, Edição Brasileira, v.2, n.3, p.4-28, 1998.

CABRERA, G.M.; VELLASCO, A.P.; LEVY, L.M.; EBERLIN, M.N. Characterisation of fungal lanostane-type triterpene acids by electrospray ionisation mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v.18, n. 6, p. 489-495, 2007.

CLAUDE, B.; MORIN, PH.; LAFOSSE, M.; ANDRE, P. Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized β - and γ -cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1049, n. 1-2, p. 37-42, 2004.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução aos métodos cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, p.183-238,1995.

COSERI, S. Natural products and their analogues as efficient anticancer drugs. **Mini-reviews in Medical Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 560-571, 2009.

COUVRE, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsules technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.19, n.2, p. 99-134, 2002.

D'AMELIO, F.S. **Botanicals - A Phytocosmetic Desk Reference**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1999.

- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p.R1-R4, 1989.
- FILIP, A.; CLICHICI, S.; DAICOVICIU, D.; ADRIANA, M.; POSTESCU, I.D.; PERDESCHREPLER, M.; OLTEANU, D. Photochemoprevention of cutaneous neoplasia through natural products. **Experimental Oncology**, v.31, n. 1, p. 9-15, 2009.
- FONTANAY, S.; GRARE, M.; MAYER, J.; FINANCE, C.; DUVAL, R.E. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 272-276, 2008.
- GAN, G.P.; DUAN, M.S.; ZHANG, Y.S. HPLC determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Hedyotis corymbosa* (L) Lam (Chinese with English abstract). **Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 38, p. 233–234, 2003.
- GANZERA, M.; GAMPENRIEDER, J.; PAWAR, R.S.; Khan, I.A.; STUPPNER, H. Separation of the major triterpenoid saponins in *Bacopa monnieri* by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 516, n.1-2, p.149-154, 2004.
- GERBRAS, **Ficha Técnica – Ácido Ursólico.** Disponível em:<<http://www.gerbras.com.br>>. Acesso em: 15 jul., 2009.
- GONG, F.; WANG, B.T.; LIANG, Y.Z.; CHAU, F.T.; FUNG, Y.S. Variable selection for discriminating herbal medicines with chromatographic fingerprints. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, n. 2, p. 265-271, 2006.
- GUO, L.; CHO, S.Y.; KANG, S.S.; LEE, S.H.; BAEK, H.Y.; KIM, Y.S. Orthogonal array design for optimizing extraction efficiency of active constituents from Jakyak-Gamcho Decoction, the complex formula of herbal medicines, *Paeoniae Radix* and *Glycyrrhizae Radix*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 306-311, 2007.
- GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**. v.2, p. 147-157, 2007.

HARRY, R.G. Cosmetic Materials. Their Origin, Characteristics, Uses, and Dermatological Action. **Chemical Publishing Co.**, Inc., New York, NY, 1963.

HIROTA, M.; MORI, T.; YOSHIDA, M.; IRIYE, R. Suppression of tumor promoter-induced inflammation of mouse ear by ursolic acid and 4,4-dimethylcholestane derivatives. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1073-1075, 1990.

HUANG, M.; HO, C.; WANG, Z.; FERRARO, T.; LOU, Y.; STAUBER, K.; MA, W.; GEORGIADIS, C.; LASKIN, J.; CONNEY, A. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. **Cancer Research**, v. 54, p. 701-708, 1994.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos:** DOQ-CGCRE-008. 2003. Disponível em: http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf. Acesso em: 15 jun. 2009.

IFSCC - INTERNATIONAL FEDERATION OF SOCIETIES OF COSMETIC CHEMISTS IN CANNES. **Manufacturing Chemist**, 1998. p.61-62.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Quality Guidelines. Vew All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Q2 (R1)**: Validation of analytical procedures: text and methodology. 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Acesso em: 10 jun. 2009.

ISHIDA, M.; OKUBO, T.; KOSHIMIZU, K.; DAITO, H.; TOKUDA, H.; KIN, T.; YAMAMOTO, T.; YAMAZAKI, N. Topical preparations containing ursolic acid and/or oleanolic acid for prevention of skin cancer. **Chemical Abstract**, v. 113, 12173y, 1990.

JANICSAK, G.; VERES, K.; KALLAI, M.; MATHE, I. Gas chromatographic method for routine determination of oleanolic and ursolic acids in medicinal plants. **Chromatographia**, v. 58, n. 5-6, p. 295-299, 2003.

KIKUDO, T.; SHIGEMI, S.; MASAHIRO, S.; TATSU, M. **Hair-raising cosmetic**. Japanese Patent, nº. 05286835, 1993.

- KOWALEWSKI, Z.; KORTUS, M.; EDIZA, W.; KONIAR, H. Antibiotic action of beta-ursolic acid. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis** (Warsz), v. 24, n. 1, p.115-119, 1976.
- LEE, M. K.; AHN, Y. M.; LEE, K. R.; JUNG, J. H.; JUNG, O. S.; HONG, J. Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of *Prunellae Spica*: Determination of triterpenic acids. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, p. 271-277, 2009.
- LEE, M.R.; CHEN, C.M.; HWANG, B.H.; HSU, L.M. Analysis of saponins from black bean by electrospray ionization and fast atom bombardment tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 34, p. 804-812, 1999.
- LEE, S. J.; JEONG, N. H.; KIM, M.S. The preparation of multilamella vesicles containing ursolic acid. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 248-252, 2005.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.
- LOPES, J. F. **Triterpenóides com atividade anticancerígena**. Cadeira de Documentação e Informação – Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, 2000.
- MEZZETTI, T.; ORZALES, G.; BELLAVITA, V. Chemistry of ursolic acid. **Planta Medica**, v. 20, n. 3, p. 244-252, 1971.
- MORHY, L. Cromatografia (I): evolução histórica: a fase antiga. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.28, n.10, p.1185-1189, 1976.
- NAJID, A.; SIMON, A.; COOK, J.; CHABLE-RABINOVITCH, H.; DELAGE, C.; CHULIA, A.; RIGUAD, M. Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. **FEBS Letters**, v. 299, n. 3, p. 213-217, 1992.
- NASCIMENTO, P. G. G.; BIZERRA, A. M. C.; ALVES, L. A.; BERTINI, L. M.; LEMOS, T. L. G. Obtenção de derivados do ácido ursólico e suas atividades antioxidantes. **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2010.

- OKAZAKI, T.; SUETSUGU, M.; YOSHIDA, T. Hair tonics containing oleanolic derivatives. **Chemical Abstracts**, v. 107, P161369V, 1987.
- REICO, M.C.; GINER, R.; TERCENIO, M.; SANZ, M.; RIOS, J. Anti-inflammatory activity of *Helichrysum stoechas*. **Planta Medica**, v. 57, n. 2, A56-A57, 1991.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. São Paulo, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.
- SAFAYHI, H.; RALL, B.; SAILER, E.; AMMON, H. Inhibition of boswellic acids of human leucocyte elastase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 281, n. 10, p. 460-463, 1997.
- SARVEIYA, V.; RISK, S.; BENSON, H. A. E. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 225-231, 2004.
- SATTAR, A.; BANKOVA, V.; KUJUMGIEV, A.; GALABOV, A.; IGNATOVA, A.; TODOROVA, C.; POPOV, S. Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants. **Pharmazie**, v. 50, p. 62-65, 1995.
- SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York, John Wiley, 765p, 1997.
- SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v.70, p.1-20, 2001.
- SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, Ed. Bras., São Paulo, v.2, n.3, p.12-20, 1998.

- TOKUDA, H.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K.; ITO, Y. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Letters**, v. 33, p. 279-285, 1986.
- TSURUGA, T.; CHUN, Y.; EBIZUKA, Y.; SANKAWA, U. Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*: inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 12, p. 3276-3278, 1991.
- UNITED States Pharmacopeia, 35. ed. Rockville: **United States Pharmacopeial Convention**, 2012.
- VALENTE, S.L.M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.60, n.1, p.79-84, 2001.
- WEISS, V. **Avaliação Tecnológica de Suspensões e Nebulizados de Nanocápsulas e Nanoesferas contendo Indometacina**. [Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas] – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2001.
- WESTON, A.; BROWN, P.R. **HPLC and CG: Principles and practice**. San Diego: Academic Press, 280p., 1997.
- XIE, Y.; HANG, T.J.; CHANG, Z.X.; AN, D.K. HPLC determination of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese medicinal herbs. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v.26, n.9, p.615–616, 2001. [Abstract].
- XU, D.R.; DING, Q.; WANG, Z.T. HPLC determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Macrocarpium officinale* and *Zhibai Dihuang pill* (Chinese with English abstract). **Chin. Tradit. Herb Drugs**. v. 33, p. 996–997, 2002.
- YUAN, K.; LI, G.L.; LI, J.Z. Determination of ursolic acid and oleanolic acid in Asiatic plantain (*Plantago asiatica*) by HPLC (Chinese with English abstract). **Chin. Tradit. Herb Drugs**. v. 30, p. 901–903, 1999.
- ZALETOVA, N.; SHCHAVLINSKII, A.; TOLKACHEV, O.; VICHKANOVA, S.; FATEEVA, T.; KRUTIKOVA, N.; YARTSEVA, I.; KLYUEV, N. Preparation of some derivatives of ursolic acid and their antimicrobial activity. **Chemical Abstracts**, v.106, n. 18867e, 1987.

ZHAO, S.-C; LUO, D. Ursolic acid promotes apoptosis of human skin cancer cell line A431 through inhibition of NF- κ B signaling pathway. **Journal of Clinical Dermatology**, v. 39, n. 6, p. 349-352, 2010.

ZOU, S.; CHEN, W. Determination of Oleanolic and Ursolic Acids in Different Parts of *Perilla frutescens* by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n.7, p.1429-1432, 2008.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO

RESUMO

O desenvolvimento de formulações destinadas aos cuidados da pele tem sido estimulado na busca de novas formulações ou formas de veiculação. E neste panorama os sistemas nanoestruturados tem potencial aplicativo promissor na área cosmética. As nanopartículas poliméricas biodegradáveis, têm atraído uma atenção considerável, em relação aos lipossomas, como dispositivos potenciais para a liberação de moléculas ativas no organismo. Uma nova e melhorada geração de nanopartículas lipídicas, o carreador lipídico nanoestruturado (CLN) tem apresentado vantagens como possibilidade de produção de nanopartículas em larga escala, tempo de produção reduzido e não uso de solventes orgânicos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar as nanopartículas poliméricas e CLNs e otimizar a concentração dos agentes tensoativos dos carreadores lipídicos nanoestruturados por meio do planejamento experimental. As nanopartículas poliméricas foram preparadas baseadas na precipitação do polímero pré-formado e o CLN utilizando a homogeneização à alta pressão (à quente). Os resultados demonstraram que as nanopartículas preparadas com ácido ursólico, apresentaram características de potencial estabilidade química e obtiveram eficiência de encapsulação de 80% de ácido ursólico para as nanopartículas poliméricas e 100% para os carreadores lipídicos nanoestruturados. A caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas foi realizada determinando-se diâmetro da partícula ($353,4 \pm 1,4$ nm), índice de polidispersividade ($0,106 \pm 0,008$) e potencial zeta ($-35,6 \pm 1,2$ mV) e para os carreadores lipídicos nanoestruturados as formulações obtidas apresentaram intervalo de resposta, respectivamente: $125,3 \pm 40,4$ e $237,4 \pm 62,7$ nm; $0,01$ e $0,38$ e $-20,5 \pm 9,2$ e $-50,7 \pm 9,5$ mV. No planejamento factorial observou-se para otimização dos agentes tensoativos efeito quadrático da variável independente dodecil sulfato de sódio no potencial zeta. A metodologia de superfície de resposta permitiu a obtenção de modelo matemático de segunda ordem para a previsão de valores de potencial zeta em função das concentrações de SDS e de Lutrol®. Dessa forma, foi possível a preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo reduzida concentração de SDS e valor de potencial zeta menor que -40 mV. Pode-se concluir do estudo termooanalítico que o AU se manteve estável até temperatura de 250°C se comportando de maneira semelhante as vitaminas C e E, além de ter-se demonstrado ser excelente ferramenta para caracterizar o ácido ursólico, avaliar o teor de água e a estabilidade da formulação-base, podendo ser empregadas em análises de rotina em indústrias cosméticas.

Palavras-chave: carreadores lipídicos nanoestruturados, nanopartículas poliméricas, planejamento experimental, estudo termooanalítico e ácido ursólico.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo “nanopartícula” inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanocápsulas são carreadores nanoparticulados submicrônicos compostos de um núcleo oleoso circundado por uma parede polimérica com tensoativos lipofílicos ou hidrofílicos na interface (LEGRAND *et al.*, 1999). As nanoesferas que não apresentam óleo na sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003) (**Figura 1**).

Figura 1. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

Nos últimos anos tem havido considerável interesse no desenvolvimento de partículas poliméricas em escala nanométrica como sistema efetivo de liberação controlada de fármacos, promovendo sua melhor absorção ou atuando na modulação da distribuição pelo corpo (PUISIEUX *et al.*, 1994). Os polímeros utilizados na encapsulação consistem, geralmente, de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, que são degradados *in vivo* em fragmentos menores facilmente excretados, ou mesmo metabólitos, naturais do organismo.

Vários polímeros tem sido usados nessas pesquisas com aumento do benefício terapêutico e diminuição de efeitos colaterais (KREUTER, 1994). Podem ser de origem natural, semi-sintética ou, mais comumente, sintética, destacando-se os poliésteres como ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PLG) e seus

copolímeros, ácidos poli(lático-co-glicólico) PLGA, e também, a poli- ϵ -caprolactona (P ϵ CL) (PILLAI & PANCHAGNULA, 2001).

As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído muita atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), preparação rápida e fácil, e ao baixo custo quando comparadas aos lipossomas. Nanopartículas geralmente variam em tamanho de 10 a 1000 nm.

A parede polimérica confere à nanopartícula polimérica muito mais estabilidade que nanoemulsões e lipossomas, onde o núcleo interno tem uma grande capacidade carreadora, de acordo, com a solubilidade do fármaco no núcleo (COUVREUR *et al.*, 1996). Uma das vantagens das nanocápsulas sobre as nanoesferas é o baixo conteúdo polimérico e a elevada capacidade de carregamento de fármacos lipofílicos devido ao núcleo oleoso interno. Outras vantagens de reter o fármaco dentro de uma cavidade central é que um efeito de explosão pode ser evitado, pois o fármaco não está em contato direto com tecidos e, por essa razão, a irritação no sítio de administração será reduzida, além de estar protegido de degradação durante armazenamento e após a administração (BLOUZA *et al.*, 2006).

O principal obstáculo que limita o uso de tais vetores é a instabilidade em meio aquoso, pois pode ocorrer agregação e fusão das partículas após um longo período de armazenamento (ABDELWAHED *et al.*, 2006). Além disso, essas suspensões apresentam outras desvantagens durante o armazenamento, tais como contaminação microbiológica e hidrólise polimérica não-enzimática (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007).

A biodegradação de nanopartículas no organismo é essencial para reduzir o risco de danos ao tecido devido ao sobrecarregamento celular polimérico. Deve haver coerência entre o material das nanopartículas e o tempo de meia vida do fármaco, pois deve alcançar o sítio de ação antes que este processo ocorra (MAGENHEIM & BENITA, 1991). A degradação da poli- ϵ -caprolactona *in vivo* é lenta, sendo adequada para processos de liberação controlada, com tempo de meia vida de 1 a 2 anos (CHANDRA & RUSTGI, 1998).

1.2 Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

O uso de matrizes lipídicas sólidas para a liberação prolongada de medicamentos é conhecido na área farmacêutica há muitos anos; com base nisso, era apenas uma questão de tempo até que a produção de nanopartículas lipídicas fosse iniciada (ELDEM *et al.*, 1991). A primeira geração de nanopartículas lipídicas produzidas foram os chamados *nanopellets* lipídicos para administração por via oral (SPEISER, 1990). No início da década de 1990, uma segunda geração foi desenvolvida, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), produzidas por homogeneização à alta pressão (MULLER & LUCKS, 1996) ou, alternativamente, utilizando a técnica de precipitação microemulsão de Gasco (GASCO, 1993).

O desenvolvimento da NLS superou muitos problemas relacionados com a tecnologia carreadora "tradicional" das nanopartículas que limitava a sua utilização (ex., lipossomas e emulsões) ou, até mesmo, impediu a sua introdução no mercado (ex., nanopartículas poliméricas) (**Figura 2**). As NLS podem ser preparadas a partir de matérias-primas seguras, sendo que o conceito "química verde" pode ser aplicado, pois estas não utilizam solvente orgânico como as nanopartículas poliméricas, não ocorrendo a presença de seus resíduos no produto final, o que confere maior segurança. A produção em larga escala pela homogeneização à alta pressão é possível, mesmo usando linhas de produção existentes para emulsões, sendo a tecnologia e os produtos utilizados de baixo custo. Entretanto, existem também algumas dificuldades como, limitação na capacidade de incorporação de fármacos; expulsão destes durante o armazenamento e alto teor de água na dispersão aquosa (**Figura 3**) (MULLER, RADTKE & WISSING, 2002).

Figura 2. Carreadores tradicionais versus Nanopartículas lipídicas (MULLER, RADTKE & WISSING, 2002)

Figura 3. NLS: tendência a formar cristais perfeitos e expulsão do ativo (MULLER *et al.*, 2007)

Estas dificuldades, conseqüentemente, propiciaram uma nova e melhorada geração de nanopartículas lipídicas, como o carreador lipídico nanoestruturado (CLN). Em contraste as NLS, produzidas a partir de lipídios sólidos, os NLC são preparados empregando mistura de lipídios sólidos (ácidos graxos saturados) e líquidos (ácidos graxos insaturados). Estes apresentam as seguintes vantagens, quando comparadas as NLS: maior eficiência de encapsulação da substância ativa, maior controle da sua liberação, menor liberação do mesmo durante o armazenamento do produto e menor concentração de água na formulação (FANG *et al.*, 2008; PARDEIKE, HOMMOSS & MÜLLER, 2009).

O primeiro composto formulado em NLC foi o retinol. A capacidade de carga do retinol na NLS produzida a partir de behenato de glicerila (Compritol®) foi apenas de aproximadamente 1%. O CLN produzido a partir de uma mistura de Compritol® e triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (Miglyol® 812) a elevou para 5% (JENNING, 1999).

O CLN é considerado o mais inteligente, e mais recente geração de nanopartículas lipídicas que possuem propriedades melhoradas para o carregamento de fármacos, modulação do perfil de liberação e incorporação estável de princípios ativos durante o armazenamento (MULLER, RADTKE & WISSING, 2002).

Dessa forma, esses nanocarreadores têm sido empregados na preparação de cosméticos visando elevar a eficácia desses produtos. (SCHMALTZ *et al.*, 2005).

1.3 Preparo de Nanopartículas

1.3.1 Nanopartículas poliméricas

Existem vários métodos para a preparação de nanopartículas poliméricas, que podem ser divididos em duas classes principais (LEGRAND *et al.*, 1999): a primeira engloba a maioria dos métodos, que consistem em reações de polimerização, enquanto a segunda baseia-se na precipitação interfacial de polímeros pré-formados, denominada nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1989).

A nanoprecipitação baseia-se na precipitação e formação cineticamente controlada, de vesículas de tamanho coloidal constituídas por uma fase oleosa revestida por uma camada polimérica em um ambiente externo aquoso. A técnica consiste na mistura de uma fase orgânica (contendo um solvente orgânico, óleo, tensoativo lipofílico e polímeros insolúveis no óleo e na água) miscível em uma fase aquosa (contendo tensoativo hidrofílico). Após a mistura das duas fases, o polímero precipita na interface pela redução da sua solubilidade na mistura de solventes, sendo que a difusão mútua dos solventes fornece energia favorável para a formação de nanogotas de óleo que servem como núcleo para a precipitação do polímero. Nota-se, imediatamente, o surgimento de uma suspensão leitosa, opalescente devido à formação das nanocápsulas. Em seguida, o solvente é removido sob pressão reduzida e a suspensão é concentrada por meio da evaporação de parte da água (FESSI *et al.*, 1989) (**Figura 4**).

Figura 4. Representação esquemática do método empregado na preparação de nanocápsulas baseado na precipitação do polímero pré-formado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

1.3.2 Carreadores lipídicos nanoestruturados

O principal método de preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados é homogeneização à alta pressão. Neste processo, uma dispersão de partículas é impulsionada com alta pressão, cerca de 1000 bar, e acelerada contra uma barreira. A colisão com a barreira resulta na produção de nanopartículas de diâmetro reduzido (MARCATO, 2009).

Nanopartículas lipídicas podem ser produzidas tanto à quente como à frio pela técnica de homogeneização à alta pressão como esquematizado (**Figura 5**). O composto ativo é dissolvido ou disperso numa mistura de lipídio líquido e lipídio sólido, os lipídios fundidos contendo o composto ativo são então dispersos na solução de tensoativos a mesma temperatura, sob agitação de alta velocidade. A emulsão obtida (geralmente chamada de pré-emulsão) passa pelo homogeneizador sob alta temperatura ajustado na mesma temperatura (PARDEIKE, HOMMOSS & MÜLLER, 2009).

Figura 5. Processo de produção de nanopartículas lipídicas usando a homogeneização à quente e à frio (PARDEIKE, HOMMOSS & MÜLLER, 2009)

O método de homogeneização à alta pressão apresenta inúmeras vantagens em relação às outras técnicas de preparação de nanopartículas. Dentre elas, pode-se citar: possibilidade de produção de nanopartículas em larga escala, tempo de produção reduzido e não uso de solventes orgânicos. Este método é amplamente utilizado em muitas indústrias, inclusive na farmacêutica na produção de emulsões para nutrição parenteral (PARDEIKE, HOMMOSS & MÜLLER, 2009).

1.4 Caracterização das Nanopartículas

1.4.1 Tamanho médio de partícula

O tamanho das nanopartículas varia geralmente entre 100 e 500nm e depende de vários fatores, como: método de preparação, natureza e concentração do polímero e do fármaco encapsulado, concentração de tensoativos, proporção entre solvente orgânico e água, concentração de óleo na solução orgânica, além da velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa (LEGRAND *et al.*, 1999).

Estudos têm sido desenvolvidos para a avaliação dos principais fatores que afetam o diâmetro das partículas de sistemas nanoestruturados. A composição quali-quantitativa e o método de preparação das nanopartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersividade das partículas. No caso das nanopartículas, um fator importante que influencia o diâmetro das partículas é a natureza do óleo utilizado como núcleo. Os resultados são atribuídos às diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial das substâncias empregadas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Uma observação importante é que a adição do monômero à emulsão (método de polimerização interfacial) ou, ainda, a presença do polímero (método de deposição interfacial de polímero pré-formado) pode conduzir a diminuição de tamanho de partícula em relação a emulsão, devido, provavelmente, à redução da energia livre interfacial do sistema, no primeiro caso, ou mediante um efeito estabilizador do polímero ao redor das gotículas, no segundo (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). De uma forma geral, as nanopartículas obtidas por meio de diferentes métodos, após a preparação, apresentam uma distribuição unimodal, com baixo índice de polidispersividade.

1.4.2 Potencial zeta (ζ)

Um método eficiente para avaliar as nanopartículas é a determinação do potencial zeta (ζ) de superfícies aquosas contendo nanopartículas (Legrand *et al.*, 1999). O potencial zeta pode ser uma maneira efetiva de controlar o comportamento de nanopartículas, pois indica mudanças no potencial de superfície e na força de repulsão entre as partículas (FLORENCE & ATTWOOD, 2003; ZETA-METER, 2006).

A medida de potencial zeta permite avaliar a estabilidade das dispersões coloidais. Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para a estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Elevados valores de potencial zeta, acima de 30mV, positivos ou negativos, sugerem suspensões de nanocápsulas mais estáveis, devido a repulsão entre as partículas que previne sua agregação (LEGRAND *et al.*, 1999).

Os valores de potencial zeta podem ser positivos ou negativos, dependendo da natureza do polímero e do material usado para modificação de sua superfície (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Os fosfolípidios, os poloxâmeros (copolímeros dos óxidos de etileno e propileno) e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes que podem afetar o potencial zeta, por estarem envolvidos na formação do envoltório e adsorvidos a ele. Enquanto polímeros e lecitinas favorecem uma carga negativa na interface, o poloxâmero, um tensoativo não-iônico tende a reduzir, em valor absoluto, o potencial ζ (LEGRAND *et al.*, 1999).

1.4.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

A análise térmica é definida como “grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto essa substância é submetida a um programa controlado de temperatura (e sob uma atmosfera específica). Para que uma técnica seja considerada termoanalítica é necessário, segundo a definição, envolver a medição de uma propriedade física, expressa direta ou indiretamente em função da

temperatura, e executada sob um programa controlado desta variável (SILVA *et al.*, 2007).

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Termogravimetria (TG) são as técnicas termoanalíticas mais difundidas e empregadas no desenvolvimento de diferentes estudos sendo aplicadas a uma grande variedade de materiais farmacêuticos (SILVA *et al.*, 2007).

A Termogravimetria fornece informações com relação às variações de massa em função do tempo e/ou temperatura sob um programa controlado de temperatura e em determinadas condições atmosféricas. As medidas são executadas por meio de uma termobalança de elevada sensibilidade, reprodutividade e resposta rápida às variações de massa. As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição química e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado. A DTG é a derivada primeira da curva TG. Nessa curva os “degraus” correspondentes às variações de massa da curva TG são substituídos por picos que determinam áreas proporcionais às variações de massa, tornando as informações, visualmente mais acessíveis e com melhor resolução (RODRIGUES *et al.*, 2005).

A DSC é a técnica de análise térmica, na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação de aquecimento controlado.

Mothé e colaboradores realizaram o estudo termoanalítico (TG/DTG) de um creme anticelulite à base de *Ginkgo biloba*, *Centella asiatica* e *Fucus vesiculosus*. A técnica auxiliou no estudo da estabilidade térmica e da composição do produto (MOTHÉ *et al.*, 2006). Guillen, Batista e Matos, avaliaram o comportamento térmico das substâncias DMAE e ácido ascórbico isoladamente e incorporados em emulsões ou géis. Os autores utilizaram a DSC, a TG e DTG, e os resultados foram importantes para confirmar o grau de pureza destas substâncias, além de contribuir para os estudos de pré-formulação. Segundo os autores, a previsão da estabilidade térmica dos componentes pode auxiliar no controle dos parâmetros dos processos industriais (GUILLEN, BATISTA & MATOS, 2006).

Almeida e colaboradores demonstraram que a análise térmica é uma excelente ferramenta para a caracterização de vitaminas e de creme base podendo ser empregada em análises de rotina no controle de qualidade (ALMEIDA *et al.*, 2010).

2 OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar as nanopartículas poliméricas e os carreadores lipídicos nanoestruturados incorporados de ácido ursólico, otimizando a concentração dos agentes tensoativos (Lecitina de soja, Dodecil sulfato de sódio, Polímero de metiloxirano com oxirano, Monooleato de sorbitano) dos últimos, por meio do planejamento experimental.

3 MATERIAL

3.1 Matérias-primas - (*INCI – International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*)

Todas as matérias-primas são de grau farmacêutico.

- Ácido ursólico -- (*Ursolic acid*) teor de pureza de 90%, HighChem;
- Dodecil sulfato de sódio – (*Sodium dodecil sulfate*) (SDS) 99%, Merck;
- Lecitina de soja – (*Lecithin*), Mapric;
- Monoestearato de sorbitano – (*Sorbitan monoestearate*) (Span[®] 60), J.T.Baker;
- Monooleato de sorbitano – (*Polysorbate 80*) (Tween[®] 80), J.T.Baker;
- Oleato de sorbitan – (*Sorbitan oleate*) (Polissorbato[®] 80), J.T.Baker;
- Palmitato de cetila – (*Cetyl palmitate*), Mapric;
- Poli ϵ -caprolactona -- (*Poly ϵ -caprolactone*) Massa Molar: 60 000 Dalton;
- Polímero de metiloxirano com oxirano – (*Poloxamer 188*), (Lutrol[®] Micro 68 MP), Basf;
- Triglicérides dos ácidos cáprico/caprílico – (*Caprylic/capric trygliceride*), Mapric;

3.2 Solventes e reagentes

- Acetona, padrão de pureza analítico 99,5%, Synth;
- Acetonitrila grau de pureza cromatográfico 99%, Synth;
- Ácido fosfórico grau de pureza cromatográfico 99%, Synth;
- Água MilliQ®;
- Metanol grau de pureza cromatográfico 99%, Synth;

3.3 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Agitador Magnético, Quimis®;
- Agitador Turrax®;
- Balança analítica, Shimadzu®, precisão 1 mg-220 g;
- Banho termostático incubador digital com movimento orbital circular, velocidade regulável de 20 a 200 rpm e graduação de temperatura entre 25 à 60°C (501/D) – Nova Ética;
- Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm);
- *Coulter N4 Plus*;
- Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência, Shimadzu®, detector ultravioleta (UV) variável com integrador CBM-20A, gerido por software LCsolution;
- Equipamento de calorimetria exploratória diferencial modelo DSC-50, Shimadzu®, software TA-60-Shimadzu;
- Evaporador rotatório, Buchi®;
- Membrana filtrante com abertura 0,45 µm, Millipore®;
- pHmetro, Quimis®;
- Placa de Aquecimento, Quimis®;
- Sistema filtrante *Ultracel Microcon* YM-10 Q®, Millipore®;
- Termobalança modelo TGA-51, Shimadzu®, software TA-60-Shimadzu;
- Ultracentrífuga, VWR™ – modelo Galaxy 16D;
- Zetasizer Nano ZS - Malvern Instruments, Malvern®;

3.4 Formulação-base

A seguir, estão descritos os componentes da formulação-base com grau de pureza farmacêutico (**Tabela 1**), utilizadas na incorporação das nanopartículas desenvolvidas no estudo. Todas as formulações-base foram desenvolvidas pelo autor.

Tabela 1. Componentes da *Formulação-Base*

	Substância	INCI	% p/p	Função
FO	Óleo de oliva	<i>Olea europaea</i> (Olive) Fruit Oil	2,50	emoliente
	Olivato de Cetearila/Olivato de Sorbitano	Cetearyl Olivato/Sorbitan Olivato	7,00	emulsionante
	Álcool cetílico	Cetyl Alcohol	5,00	emoliente
	Triglicérides dos ácidos cáprico/caprílico	Caprylic/capric Triglyceride	2,50	emoliente
	Soiato de metila	Methyl Soyate	6,30	emulsionante
	Vitamina E	Tocopheryl Acetate	0,05	antioxidante
	Ácido ursólico (Livre ou Nanoparticulado)	Ursolic Acid	1,00	antioxidante e antimicrobiano (PA)
FA	Goma xantana	Xanthan Gum	0,25	espessante
	EDTA Na ₂	Dissodium EDTA	0,10	antioxidante/quelante
	Sorbitol	Sorbitol	10,30	umectante
	Fenoxietanol/ 2-Metil-4-Isotiazolin-3-ona	Phenoxyethanol/ 2-Methyl-4-Isotiazolin-3-one	0,30	conservante
	Água desmineralizada	Aqua	q.s.p. 100,0	veículo

Legenda: FO – Fase Oleosa/ FA – Fase Aquosa/ INCI- International Nomenclature of Cosmetic Ingredient/ SA – substância ativa

4 MÉTODOS

4.1 Preparação das nanopartículas poliméricas

As nanopartículas foram obtidas pelo método de precipitação de polímeros pré-formados, compreendendo duas fases: aquosa e orgânica.

Transferiram-se 0,077 g exatamente pesados de monooleato de sorbitano para um béquer de 100 mL. Adicionaram-se 53,0 mL de água destilada. O sistema foi homogeneizado empregando barra e agitador magnético, obtendo-se desta forma a fase aquosa.

Foram transferidos exatamente 0,1 g de poli- ϵ -caprolactona; 0,077 g de monoestearato de sorbitano; 0,3333g dos triglicérides dos ácidos cáprico e caprílicos e o ácido ursólico para um béquer de 50 mL. Transferiram-se 27 mL de acetona e o sistema foi submetido à agitação em banho-maria, por 30 minutos a 40°C, obtendo-se a fase orgânica.

Após a completa solubilização das fases, verteu-se a orgânica sobre a aquosa empregando funil de vidro. Agitou-se empregando agitador magnético a suspensão obtida por 10 minutos, após esse intervalo transferiu-se, cuidadosamente, a suspensão obtida para um balão de fundo redondo com capacidade de 1 L, que foi submetido ao evaporador rotatório a 37°C, até obter volume final de 10 mL e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 10,0 mL, suficiente para as análises (GUTERRES, ALVES & POHLMANN, 2007).

4.2 Matriz de ensaios para obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados

A matriz de ensaios (**Tabela 2**) para a obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ácido ursólico foi obtida por meio do software Minitab[®] utilizando planejamento experimental *Plackett-Burman* (resolução classe 3) para a avaliação dos tensoativos: SDS, Lutrol[®], Tween[®] e a Lecitina de soja (4 fatores principais), escolhidos de acordo com a orientação da literatura científica de estudos otimizados no tamanho médio de partícula e no potencial zeta da nanoestrutura (ZHANG *et al.*, 2010).

Tabela 2. Matriz de ensaios para a obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Matriz	LEC	SDS	LUT	TW
	(% p/p)			
1	0,25	1,00	1,50	2,50
2	0,25	0,25	2,50	2,50
3	1,00	1,00	2,50	2,50
4	1,00	0,25	2,50	1,50
5	0,25	0,25	1,50	1,50
6	0,25	1,00	2,50	1,50
7	1,00	0,25	1,50	2,50
8	1,00	1,00	1,50	1,50
9	0,63	0,63	2,00	2,00
10	1,00	1,00	2,50	1,50
11	0,25	0,25	2,50	1,50
12	0,25	0,25	1,50	2,50
13	0,25	1,00	2,50	2,50
14	1,00	1,00	1,50	2,50
15	1,00	0,25	2,50	2,50
16	0,25	1,00	1,50	1,50
17	1,00	0,25	1,50	1,50
18	0,63	0,63	2,00	2,00
19	1,25	1,25	4,00	4,00
20	1,25	1,25	4,00	4,00
21	1,25	1,25	4,00	4,00
22	1,25	1,25	4,00	4,00
23	2,75	1,25	4,00	4,00
24	1,25	0,00	4,00	4,00
25	1,25	1,25	2,00	4,00
26	1,25	1,25	6,00	4,00
27	1,25	1,25	4,00	2,00
28	0,00	1,25	4,00	4,00
29	1,25	2,75	4,00	4,00
30	1,25	1,25	4,00	6,00

Legenda: **LEC** – Lecitina de soja/ **SDS**- Dodecil sulfato de sódio/ **LUT** - Lutrol®- Polímero de metiloxirano com oxirano / **TW** - Tween 80®- Monooleato de sorbitano

4.3 Preparação dos Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

A partir das matrizes apresentadas na **Tabela 2**, foram obtidas as preparações da **Tabela 3** da seguinte forma: foram transferidos exatos 12,0 g de palmitato de cetila (ácido graxo saturado); 8,0 g de triglicérides dos ácidos cáprico caprílico (ácido graxo insaturado); 0,2 g de ácido ursólico e a lecitina de soja para bquer de 200 mL, sendo a mistura (Fase Oleosa) aquecida at 85C empregando placa de aquecimento Quimis (HAN *et al.*, 2008). Em outro bquer de 250 mL, foram transferidas a gua, o SDS, o Lutrol e o Tween 80 (Fase Aquosa), nas preparaes indicadas na **Tabela 3**. Esta disperso foi aquecida em placa de aquecimento at 85C e homogeneizada com auxlio do agitador magntico a 500 rpm, por aproximadamente 5 minutos (at completa disperso dos tensoativos). A fase aquosa foi dispersa na fase lipdica, sob agitao mecnica (8000 rpm) utilizando agitador Turrax, de modo a formar uma pr-emulso (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2008). Esta foi submetida homogeneizao alta presso utilizando trs ciclos sucessivos a 500 bar (HAN *et al.*, 2008). A massa final de cada lote foi de 200 g, devido esta ser a capacidade mnima do homogeneizador.

Tabela 3. Formulação dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os agentes tensoativos e o ácido ursólico

Preparação	TACC	PC	AU (g)	LEC	SDS	LUT	TW	Água
1				0,5	2,0	3,0	5,0	169,3
2				0,5	0,5	5,0	5,0	168,8
3				2,0	2,0	5,0	5,0	165,8
4				2,0	0,5	5,0	3,0	169,3
5				0,5	0,5	3,0	3,0	172,8
6				0,5	2,0	5,0	3,0	169,3
7				2,0	0,5	3,0	5,0	169,3
8				2,0	2,0	3,0	3,0	169,8
9				1,3	1,3	4,0	4,0	169,3
10				2,0	2,0	5,0	3,0	167,8
11				0,5	0,5	5,0	3,0	170,8
12				0,5	0,5	3,0	5,0	170,8
13				0,5	2,0	5,0	5,0	167,3
14				2,0	2,0	3,0	5,0	167,8
15	8,0	12,0	0,2	2,0	0,5	5,0	5,0	167,3
16				0,5	2,0	3,0	3,0	171,3
17				2,0	0,5	3,0	3,0	171,3
18				1,3	1,3	4,0	4,0	169,2
19				1,3	1,3	4,0	4,0	169,2
20				1,3	1,3	4,0	4,0	169,2
21				1,3	1,3	4,0	4,0	169,2
22				1,3	1,3	4,0	4,0	169,2
23				2,7	1,3	4,0	4,0	167,8
24				1,3	0,0	4,0	4,0	170,5
25				1,3	1,3	2,0	4,0	171,2
26				1,3	1,3	6,0	4,0	167,2
27				1,3	1,3	4,0	2,0	171,2
28				0,0	1,3	4,0	4,0	170,5
29				1,3	2,7	4,0	4,0	167,8
30				1,3	1,3	4,0	6,0	167,2

Legenda: **PC** – Palmitato de cetila/ **AU** – Ácido ursólico/ **TACC**- Triglicérides dos ácidos cáprico caprílico/ **LEC** – Lecitina de soja/ **SDS**- Dodecil sulfato de sódio/ **LUT** - Lutrol®- Polímero de metiloxirano com oxirano/ **TW** - Tween 80®- Monooleato de sorbitano; Água MilliQ®; Massa total 200 g

4.4 Caracterização físico-química das suspensões de nanopartículas

4.4.1 Eficiência de encapsulação do ácido ursólico às nanopartículas

A fase aquosa da suspensão foi avaliada por meio de ultracentrifugação a 15.000 rpm por 15 minutos das nanopartículas em suspensão em uma ultracentrífuga, utilizando *Ultracel Microcon YM-10 Q*[®]. A eficiência de encapsulação às nanopartículas foi determinada pela diferença entre o total do ácido ursólico adicionado e o encapsulado. A amostra do sobrenadante (teor da substância ativa não ligado à nanopartícula) foi analisada empregando o método validado no Capítulo I. Da mesma forma, as amostras tratadas com acetonitrila foram analisadas utilizando o mesmo procedimento, tendo em vista a determinação do teor total de ácido ursólico na suspensão de nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003) .

4.4.2 Tamanho médio de partícula e o índice de polidispersidade

O tamanho médio das partículas e o índice de polidispersividade foram determinados por espalhamento dinâmico de luz, diluindo as amostras das suspensões recém-preparadas e observando à luz espalhada no ângulo de 90°C. Os resultados corresponderam à média de três determinações. O tamanho das partículas foi determinado empregando equipamento *Coulter N4 Plus*. Este equipamento pode analisar partículas em suspensão/emulsão e moléculas em solução com diâmetros variando na faixa entre 3 e 3000 nm, sendo a determinação do tamanho médio realizado com base na medida da velocidade de difusão das partículas.

Neste experimento a análise da amostra coletada foi diluída com água milliQ[®] e conduzida a um equipamento de difração de luz dinâmica para a determinação do tamanho médio das partículas, à temperatura ambiente. O ângulo de incidência do laser utilizado foi de 90° com uma faixa de luz espalhada igual a $5,0 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^6$ pulsos/seg (faixa de velocidade recomendada em que os fótons de luz atinjam o fotomultiplicador). Para cada amostra foram realizadas três medições em dias consecutivos e a média resultante foi utilizada nos cálculos adicionais (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2008).

4.4.3 Potencial zeta

O potencial zeta (potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, indica estabilidade física de sistemas coloidais) (ZHANG *et al.*, 2010) foi medido empregando equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). As amostras foram diluídas em água MilliQ[®], antes da medição, visando à otimização da intensidade do sinal. Para cada amostra foram efetuadas três medições em dias consecutivos e a média resultante foi utilizada nos cálculos adicionais.

4.4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

Os perfis das curvas TG/DTG foram obtidos por um equipamento da marca Shimadzu, modelo TGA-51, nas seguintes condições experimentais: atmosfera dinâmica de ar (vazão de 50 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, intervalo de temperatura de 25 a 600°C e cadinho de Pt contendo cerca de 17 mg de cada amostra. As amostras utilizadas foram: ácido ursólico livre, ácido ursólico na formulação-base, ácido ursólico em nanopartícula polimérica, ácido ursólico em nanopartícula polimérica na formulação-base, ácido ursólico em carreador lipídico nanoestruturado e ácido ursólico em carreador lipídico nanoestruturado na formulação-base. Sendo o carreador lipídico nanoestruturado utilizado para o ensaio a Formulação 2 otimizada pelo planejamento descrito na **Tabela 10**, por possuir ótimo potencial zeta (-50,0 mV) e índice de polidispersividade (0,2).

As curvas DSC das amostras foram obtidas por uma célula DSC da marca Shimadzu, modelo 50, nas seguintes condições experimentais: amostras de aproximadamente 2 mg em cápsula de Al parcialmente fechada, razão de aquecimento de 10°C/min, intervalo de temperatura de 25 até 600°C, sob atmosfera dinâmica de N₂.

Para ambas as técnicas, as curvas do branco foram obtidas nas mesmas condições utilizando um cadinho vazio e os dados foram tratados utilizando o software TA-60-Shimadzu (SILVA *et al.*, 2007; MATOS & MACHADO, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanopartículas poliméricas (**Figura 6**) e carreadoras lipídicos nanoestruturados (**Figura 7**) foram obtidas segundo método descrito no **item 4.1**. Estas são brancas e possuem aspecto leitoso.

Figura 6. Nanopartículas poliméricas

Figura 7. Carreadores lipídicos nanoestruturados

5.1 Caracterização físico-química das suspensões de nanopartículas

A eficiência de encapsulação da substância ativa nas nanopartículas poliméricas foi de 80%. Esta taxa foi obtida calculando-se a quantidade da substância ativa encontrado no sobrenadante da suspensão, após centrifugação a 15.000 rpm por 15 min, utilizando sistema filtrante *Ultracel Microcon YM-10 Q®*. Diluiu-se 200 μ L deste sobrenadante em 200 μ L de acetonitrila e 200 μ L de fase móvel e injetou-se no cromatógrafo a líquido de alta eficiência, empregando o método validado descrito no Capítulo I. A eficiência de encapsulação da substância ativa nos carreadores lipídicos nanoestruturados foi aparentemente de 100% empregando-se o mesmo método e nenhum pico de ácido ursólico foi encontrado como observado de forma semelhante nos cromatogramas do item 5.3 Capítulo I.

As suspensões de nanopartículas poliméricas foram caracterizadas determinando-se o diâmetro da partícula, o índice de polidispersividade, o potencial zeta e a eficiência de encapsulação da substância ativa, sendo apresentada nas **Tabela 4**.

Tabela 4. Diâmetro médio da partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas poliméricas contendo ácido ursólico ($\pm$ DP, n=3)

Nanopartícula polimérica		
D. $\pm$ DP(nm)	ÍP	Pz $\pm$ DP(mV)
353,4 $\pm$ 1,4	0,106 $\pm$ 0,008	-35,6 $\pm$ 1,2

Legenda: **D.** – Diâmetro médio da nanopartícula/ **DP** - desvio-padrão/ **ÍP** – Índice de polidispersividade/ **Pz** – Potencial zeta

Os resultados obtidos relativos à caracterização física das preparações das nanoestruturas estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Tamanho e potencial zeta das nanoestruturas obtidas (n=3) nas preparações contendo o ácido ursólico, lipídeos, tensoativos e água

Carreadores lipídicos nanoestruturados							
Prep.	LEC	SDS	LUT	TW	D. ±DP(nm)	Pz ±DP(mV)	IP
	(g)						
1	0,5	2,0	3,0	5,0	174,0 ±52,3	-45,4±9,6	0,14±0,2
2	0,5	0,5	5,0	5,0	182,8±65,8	-40,1±13,7	0,35±2,7
3	2,0	2,0	5,0	5,0	133,7±41,9	-37,3±13,1	0,25±0,0
4	2,0	0,5	5,0	3,0	180,8±58,7	-36,6±15,3	0,18±0,0
5	0,5	0,5	3,0	3,0	202, 3±73,6	-48,0±10,2	0,28±0,6
6	0,5	2,0	5,0	3,0	180,6±56,5	-32,8±13,1	0,10±0,0
7	2,0	0,5	3,0	5,0	135,7±45,3	-24,0±9,5	0,21±0,1
8	2,0	2,0	3,0	3,0	131,5±42,7	-36,8±11,1	0,24±1,4
9	1,3	1,3	4,0	4,0	140,8±47,3	-48,6±11,6	0,21±0,3
10	2,0	2,0	5,0	3,0	125,3±40,4	-33,5±12,9	0,18±0,1
11	0,5	0,5	5,0	3,0	171,1±47,7	-36,0±12,0	0,06±0,0
12	0,5	0,5	3,0	5,0	184,4±56,9	-46,9±19,3	0,24±1,0
13	0,5	2,0	5,0	5,0	142,1±53,8	-33,6±10,1	0,19±0,3
14	2,0	2,0	3,0	5,0	185,1±58,6	-30,6±9,1	0,19±2,8
15	2,0	0,5	5,0	5,0	150,4±47,7	-41,5±11,2	0,24±0,1
16	0,5	2,0	3,0	3,0	169,8±54,6	-37,6±12,1	0,18±0,2
17	2,0	0,5	3,0	3,0	227,3±73,6	-42,3±12,4	0,06±0,1
18	1,3	1,3	4,0	4,0	163,5±51,2	-46,1±12,9	0,24±0,3
19	1,3	1,3	4,0	4,0	153,4±48,0	-46,2±8,4	0,16±0,0
20	1,3	1,3	4,0	4,0	163,6±54,8	-41,5±8,2	0,21±0,0
21	1,3	1,3	4,0	4,0	157,9±52,7	-46,7±8,5	0,21±0,0
22	1,3	1,3	4,0	4,0	157,7±51,8	-47,8±13,1	0,19±0,1
23	2,7	1,3	4,0	4,0	152,4±51,8	-46,8±11,2	0,22±0,0
24	1,3	0,0	4,0	4,0	159,4±53,7	-27,8±10,0	0,21±0,0
25	1,3	1,3	2,0	4,0	209,2±66,6	-50,5±9,2	0,38±0,5
26	1,3	1,3	6,0	4,0	152,5±53,8	-44,3±9,9	0,25±0,0
27	1,3	1,3	4,0	2,0	171,6±53,6	-48,7±11,3	0,16±0,2
28	0,0	1,3	4,0	4,0	190,6±53,9	-48,8±9,5	0,38±1,5
29	1,3	2,7	4,0	4,0	194,8±63,8	-20,5±9,2	0,37±0,8
30	1,3	1,3	4,0	6,0	237,4±62,7	-50,7±9,5	0,38±2,5

Legenda: Prep. – Preparação/ LEC – Lecitina de soja/ SDS- Dodecil sulfato de sódio/ LUT - Lutrol®- Polímero de metiloxirano com oxirano / TW - Tween 80®- Monooleato de sorbitano/ D. – Diâmetro médio da nanopartícula/ DP - desvio-padrão/ Pz – Potencial zeta/ IP – índice de polidispersividade

Todas as formulações obtidas apresentaram tamanho médio de partícula entre $125,3 \pm 40,4$ e $237,4 \pm 62,7$ nm (**Tabela 5**) e índice de polidispersividade entre 0,01 e 0,38. Com referência ao tamanho médio da partícula, valores similares foram obtidos por Fang *et al.* e Han *et al.* (2008; 2008) em pesquisa utilizando lecitina de soja e Tween 80® na obtenção de nanopartículas (entre 137,1 e 296,6 nm e 110,0 e 198,0 nm respectivamente). Devido aos estudos citados anteriormente terem sido realizados apenas de forma introdutória, utilizou-se a ferramenta do planejamento experimental para obtenção de estudo completo sobre a otimização dos tensoativos.

No caso dos resultados relativos ao índice de polidispersividade, valor igual ou menor a 0,200 pode indicar uniformidade adequada no tamanho das partículas, conforme descrito por Kovacevic *et al.* (2011). Considerando os resultados obtidos para o potencial zeta, valores, em módulo, maiores que 130 mV indicam adequada estabilidade da formulação (TAN *et al.*, 2010; KOVACEVIC *et al.*, 2011). No presente trabalho as formulações apresentaram valores entre $-20,5 \pm 9,2$ e $-50,7 \pm 9,5$ mV (**Tabela 5**). Além das características acima apresentadas, foi observado, para todas as formulações, distribuição unimodal (**Figura 8**), significando desta maneira a obtenção de um produto homogêneo, não havendo agregação ou floculação das formulações, devido ao potencial zeta das preparações permanecerem em ótima faixa de valores como demonstrado em literatura (MISHRA & MITRA, 2010).

Figura 8. Gráfico do potencial zeta com distribuição unimodal dos carreadores lipídicos nanoestruturados

O planejamento experimental adotado teve como objetivo avaliar os efeitos principais, como dos tensoativos (Lecitina de soja, Tween 80®, Lutrol® e SDS) no tamanho médio de partícula e no potencial zeta das nanoestruturas obtidas, assim

como as interações entre os efeitos principais. A escolha dos tensoativos, e o desenvolvimento e caracterização de preparações para otimização dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ácido ursólico utilizando o planejamento experimental foram baseados nos trabalhos de Han *et al.* (2008) e Zhang *et al.* (2010), respectivamente. Zhang *et al.* (2010) otimizou formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo diidroartemisinina utilizando uma metodologia de superfície de resposta constituído de desenho fatorial de três níveis, enquanto que Han *et al.* (2008) estudou os efeitos dos tensoativos sobre a formação e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados.

Tendo em vista a possibilidade de liberação modificada do ácido ursólico, a formulação nanoestruturada apresenta potencial para elevar a segurança do produto. Nesse sentido, a liberação gradual da substância ativa expõe o consumidor à menor risco de sensibilização quando comparado à fórmula convencional, de liberação imediata. No que se refere à abordagem utilizada no presente trabalho, essa permitiu a obtenção de modelo matemático para a previsão de valor de potencial zeta em função das concentrações de SDS e de Lutrol®. Assim, é possível ajustar o potencial zeta do carreador lipídico nanoestruturado em função dessas concentrações. Esse ajuste pode ser utilizado, por exemplo, para obter nanopartículas com valores otimizados de potencial zeta utilizando as menores concentrações possíveis de SDS e/ou de Lutrol®. Considerando tal situação, foram obtidas as **Formulações 1 e 2 (Tabela 10)**. Sendo assim, a metodologia de superfície de resposta permitiu obter carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ácido ursólico com características adequadas para o desenvolvimento de produto inovador. (MULLER, RADTKE & WISSING, 2002; PARDEIKE, HOMMOSS & MÜLLER, 2009).

As **Figuras 9 e 10** apresentam os gráficos de série temporal e dos resíduos relativos à análise de variância, respectivamente, para os valores de potencial zeta relativos às 30 preparações (**Tabela 5**), na otimização das concentrações dos agentes tensoativos empregados no preparo das nanopartículas.

Figura 9. Gráfico de série temporal para os valores de potencial zeta das nanopartículas no estudo para a otimização das concentrações dos agentes tensoativos / *Legenda: PtType* – Tipo de ponto

Figura 10. Gráfico de resíduos relativos à análise de variância a) gráfico de probabilidade normal; b) dispersão dos resíduos; c) histograma; d) resíduos *versus* a ordem de observação

Na **Figura 9** é possível observar que os 6 pontos centrais (fórmulas com concentração média dos agentes tensoativos) apresentaram valores de potencial zeta entre -41,5 e -48,6 mV. Esses valores, situados na parte inferior do gráfico, indicaram efeito quadrático do modelo.

A análise dos resíduos (diferença entre a observação e a média do tratamento correspondente) foi efetuada a partir dos resultados obtidos na **Figura 10**. A importância dessa análise refere-se ao fato de que a violação da suposição de independência dos erros pode invalidar as inferências realizadas por meio da análise de variância apresentada na **Tabela 9**. Assim, deve-se confirmar a normalidade da distribuição dos resíduos, a variância dos resíduos deve ser constante, ou seja, a dispersão dos dados em torno da reta de regressão deve ser uniforme (ausência de heterocedasticidade) e a ausência de autocorrelação dos resíduos (MONTGOMERY, 2004).

A suposição de normalidade foi verificada por meio do gráfico de probabilidade normal e pelo histograma dos resíduos (**Figura 10a**, **Figura 10c**). No gráfico de probabilidade normal, o resíduo é representado em função de seu valor esperado, calculado a partir da suposição de que os resíduos seguem distribuição normal. Considerando os resultados obtidos (**Figura 10a**), a localização dos pontos em relação à curva de probabilidade permite inferir que a suposição de normalidade é válida. A avaliação do histograma (**Figura 10c**) corroborou tal suposição. No que se refere à variância, as **Figura 10b** e **10d** revelaram que os valores dos resíduos não são alterados em função das concentrações dos agentes tensoativos (KUTNER *et al.*, 1996).

As **Tabelas 6** e **7** apresentam os valores dos coeficientes de regressão e nível de significância na avaliação dos efeitos dos tensoativos no potencial zeta dos carreadores lipídicos nanoestruturados.

Tabela 6. Teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação da influência dos agentes tensoativos no potencial zeta de carreadores lipídeos contendo ácido ursólico

Termos	Coef	SECoef	T	p
Constante	-60,71	20,52	-2,960	0,010
LEC	7,15	6,26	1,143	0,271
SDS	-16,33	6,26	-2,608	0,020
LUT	4,112	5,596	0,735	0,474
TW	3,146	5,596	0,562	0,582
LEC*LEC	0,246	0,985	0,250	0,806
SDS*SDS	10,76	0,985	10,93	0,000
LUT*LUT	0,238	0,554	0,431	0,673
TW*TW	-0,336	0,554	-0,608	0,553
LEC*SDS	-1,366	1,289	-1,060	0,306
LEC*LUT	-1,808	0,967	-1,870	0,081
LEC*TW	0,592	0,967	0,612	0,550
SDS*LUT	-0,458	0,967	-0,474	0,642
SDS*TW	-1,125	0,967	-1,164	0,263
LUT*TW	-0,156	0,725	-0,215	0,832
<hr/>				
S = 2,900	PRESS = 594,4			
R-Sq = 91,70%	R-Sq(pred) = 60,92%		R-Sq(adj) = 83,96%	

Legenda: LEC – Lecitina de soja/ SDS- Dodecil sulfato de sódio/ LUT - Lutrol®- Polímero de metiloxirano com oxirano/ TW - Tween 80®- Monooleato de sorbitano/ **Coef** - coeficientes; **SE Coef** - desvio-padrão dos coeficientes; **p** - nível de significância; **T** - estatística T (teste t)- Coef./SE Coef;
Índices de ajuste do modelo: R-Sq (coeficiente de determinação), R-Sq(adj) (coeficiente de determinação ajustado); R-Sq (pred) (coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; S: desvio-padrão; PRESS: previsão do quadrado da soma dos erros

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para testar a significância da regressão na avaliação da influência dos agentes tensoativos no potencial zeta de nanocarreadores lipídicos contendo ácido ursólico

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
Regressão	14	1394,6	1394,6	99,62	11,84	0,000
Linear	4	279,95	84,07	21,02	2,50	0,087
LEC	1	19,26	10,99	10,99	1,31	0,271
SDS	1	86,26	57,20	57,20	6,80	0,020
LUT	1	157,59	4,54	4,54	0,54	0,474
TW	1	16,83	2,66	2,66	0,32	0,582
Quadrático	4	1058,9	1058,9	264,75	31,47	0,000
LEC*LEC	1	7,88	0,53	0,53	0,06	0,806
SDS*SDS	1	1045,7	1004,3	1004,3	119,39	0,000
LUT*LUT	1	2,30	1,56	1,56	0,19	0,673
TW*TW	1	3,11	3,11	3,11	0,37	0,553
Interação	6	55,71	55,71	9,28	1,10	0,405
LEC*SDS	1	9,46	9,46	9,46	1,12	0,306
LEC*LUT	1	29,43	29,43	29,43	3,50	0,081
LEC*TW	1	3,15	3,15	3,15	0,37	0,550
SDS*LUT	1	1,89	1,89	1,89	0,22	0,642
SDS*TW	1	11,39	11,39	11,39	1,35	0,263
LUT*TW	1	0,39	0,39	0,39	0,05	0,832
Er. res.	15	126,18	126,18	8,41		
Falta ajust.	10	95,53	95,53	9,55	1,56	0,326
Erro	5	30,66	30,66	6,131		
Total	29	1520,8				

Legenda: LEC – Lecitina de soja/ SDS- Dodecil sulfato de sódio/ LUT - Lutrol®- Polímero de metiloxirano com oxirano/ TW - Tween 80®- Monooleato de sorbitano/ **DF** - grau de liberdade; **Seq SS** - soma dos quadrados; **Adj SS** - soma dos quadrados ajustados; **F** - estatística F (teste F); **Adj. MS** - média quadrática ajustada; **p** - nível de significância; Er. res. – Erro residual; Falta ajust. – Falta de ajuste

As **Tabelas 6 e 7** utilizaram a metodologia de superfície de resposta que permite a modelagem e a análise de problemas a partir de abordagem multivariada. Dessa forma, foi possível avaliar a influência simultânea de 4 diferentes variáveis (agentes tensoativos) independentes na resposta (potencial zeta). Tal abordagem tem sido utilizada por diferentes autores (HAN *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2010; MONTGOMERY, 2004).

No que se refere à significância dos coeficientes (**Tabela 6**), os valores-p observados indicaram a necessidade de simplificação do modelo. Nesse sentido, os coeficientes com valores-p $> 0,05$ ($\alpha=0,05$) devem ser excluídos do estudo por não apresentarem significância (coeficientes não significantes para o modelo). Porém, essa exclusão deve ser feita com critério, avaliando o resultado de cada exclusão com relação às seguintes estatísticas: coeficientes de determinação ajustado e de previsão, valor de previsão do quadrado da soma dos erros (PRESS) e o teste para a falta de ajuste do modelo. Assim, o modelo deve apresentar os coeficientes de determinação maiores que 75%, preferencialmente, o menor valor possível de PRESS e ajuste de modelo (valor-p $> 0,05$, $\alpha=0,05$) (MONTGOMERY, 2004)..

Tabela 8. Teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação da influência dos agentes tensoativos SDS e Lutrol® no potencial zeta de carreadores lipídeos contendo ácido ursólico

Termos	Coef	SECoef	T	p
Constante	-42,73	2,864	-14,92	0,000
SDS	-24,35	2,559	-9,514	0,000
LUT	2,563	0,599	4,277	0,000
SDS*SDS	10,75	0,973	11,05	0,000
S = 2,935		PRESS = 318,8		
R-Sq = 85,27%		R-Sq(pred) = 79,04%		R-Sq(adj) = 83,57%

Legenda: SDS- Dodecil sulfato de sódio/ LUT - Lutrol®- Polímero de metiloxirano com oxirano/ **Coef** - coeficientes; **SE Coef** - desvio-padrão dos coeficientes; **p** - nível de significância; **T** - estatística T (teste t)- Coef./SE Coef;

Índices de ajuste do modelo: R-Sq (coeficiente de determinação), R-Sq(adj) (coeficiente de determinação ajustado); R-Sq (pred) (coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; S: desvio-padrão; PRESS: previsão do quadrado da soma dos erros

Tabela 9. Análise de variância do modelo simplificado (ANOVA) para testar a significância da regressão na avaliação da influência dos agentes tensoativos SDS e Lutrol® no potencial zeta de nanocarreadores lipídicos contendo ácido ursólico

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
Regressão	3	1296,8	1296,8	432,27	50,17	0,000
Linear	2	243,85	937,53	468,77	54,40	0,000
SDS	1	86,26	779,94	779,94	90,51	0,000
LUT	1	157,59	157,59	157,59	18,29	0,000
Quadrático	1	1052,9	1052,9	1052,9	122,20	0,000
SDS*SDS	1	1052,9	1052,9	1052,9	122,20	0,000
Er. res.	26	224,04	224,04	8,62		
Falta ajust.	5	58,77	58,77	11,75	1,49	0,234
Erro	21	165,27	165,27	7,87		
Total	29	1520,8				

Legenda: SDS- Dodecil sulfato de sódio/ LUT - Lutrol® - Polímero de metiloxirano com oxirano/ **DF** - grau de liberdade; **Seq SS** - soma dos quadrados; **Adj SS** - soma dos quadrados ajustados; **F** - estatística F (teste F); **Adj. MS** - média quadrática ajustada; **p** - nível de significância; Er. res. – Erro residual; Falta ajust. – Falta de ajuste

$$\text{Potencial Zeta} = -42\,728 - 24\,346\text{SDS} + 2\,563\text{Lutrol} + 10\,749\text{SDS}^2$$

Equação 1 – Modelo matemático de segunda ordem utilizado para prever o valor de potencial zeta (resposta) em função das concentrações de SDS e Lutrol®

As **Tabelas 8 e 9** apresentam, respectivamente, os coeficientes estimados para a regressão, assim como, a análise de variância para o modelo simplificado na otimização da característica de potencial zeta das nanopartículas. Nesse modelo, os coeficientes não significativos foram excluídos. A partir dos coeficientes com valores-p significativos (valor-p menor ou igual a 0,05) foi obtida a **Equação 1**. Essa equação refere-se ao modelo teórico de previsão dos valores de potencial zeta relativos à nanopartícula considerando as concentrações de Lutrol® e SDS. Esses agentes tensoativos influenciaram significativamente o potencial zeta nesse estudo específico (MONTGOMERY, 2004).

Com relação à avaliação do modelo obtido, o coeficiente de determinação de previsão aumentou de 60,92 para 79,02%, e, portanto, alcançou valor aceitável (maior que 75%). Quanto ao coeficiente de determinação ajustado, o modelo não simplificado e simplificado apresentaram valores semelhantes: 83,96 e 83,57%, respectivamente. Além disso, o modelo simplificado apresentou menor valor de

PRESS (318,843) quando comparado ao modelo não simplificado (549,382). Considerando o ajuste do modelo, ambos os modelos (simplificado e não simplificado) apresentaram valores- $p > 0,05$.

Figura 11. Gráfico de superfície de resposta do potencial zeta em função do SDS e do Lutrol® na otimização dos agentes tensoativos utilizados na preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo ácido ursólico *Legenda:* SDS- Dodecil sulfato de sódio/ Lutrol® - Polímero de metiloxirano com oxirano

Figura 12. Gráfico de contorno do potencial zeta em função do SDS e do Lutrol® na otimização dos agentes tensoativos utilizados na preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo ácido ursólico *Legenda:* SDS- Dodecil sulfato de sódio/ LUT - Lutrol® - Polímero de metiloxirano com oxirano

As **Figuras 11 e 12** referem aos gráficos de superfície e de contorno, respectivamente, relativos à otimização dos agentes tensoativos na preparação das nanopartículas empregando o método de superfície de resposta. Na **Figura 11** é possível visualizar o efeito quadrático observado para o modelo. No gráfico de contorno (**Figura 12**), os maiores valores de potencial zeta podem ser observados entre as concentrações aproximadas de 0,80 a 1,5% (p/v) de SDS.

Figura 13. Otimização das concentrações de SDS e de Lutrol® na preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo ácido ursólico utilizando a função “desejo” (Formulação 1: 0,80% p/v de SDS e 4,54% p/v de Lutrol)

Legenda: SDS- Dodecil sulfato de sódio/ Lutrol®- Polímero de metiloxirano com oxirano/ New D – novo desejo/ High Cur Low – Alta curva Baixa/ Composite Desirability – compósito desejado/ Potencia Minimum – Potência mínima

Figura 14. Otimização das concentrações de SDS e de Lutrol® na preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo ácido ursólico utilizando a função “desejo” (Formulação 2: 0,50% p/v de SDS e 4,00% p/v de Lutrol)

Legenda: SDS- Dodecil sulfato de sódio/ Lutrol®- Polímero de metiloxirano com oxirano/ New D – novo desejo/ High Cur Low – Alta curva Baixa/ Composite Desirability – compósito desejado/ Potencia Minimum – Potência mínima

As **Figuras 13 e 14** apresentam a resposta (potencial zeta) otimizada pela função desejo (DERINGER & SUICH, 1980), que é uma das ferramentas mais utilizadas na indústria para otimizar processos com múltiplas respostas. Abordagem alternativa à função desejo, a sobreposição de gráficos de superfície de resposta, poderia ser utilizada. Porém, segundo ZHOU & REGENSTEIN (2004), a sobreposição de gráficos é ineficiente e não pode ser automatizada e, portanto, essa alternativa foi descartada no presente trabalho.

Na otimização do potencial zeta (**Figuras 13 e 14**), o desejo foi o de obter valor de potencial zeta superior a -40 mV. Nesse sentido, foram preparadas as **Formulações otimizadas 1 e 2** e os resultados previstos pelo modelo foram comparados aos resultados obtidos, imediatamente após a preparação. Os resultados indicaram que o modelo pode ser considerado adequado para a previsão do valor de potencial zeta em função do SDS e do Lutrol®. Os valores de potencial zeta previstos e obtidos, para as **Formulações 1 e 2** foram -43,7 e 43,7 mV e -42 e

-50 mV, respectivamente. Embora a **Formulação 2** apresente diferença de -8 mV entre o valor esperado e o valor obtido, esse se encontra dentro do desvio-padrão para a média obtida (-10,4 mV), conforme **Tabela 10**.

Tabela 10. Valores de potencial zeta (mV) previstos pelo modelo e obtidos para as Formulações otimizadas 1 e 2

Form. otim.	LEC	SDS	LUT	TW	D. enc.	Pz esp.	Pz enc.	DP	IP
	(g)				nm		(mV)		
1	1,80	0,80	4,54	4,60	121,4	-43,7	-43,7	9,3	0,1
2	1,59	0,50	4,00	4,42	124,3	-42,0	-50,0	10,4	0,2

Legenda: **Form. otim.** – Formulações otimizadas/ **LEC** – Lecitina de soja/ **SDS**- Dodecil sulfato de sódio/ **LUT** - Lutrol®- Polímero de metiloxirano com oxirano / **TW** - Tween 80®- Monooleato de sorbitano/ **D. enc.** – Diâmetro médio encontrado/ **Pz esp.** – Potencial zeta esperado/ **Pz enc.** – Potencial zeta encontrado/ **DP** - desvio-padrão/ **IP** – Índice de polidispersividade

5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria e termogravimetria derivada (TG/DTG)

Os ensaios termoanalíticos foram efetuados empregando os equipamentos DSC-50 e TGA-51 da marca Shimadzu, no intervalo de temperatura entre 25 e 600°C e razão de aquecimento de 10°C/min. As **Figuras 15 a 20** das amostras de ácido ursólico livre, ácido ursólico na formulação-base, ácido ursólico em nanopartícula polimérica, ácido ursólico em nanopartícula polimérica na formulação-base, ácido ursólico em carreador lipídico nanoestruturado e ácido ursólico em carreador lipídico nanoestruturado na formulação-base ilustraram a sobreposição das curvas TG/DTG e DSC. A curva DSC da amostra AUL (**Figura 15**) evidenciou quatro eventos térmicos: o primeiro evento foi exotérmico com $T_{\text{onset}} \sim 190^\circ\text{C}$ e valor de ΔH de $-16,4 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ e pode ser atribuído a uma transição de fase, pois ocorreu na faixa de temperatura onde as curvas TG/DTG não evidenciaram perda de massa. O segundo $T_{\text{onset}} \sim 284^\circ\text{C}$ e valor de ΔH de $72,2 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ está associado à fusão do material; e os outros dois, um exotérmico $T_{\text{pico}} \sim 410^\circ\text{C}$ e outro endotérmico $T_{\text{pico}} \sim 550^\circ\text{C}$, devido a decomposição térmica dos materiais. Por outro lado, as curvas TG/DTG evidenciaram apenas duas etapas de perda de massa. A primeira ocorreu entre 284 e 440°C ($\Delta m = 88\%$) e a segunda entre 440 e 550°C ($\Delta m = 11\%$) restando um resíduo de 1,28% da massa inicial.

Os valores de perda de massa para esta amostra encontram-se na **Tabela 11** e foram obtidos das curvas TG/DTG (**Figura 15**) da amostra.

Figura 15. Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra de ácido ursólico livre

A **Tabela 11** indicou a variação de massa (Δm) e a % residual das amostras.

Tabela 11. Dados de Δm das amostras obtidos das curvas TG/DTG

Eventos	Amostra			
	AU	AU + FB	AUNP	AUNP + FB
	Δm (%)			
1º	91,1	72,6	94,1	71,5
2º	7,0	25,1	5,1	27,1
Total	98,7	97,7	99,2	98,6
Resíduo	1,3	2,3	0,8	1,4

Legenda: **AU** – ácido ursólico/ **AU + FB** – ácido ursólico na formulação-base/ **AUNP** – ácido ursólico em nanopartículas polimérica/ **AUNP + FB** – ácido ursólico em nanopartículas polimérica em formulação-base

Para a amostra do ácido ursólico incorporado na formulação-base as curvas TG/DTG revelaram três perdas de massa. A primeira ocorre da temperatura ambiente até 130°C, correspondendo a diminuição de ~75% da água presente na

formulação e as demais perdas ocorreram a ~180 e 580°C (**Figura 16**). A curva DSC (**Figura 16**) demonstrou que esta decomposição foi endotérmica. O resíduo proveniente da decomposição térmica desta amostra apresentou 2,3% da massa inicial, conforme indicado na **Tabela 11**.

Figura 16. Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra do ácido ursólico incorporado na formulação-base (emulsão)

As curvas TG/DTG (**Figura 17**) da amostra de nanopartícula polimérica de ácido ursólico evidenciaram duas perdas de massa. A primeira iniciando em, aproximadamente, 25°C e terminando em, aproximadamente, 125°C, correspondente à desidratação do material. A segunda perda ocorreu a 250°C e correspondeu a decomposição da amostra. Almeida e colaboradores (2010) avaliaram por meio da análise térmica, a estabilidade do acetato de tocoferila (Vitamina E) e do tetraisopalmitato de ascorbila (Vitamina C) isolados e incorporados em formulação cosmética e obtiveram resultado semelhante. As vitaminas se mantiveram estáveis até 250°C, se decompondo após esta temperatura. Pode-se inferir desta maneira que o ácido ursólico se manteve estável até temperatura de decomposição de 250°C comportando-se de maneira similar a importantes vitaminas antioxidantes. A curva DSC (**Figura 17**) evidenciou um evento endotérmico concomitante à primeira decomposição térmica.

Figura 17. Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra de ácido ursólico em nanopartícula polimérica

A curva DSC (**Figura 18**) da amostra de nanopartícula polimérica de ácido ursólico incorporado na formulação-base evidenciou três eventos endotérmicos consecutivos, concomitantes a uma única perda de massa nas curvas TG/DTG (**Figura 18**). O último evento tem caráter de mudança de estado, mas não se pode atribuir essa característica pelo fato de haver uma perda de massa na mesma temperatura observada na curva termogravimétrica. As curvas TG/DTG apresentaram grande perda de massa no início (25 ~ 150°C) e várias outras consecutivas e menores durante o aumento da temperatura. A massa residual desta amostra foi de 1,4% da massa inicial.

Figura 18. Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra de ácido ursólico em nanopartícula polimérica na formulação-base

A **Tabela 12** indica os dados de variação de entalpia (ΔH) em J·g⁻¹, a temperatura *onset* e a temperatura de pico (em °C) de cada evento das amostras. Estes dados foram obtidos das curvas DSC apresentadas anteriormente.

Tabela 12. Dados de ΔH , T_{onset} e T_{pico} das amostras obtidos das curvas DSC razão de aquecimento de 10°C/min, intervalo de temperatura de 25 até 600°C, sob atmosfera dinâmica de N₂

Eventos	Amostra											
	AU			AU + FB			AUE			AUE + FB		
	T_{onset}	T_{pico}	ΔH	T_{onset}	T_{pico}	ΔH	T_{onset}	T_{pico}	ΔH	T_{onset}	T_{pico}	ΔH
	(°C)	(°C)	(J·g ⁻¹)	(°C)	(°C)	(J·g ⁻¹)	(°C)	(°C)	(J·g ⁻¹)	(°C)	(°C)	(J·g ⁻¹)
1°	190,2	200,8	16,4	26,0	32,5	-119,0	74,0	92,5	-	25,5	69,0	-170,0
2°	284,2	287,2	-72,2	97,2	103,3	-1130,0	-	-	-	98,4	104,8	-150,0
3°	383,8	448,8	64,4	-	-	-	-	-	-	115,5	137,5	250,0

Legenda: **AU** – ácido ursólico/ **AU + FB** – ácido ursólico na formulação-base/ **AUE** – ácido ursólico em nanopartículas polimérica/ **AUE + FB** – ácido ursólico em nanopartículas polimérica em formulação-base

Figura 19. Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra do ácido ursólico em carreador lipídico nanoestruturado

Figura 20. Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar 50 mL/min e N₂ da amostra do ácido ursólico em carreador lipídico nanoestruturado na formulação-base

Para a amostra do ácido ursólico em carreador lipídico nanoestruturado (**Figura 19**) as curvas TG/DTG revelaram duas perdas de massa. A primeira ocorreu da temperatura ambiente até 130°C e correspondeu a diminuição de ~80% da água

presente no carreador lipídico nanoestruturado e a segunda perda ocorre a $\sim 290^{\circ}\text{C}$ e corresponde a decomposição térmica. A curva DSC (**Figura 19**) não mostrou essa decomposição térmica, devido a medida ser obtida em atmosfera de N_2 .

Na **Figura 20** as curvas TG/DTG mostraram uma perda de massa referente a liberação de água presente em aproximadamente 75% da amostra do ácido ursólico em carreador lipídico nanoestruturado na formulação-base, corroborando com os eventos observados na curva DSC. Pode-se observar que as curvas TG/DTG apresentaram dois eventos de decomposição térmica entre ~ 280 a 380°C .

Pode-se concluir do estudo termooanalítico preliminar que as temperaturas de decomposição da nanopartículas de ácido ursólico associadas ou não à formulação-base (emulsão), obtiveram pequena variação com relação à temperatura de decomposição do ácido ursólico livre, devido a concentração de apenas 1% p/p de ácido ursólico nas formulações.

Por meio das técnicas de TG/DTG e DSC observou-se que o AU se manteve estável até temperatura de 250°C se comportando de maneira semelhante as vitaminas C e E, além de ter demonstrado ser uma excelente ferramenta para caracterizar o ácido ursólico, avaliar o teor de água e a estabilidade da formulação-base, podendo ser empregadas em análises de rotina em indústrias cosméticas (ALMEIDA, 2010).

6 CONCLUSÕES

- As nanopartículas contendo ácido ursólico apresentaram características de potencial estabilidade química obtendo-se eficiência de encapsulação de 80% de ácido ursólico para as nanopartículas poliméricas e 100% para os carreadores lipídicos nanoestruturados.
- A caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas contendo ácido ursólico 1% p/p foi realizada obtendo-se: diâmetro da partícula ($353,4 \pm 1,4$ nm), índice de polidispersividade ($0,106 \pm 0,008$) e potencial zeta ($-35,6 \pm 1,2$ mV). Os resultados obtidos para os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ácido ursólico 1% p/p para as formulações foram: tamanho de partícula entre $125,3 \pm 40,4$ e $237,4 \pm 62,7$ nm, índice de polidispersividade entre 0,01 e 0,38 e potencial zeta entre $-20,5 \pm 9,2$ e $-50,7 \pm 9,5$ mV. Os resultados obtidos indicaram estabilidade das nanopartículas desenvolvidas.
- O resultado relativo ao planejamento fatorial para otimização dos agentes tensoativos revelou efeito significativo da curvatura do modelo. Foi observado efeito quadrático da variável independente tensoativo dodecil sulfato de sódio no potencial zeta.
- A metodologia de superfície de resposta permitiu a obtenção de modelo matemático de segunda ordem para a previsão de valores de potencial zeta em função das concentrações de SDS e de Lutrol®. Dessa forma, foi possível a preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo reduzida concentração de SDS e valor de potencial zeta menor que -40 mV.
- A curva DSC do ácido ursólico livre evidenciou a fusão do material à 284°C , os $T_{\text{pico}} \sim 410^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{pico}} \sim 550^{\circ}\text{C}$ indicaram a decomposição térmica do material. Para a amostra do ácido ursólico livre incorporado a formulação-base, as curvas TG/DTG revelaram três perdas de massa, sendo a primeira, da temperatura ambiente até 130°C , (diminuição de $\sim 75\%$ de água da formulação). As curvas TG/DTG das nanopartículas isoladas, e incorporadas à formulação-base, apresentaram perfil semelhante ao do ácido ursólico livre incorporado à formulação-base, com perda de 75 a 80% de água nas amostras.
- Por meio do estudo termoanalítico observou-se que o ácido ursólico isolado, o incorporado em nanopartículas e na formulação-base apresentaram comportamento

diferentes no perfil térmico e similar em relação a presença de AU. O AU se manteve estável até temperatura de 250°C, se comportando de maneira semelhante as vitaminas C e E, sendo que a técnica demonstrou ser eficiente para caracterizar o ácido ursólico, avaliar o teor de água e a estabilidade da formulação-base (ALMEIDA, 2010).

7 REFERÊNCIAS

* As referências estão de acordo com a norma NBR6023/2002, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

ABDELWAHED, W; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 87-94, 2006.

ALMEIDA, M. M.; LIMA, C. R. R. C.; GUILLEN, J. S. Q.; FILHO, E. M.; MERCURI, L. P.; SANTORO, M. I. R. M.; HACKMANN, E. R. M. K. Stability evaluation of tocopheryl acetate and ascorbyl tetraisopalmitate in isolation and incorporated in cosmetic formulations using thermal analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 129-134, 2010.

BLOUZA, I. L.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spirinolactone-loaded nanocapsules for pediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v.325, p.124-131, 2006.

CHANDRA, R; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, v.23, p.1273-135, 1998.

COUVREUR, P. et al. **Nanoparticles: preparation and characterization**. In: BENITA S. Microencapsulation: methods and industrial applications, New York: Marcel Dekker, 1996, 640p.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, n. 4, p. 214-219, 1980.

ELDEM, T., SPEISER, P., HINCAL, A. Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 47-54, 1991.

- FANG, J.Y.; FANG, C.L.; LIU, C.H. SU, Y.H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.70, p. 633-640, 2008.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p.R1-R4, 1989.
- FLORENCE, A. T. & ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. Tradução: Zuleika Rothschild. 3. ed. São Paulo: Edusp, 2003. Título original: *Physicochemical Principles of Pharmacy*.
- GASCO, M.R. **Method for producing solid lipid micro- spheres having a narrow size distribution**. US Patent 5,250,236, 1993.
- GUILLEN, J.S.Q.; BATISTA, I.A.S.A.; MATOS, J.R. Contribuição da análise térmica na avaliação de princípios ativos empregados na prevenção do envelhecimento da pele isolados e/ou incorporados em géis e emulsões. **Cosmetic & Toiletries**, Carol Stream, v.18, n.2, p.50-52, 2006.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p.147–157, 2007.
- HAN, F.; LI, S.; YIN, R.; LIU, H.; XU, L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, p. 210-216, 2008.
- JENNING, V. **Feste Lipid-Nanopartikel (SLN) als Tragersystem für die dermale Applikation von Retinol**. Ph.D. thesis, FU, Berlin, 1999.
- KOVACEVIC, A.; SAVIC, S.; VULLETA, G.; MULLER, R.H.; KECK, C.M. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structured. **International Journal of Pharmaceutics**, 2011, doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.036.

- KREUTER, J. Nanoparticles, In: J. Kreuter (Ed.), **Colloidal Drug Delivery Systems**, Marcel Dekker, New York, p.219-342, 1994.
- KUTNER, M.; NACHTSCHIEM, C.T.; WASSERMAN, W.; NETER, J. **Applied linear statistical models: regression, analysis of variance, and experimental designs**. Mc Graw-Hill/Irwin. 4 ed. 1996.
- LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. S.T.P. **Pharma Sciences**, v. 9, n.5. p. 411-418, 1999.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v.4, p. 221-241, 1991.
- MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicação em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, p. 1-37, 2009.
- MATOS, J.R; MACHADO, L.D.B. Introdução à Análise Térmica e Termogravimetria. (Cap. 11), **Caracterização de Polímeros**, Artliber Editora, p.209-228, São Paulo, Brasil, 2004.
- MISHRA, S.; MITRA, R. Rational design in suspension rheology of cellular silica. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 370, p. 102-112, 2010.
- MONTGOMERY, D. C. (2004). **Introdução ao Controle Estatístico da Qualidade**. 4. ed. LTC editora: Rio de Janeiro. 532 p.
- MOTHÉ, C.G.; CARESTIATO, T.; BUSNARDO, N.G.; GARRIDO, J. **Estudo termoanalítico do creme anti-celulite à base de *Ginkgo biloba*, *Centella asiática* e *Fucus vesiculosus***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA, 5., Poços de Caldas, 2006. Livro de Resumos. Poços de Caldas: ABRATEC, 2006. p.351.
- MULLER, R.H., LUCKS, J.S. **Arzneistofftrager aus festen Lipidteilchen, Feste Lipidnanospharen (SLN)**. European Patent EP0605497, 1996.

- MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p.121–128, 2002.
- MULLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS A.; PARDEIKE J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 522–530, 2007.
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170-184, 2009.
- PILLAI, O. & PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chem. Biol.**, v.5, p. 447-451, 2001.
- PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J. P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. In: **Polymeric Biomaterials**; Dumitriu, S (Ed.); Marcel Dekker: New York, c.16,1994.
- RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farmaceutica Bonarense**, v. 24, n. 3, p. 383-387, 2005.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITA, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n.5, p. 726-737, 2003.
- SCHMALTZ,C.; SANTOS,J.V.; GUTERRES,S.S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v.16, n.13-14, p.80-85, 2005.
- SILVA, M.A.S; KELMANN, R.G; FOPPA, T; CRUZ, A.P; BERTOL, C.D; SARTORI, T; GRANADA, A; CARMIGNAN, F; MURAKAMI, F.S. Thermal analytical study of fluoxetine hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n.2, p. 463-467, 2007.

- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.
- SPEISER, P. **Lipidnanopellets als Tragersystem für Arzneimittel zur peroralen Anwendung**. European Patent EP 0167825, 1990.
- TAN, S.W.; BILLA, N.; ROBERTS, C.R.; BURLEY, J.C. Surfactant effects on the physical characteristics of Amphotericin B – containing nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, p. 73-79, 2010.
- TEERANACHAIDEEKUL, V.; BOONME, P.; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 134-141, 2008.
- TEWA-TAGNE, P.; BRIAÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.30, p. 124-135, 2007.
- ZETA METER, Inc. **Potencial Zeta: Um Curso Completo em 5 Minutos**. Disponível em: < <http://www.zeta-meter.com> >. Acesso em: 20 jul. 2011.
- ZHANG, X.; LIU, J.; QIAO, H.; LIU, H.; NI, J.; ZHANG, W.; SHI, Y. Formulation optimization of dihydroartemisinin nanostructured lipid carrier using response surface methodology. **Powder Technology**, v.197, p.120-128, 2010.
- ZHOU, P.; REGENSTEIN, J.M. Optimization of extraction conditions for Pollock skin gelatin. **Journal of Food Science**, v.69, n. 5, p.393-398, 2004.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO URSÓLICO EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

RESUMO

O estudo de estabilidade dentro do contexto de avaliação da qualidade do produto, torna-se primordial para garantir a integridade das propriedades físicas e químicas, dentre outras, durante seu prazo de validade. Nesta pesquisa, formulações cosméticas contendo ácido ursólico livre 1% p/p (AUL), nanopartículas poliméricas com ácido ursólico 1% p/p (AUE) e carreadores lipídicos nanoestruturados com ácido ursólico 1% p/p (AUC) foram submetidas a *Avaliação Preliminar da Estabilidade* e ao *Teste Estabilidade Normal*, com avaliações no períodos de zero (t0) (48h após preparo); um (t1); sete (t7); quinze (t15); trinta (t30); sessenta (t60) e noventa (t90) dias. Pode-se concluir que o AUE alcançou um melhor desempenho com a Formulação 2 comparando-se com o AUL e com a Formulação 1 na variação da viscosidade *versus* tempo, em todas as condições de armazenamento (temperatura ambiente e luz solar indireta, $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; geladeira, $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; e estufa $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), fator determinante na sua escolha neste estudo e no teste de penetração cutânea. Em relação a variação do pH *versus* tempo, o AUE e AUL se comportaram de forma similar, tanto na Formulação 1 como na Formulação 2, no entanto, a condição temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) com luz solar indireta foi a melhor condição de armazenamento tanto para o AUL como AUE, com variação inferior a 20%. Na condição de temperatura ambiente, a resposta foi adequada até o tempo de 30 dias. A partir dos resultados obtidos, a Formulação 2 foi selecionada para a realização do Teste de Estabilidade Normal comparando-se o AUL com o AUC e para o teste de penetração cutânea. Observou-se que o AUC obteve melhor estabilidade físico-química em comparação ao AUL tanto na variação de viscosidade como na variação do pH, além de ter obtido melhor estabilidade em relação a AUE na variação de pH x tempo.

Palavras-chave: estabilidade, nanopartículas, formulação cosmética, ácido ursólico.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Pele – considerações gerais

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, constituindo 16% do peso corporal. Além de revestir a superfície externa do corpo, protegendo-o, são atribuídas outras funções, como: controle da temperatura corporal; exploração sensorial do ambiente; aparência estética; barreira contra absorção excessiva da radiação ultravioleta (UV); síntese de vitamina D; barreira contra absorção e eliminação de substâncias químicas; prevenção da evaporação excessiva de água, que causaria a desidratação da pele em primeira instância e, na sequência, de todo o organismo, exercendo desse modo uma função de barreira (LEONARDI, 2004; RIBEIRO, 2006; CHENG *et al.*, 2008; CRAVELLO, 2008; IYER *et al.*, 2007).

Este órgão pode ser considerado como uma membrana heterogênea, uma vez que possui várias camadas, cada uma com tipos particulares de células e, conseqüentemente, funções diferentes (HADGRAFT, 2001). Possui uma camada de origem ectodérmica, a epiderme, e outra de origem mesodérmica, a derme. Dependendo da espessura da epiderme, distingue-se a *pele espessa*, encontrada na palma da mão e planta dos pés, e a *pele fina*, que recobre o restante do corpo. A pele apresenta ainda algumas estruturas anexas, que são os pêlos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas (GARTNER & HIATT, 1999; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A **Figura 1** apresenta as principais estruturas da pele.

Figura 1. Camadas da pele humana (COSTA *et al.*, 2011)

A pele humana é estruturada histologicamente em duas camadas, a epiderme e a derme e, logo abaixo da derme, um tecido de sustentação, formado por tecido adiposo chamado de hipoderme (FOLDVARI, 2000; RIBEIRO, 2010).

As camadas que formam a epiderme são conhecidas como basal, espinhosa, granulosa e a córnea. Uma quinta camada, a lúcida, é encontrada entre a córnea e a granulosa, presente na palma das mãos e na sola dos pés, conferindo maior espessamento da pele nestas regiões (RIBEIRO, 2010). A partir da camada basal, se originam as demais que formam a epiderme. Nesta, as células se encontram em constante divisão e migram para a superfície da pele, sucessivamente, para formar as camadas mais externas, perdem o núcleo e passam por alteração na sua composição lipídica. Acima da camada basal se encontra a espinhosa, formada por várias camadas celulares, sendo as mais profundas de forma poliédrica e as superficiais mais achatadas. A camada granular se situa entre as camadas córnea e espinhosa e é responsável pela formação da bicamada lipídica presente entre as células corneificadas que formam a primeira (FOLDVARI, 2000).

A derme é formada pelo tecido conjuntivo e une a pele ao tecido celular subcutâneo. Na derme, encontram-se os nervos e os vasos sanguíneos e linfáticos. Apresenta fibrilas de colágeno e fibras elásticas responsáveis, em parte, pela elasticidade da pele. Possui duas camadas, a papilar, mais superficial, e a reticular, mais profunda. A camada papilar é constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas dérmicas, que são reentrâncias da derme na epiderme. A camada reticular é constituída por tecido conjuntivo denso e é mais espessa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A hipoderme, ou tecido celular subcutâneo, é composta por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apoia, além de depósito nutritivo de reserva, participando no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo ao pressionamento e traumatismo externos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; SHERIDAN & TOMPKINS, 1999).

1.2 Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento pode ser definido como sendo um conjunto de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas inevitáveis que ocorrem progressivamente no organismo ao longo da vida. Essas modificações ocasionam a perda gradativa das funções dos vários órgãos que formam o organismo humano, entre eles a pele, aumentando sua vulnerabilidade ao meio ambiente e diminuindo a sua capacidade de homeostasia (RIBEIRO, 2006).

Durante sua vida o indivíduo sofre diversas agressões por agentes físicos, químicos ou biológicos, que podem levar ao aparecimento de patologias ou alterar o processo de envelhecimento. Os tecidos, gradualmente, passam por mudanças de acordo com a idade, sendo que, na pele, essas alterações são mais facilmente reconhecidas. Atrofia, enrugamento e lassidão representam os sinais mais aparentes de uma pele senil (ORIÁ *et al.*, 2003).

O envelhecimento intrínseco da pele é observado na epiderme como um reflexo das modificações que ocorrem, também, no tecido conjuntivo da derme, que atua como um alicerce natural para a epiderme. Nesta, nota-se a diminuição das células de Langerhans e dos monócitos, diminuição da síntese de melanossomas e menor pigmentação. Na derme, observa-se a diminuição do colágeno, fibras elásticas, macrófagos e dilatação dos canais linfáticos. As mudanças fisiológicas observadas envolvem a diminuição do número de queratinócitos e fibroblastos e redução da vascularização, principalmente, próximo aos folículos pilosos e glândulas (OBAGI, 2004; ORIÁ *et al.*, 2003).

Com o passar dos anos e principalmente após os 30 anos de idade, surgem rugas, manchas de hiperpigmentação, redução na espessura da pele e dificuldade de cicatrização. O envelhecimento cutâneo devido aos fatores externos e, principalmente, influenciado pela radiação solar, é conhecido como envelhecimento extrínseco, actínico ou fotoenvelhecimento. O sol é considerado o principal causador das alterações na pele, as quais podem se manifestar como manchas, aspereza, rugas, flacidez, etc (SCOTTI & VELASCO, 2003).

O fotoenvelhecimento da pele é um processo complexo que se caracteriza pela perda do tônus cutâneo, aumento da desidratação e do ressecamento, elastose actínica, pigmentação irregular e aparecimento de rugas mais profundas. Esse fenótipo é causado por alterações nas funções celulares e deterioração da matriz

extracelular do tecido conectivo, originando uma desorganização nas proteínas estruturais primárias como elastina e colágeno (SCOTTI & VELASCO, 2003; OBAGI, 2004; DECCACHE, 2006).

1.3 Produtos cosméticos

O uso deste tipo de produto iniciou nas antigas civilizações, com o objetivo de atender aos conceitos culturais da época. A literatura faz referências à maquiagem destinada a colorir a face, os lábios e a área dos olhos, uma das primeiras a ser utilizada, pois os olhos grandes e vistosos eram sinais de beleza (BALSAM & SANGARIN, 1972).

Com o avanço da ciência e tecnologia, estes conceitos foram gradualmente evoluindo e, atualmente, os produtos de higiene, cosméticos e perfumes são definidos, de acordo com a Resolução RDC no 211, de 14 de julho de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como “preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado” (ANVISA, 2005).

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA): “Cosméticos são produtos que, quando aplicados no corpo humano, limpam, embelezam, promovem atratividade ou modificam a aparência da pele e cabelos ou do corpo, sem afetar a sua estrutura ou função”.

Produtos identificados como cosméticos, mas que tratam ou previnem doenças ou, ainda, que afetam a estrutura ou função da pele humana são considerados, pela FDA, como medicamentos, e devem seguir o estatuto de medicamentos. Esses produtos, conhecidos como *Over the Counter* (OTC) que significa “sobre o balcão”, integram alguns produtos considerados cosméticos na Europa e Brasil e se referem aos produtos considerados “medicamentos” que podem ser comercializados sem a necessidade de prescrição médica (RIBEIRO, 2006).

Os componentes dos produtos cosméticos devem estar descritos nos compêndios técnicos da *International Nomenclature of Cosmetic Ingredient* (INCI) garantindo, assim, segurança de uso, pois possuem venda livre para a população.

Não devem apresentar nenhum risco à saúde humana nas condições de uso preconizadas ou razoavelmente previsíveis (RIBEIRO, 2006).

1.3.1 Emulsões

Emulsões são sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, definidos como uma mistura íntima de dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso no outro sob a forma de gotículas ou glóbulos. Na terminologia das emulsões, a fase dispersa é conhecida como fase interna ou descontínua e o meio dispersante como fase externa ou contínua (LEONARDI, 2004; WASAN & NIKOLOV, 2007).

De acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante, estes sistemas classificam-se em óleo em água (O/A) com a fase interna oleosa e a externa aquosa, ou água em óleo (A/O) que têm fase interna aquosa e a externa oleosa. As emulsões mais adequadas para uso tópico no Brasil devido ao clima quente, geralmente, são as do tipo O/A devido seu aspecto ser menos oleoso durante e após a aplicação, com características sensoriais mais aceitáveis (MORRISON, 2002; MARTI-MESTRES, 2002; LEONARDI, 2004; BECHER, 1965; GOPAL, 1969; TADROS & BECKER, 1983; MORRISON & ROSS, 2002).

As emulsões são sistemas estabilizados cineticamente pela adição de agente tensoativo (emulsificante) capazes de diminuir a tensão interfacial do sistema e de formar um filme interfacial com propriedades estéricas e eletrostáticas em torno dos glóbulos da fase interna (JEONG, OH & KIM, 2001; HOLMBERG, 2002; MORRISON & ROSS, 2002; CAPEK, 2004). Os tensoativos são moléculas anfifílicas que se adsorvem na interface entre a fase dispersa e dispersante durante o processo de emulsificação e podem prontamente prevenir fenômenos como floculação e coalescência (BROOKS, 1998).

Estas preparações foram classificadas numericamente por Griffin pela metodologia conhecida por sistema Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL), segundo suas características de hidrofília/lipofília, sendo atribuídos valores de 1,0 a 50,0 sendo que, quanto mais elevado o valor, maior é a sua hidrofílicidade. A aplicação de cada tensoativo está relacionada com o valor de seu EHL, sendo os de valor baixo indicados para emulsões água em óleo (A/O) e aqueles com valores intermediários

recomendados para sistemas óleo em água (O/A) (GRIFFIN, 1967; MORRISON & ROSS, 2002).

1.4 Nanocosméticos

O relatório da *Royal Society/Royal Academy of Engineering*, publicado em julho de 2004, divide a Nanotecnologia em quatro grandes áreas: nanomateriais; nanometrologia; eletrônica, optoeletrônica, informação e tecnologia de comunicações; nanobiotecnologia e nanomedicina (ROYAL SOCIETY; ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004).

Devido ao seu caráter multidisciplinar, estima-se que a Nanotecnologia tenha o potencial de revolucionar amplamente várias áreas científicas e tecnológicas, incluindo a biologia, a física, a química, a farmacêutica, a medicina e as engenharias. Especificamente quando essa tecnologia é aplicada às “ciências da vida” recebe o nome de Nanobiotecnologia. Nessa área, as nanoestruturas mais estudadas são as nanopartículas (lipídicas e/ou poliméricas), os lipossomas, os dendrímeros, os nanotubos de carbono e os pontos quânticos (*quantum dots*) (VAUTHIER *et al.*, 2003; ALLIANZ, 2005).

No setor dos produtos cosméticos a Nanobiotecnologia tem encontrado internacionalmente inúmeras aplicações, representando, também, grande potencial de desenvolvimento tecnológico para o Brasil. Cabe salientar que a grande expressão do setor de cosméticos no cenário nacional pode ser exemplificada pelo crescimento da ordem de 8,2% (valor livre de inflação) somando entre 2000 e 2004, uma elevação de R\$ 5,6 bilhões no faturamento. Internacionalmente, a empresa pioneira a introduzir um cosmético de base nanotecnológica foi a L’Oreal, em 1995. Na atualidade, centenas de nanocosméticos encontram-se no mercado mundial e são comercializados por inúmeras empresas (GUTERRES *et al.*, 2007).

Um nanocosmético pode ser definido como sendo uma formulação cosmética que veicula princípios ativos ou outros ingredientes nanoestruturados e que apresenta propriedades superiores quanto a sua *performance* em comparação com produtos convencionais. Do ponto de vista científico, as vantagens do uso da Nanobiotecnologia na produção de nanocosméticos e formulações dermatológicas são concernentes à proteção de ingredientes quanto à degradação química ou enzimática, controle de sua liberação

(principalmente no caso de substâncias irritantes em concentrações elevadas) e ao prolongamento do tempo de permanência dos princípios ativos cosméticos ou fármacos na camada córnea (FRONZA *et al.*, 2007).

Uma busca nos bancos de dados do ISI (The Thomsom Corporation) indicou, a partir da década de 1990, crescimento exponencial de publicações referentes a Nanobiotecnologia no desenvolvimento de produtos cutâneos, somando na atualidade mais de 800. Igualmente, na busca por patentes (Derwent Innovations Index – 1996 até agosto/2007) observam-se mais de 1500 patentes depositadas relativas exclusivamente a cosméticos ou produtos dermatológicos de base nanotecnológica (FRONZA *et al.*, 2007).

1.5 Estabilidade de formulações cosméticas

No desenvolvimento do produto cosmético, a realização do estudo da estabilidade é de suma importância, pois avalia o período de tempo em que o produto mantém suas propriedades físicas, químicas, microbiológicas e toxicológicas, dentro de limites previamente estabelecidos. Neste tipo de estudo, amostras das formulações são avaliadas após serem submetidas sob determinadas condições de temperatura, umidade e luminosidade, que podem acelerar a velocidade de degradação química de princípios ativos e de alterações físicas e físico-químicas da forma cosmética e, conseqüentemente, interferir na qualidade microbiológica e toxicológica (MAIA, 2002; ANVISA, 2004).

O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento da formulação em determinado intervalo de tempo, frente a diferentes condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (ANVISA, 2004).

Segundo monografia da *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists* – IFSCC, o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de formulações armazenadas em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições reais de mercado. Como em todo procedimento preditivo os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso (ANVISA, 2004).

A Avaliação Preliminar da Estabilidade consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto, utilizando-se diferentes formulações de

laboratório e com duração reduzida. Empregam-se condições extremas de temperatura com objetivo de acelerar as possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada produto (BABY *et al.*, 2004; ANVISA, 2004).

O Teste de Estabilidade Acelerada, também conhecida como Estabilidade Normal ou Exploratória, tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. Recomenda-se que as amostras para avaliação da estabilidade sejam acondicionadas em frasco de vidro neutro, transparente, com tampa que garanta uma boa vedação, evitando perda de gases ou vapor para o meio. Se houver incompatibilidade conhecida entre os componentes das formulações e o vidro, o formulador deve selecionar outro material de acondicionamento. Deve-se evitar a incorporação de ar no produto, durante o envase no recipiente de teste. É importante não completar o volume total da embalagem permitindo um espaço vazio de aproximadamente 1/3 da capacidade do frasco para possíveis trocas gasosas (ANVISA, 2004).

A duração do Teste de Estabilidade Normal é, geralmente, realizados durante 90 dias e as formulações em teste são submetidas a condições menos extremas que no Teste de Estabilidade Preliminar. As amostras podem ser submetidas a condições de armazenamento: $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ em estufa; $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ temperatura ambiente em exposição à luz solar indireta; $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ em temperatura ambiente e $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ em geladeira. As variáveis analisadas são: aspecto, cor, odor (características organolépticas), pH e viscosidade aparente (ANVISA, 2004).

As características organolépticas são avaliadas por meio de percepção visual e olfativa, e em bancada de fundo branco, podendo ser usada a seguinte nomenclatura para classificar as formulações quanto ao aspecto, cor e odor:

N = Normal, sem alteração; **LM** = Levemente Modificado; **M** = Modificado e **IM** = Intensamente Modificado (BABY, 2007).

A periodicidade da avaliação das amostras pode variar conforme experiência técnica, especificações do produto, características especiais de algum componente da formulação ou sistema conservante utilizado, porém o mais usual nesse estudo acelerado é que sejam avaliadas inicialmente no tempo zero, 24 horas e aos 7^o, 15^o, 30^o, 60^o e 90^o dias (ANVISA, 2004).

2 OBJETIVOS

Preparação de formulações cosméticas contendo ácido ursólico livre (AUL), incorporado em nanopartículas poliméricas (AUE) e carreadores lipídicos nanoestruturados (AUC) e avaliação da Estabilidade Preliminar e Normal em diversas condições de temperatura e luminosidade ao longo do tempo quanto às suas características físico-químicas.

3 MATERIAL

3.1 Matérias-primas

Todas as matérias-primas possuem grau de pureza farmacêutico.

- Ácido esteárico, Vital especialidades;
- Ácido ursólico teor de pureza 90%, HighChem;
- Água desmineralizada, MilliQ[®];
- Álcool cetílico, Vital especialidades;
- Álcool cetoestearílico/Álcool estearílico etoxilado, (Cosmowax J[®]), Mapric;
- Butilidroxitolueno (BHT), Vital especialidades;
- Olivato de Cetearila/Olivato de Sorbitano (Olivem 1000[®]), Vital especialidades;
- Cetil fosfato de potássio (Amphysol k[®]), Vital especialidades;
- EDTA dissódico, Vital especialidades;
- Estearato de glicerila (GMS Vital wax[®]), Vital especialidades;
- Fenoxietanol/2-Metil-4-Isotiazolina-3-ona (Conserv NE[®]), Vital especialidades;
- Glicerina, Vital especialidades;
- Goma xantana (CG SFT[®]), Vital especialidades;
- Manteiga de cacau, Mapric;
- Metil ésteres de ácidos graxos do óleo de soja (Methyl Soyate[®]), Vital especialidades;
- Óleo de coco babaçu refinado, Campestre;
- Óleo de jojoba, Ferquima;
- Óleo de oliva, Vital especialidades;
- Óleo de semente de uva, Ferquima;
- Óleo de soja, Vital especialidades;
- Sorbitol, Vital especialidades;

- Triésteres de glicerol dos ácidos cáprico e caprílico (TACC[®]), Mapric;
- Vitamina E, Vital especialidades;

3.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Agitador magnético com aquecimento, modelo Q261, Quimis[®];
- Agitador mecânico, Kika Labortechnik[®]- modelo T25 basic;
- Analisador de tamanho médio de partículas, potencial zeta e índice de polidispersividade, Zetasizer[®] 3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK);
- Balança analítica, modelo AUY 220 Shimadzu[®], precisão 1 mg-220 g;
- Banho termostático incubador digital com movimento orbital circular, velocidade regulável de 20 a 200 rpm e graduação de temperatura entre 25 à 60°C (501/D) – Nova Ética;
- Centrífuga, VWR[™] – modelo Galaxy 16D;
- Estufa com graduação de temperatura entre 0 a 100°C, Nova Ética[®];
- Frascos de vidro transparente de boca larga, tampa do tipo rosca, de cor translúcida e capacidade de 70 g;
- pHmetro, Quimis[®];
- Viscosímetro *ViscoStar* (R), com adaptador para avaliação de amostras de massa reduzida e agulha (*spindle*) TR10, Fungilab[®].

3.3 Formulações cosméticas

A seguir, estão descritos os componentes da *Formulação 1* que foram selecionados de acordo com a estabilidade e compatibilidade com o ácido ursólico. O objetivo foi desenvolver uma preparação simples e estável para incorporação do ácido ursólico na sua forma livre e nanoparticulada.

Tabela 1. Componentes da *Formulação 1*

	Substância	INCI	% p/p	Análise crítica
	Estearato de glicerila	Glyceril Stearate	3,00	espessante e emulsionante
	Ácido esteárico	Stearic Acid	5,00	doador de consistência
	Cetil fosfato de potássio	Potassium Cethyl Phosphate	1,00	emulsificante
FO	Triglicérides dos ácidos cáprico/caprílico	Caprylic/capric Triglyceride	5,00	emoliente
	Óleo de soja	Soybean (Glycine Soja) Oil	5,00	emoliente
	BHT	Butylated hydroxytoluene	0,05	antioxidante
	Ácido ursólico (Livre ou Nanoparticulado)	Ursolic Acid	1,00	antioxidante e antimicrobiano (PA)
	Goma xantana	Xanthan Gum	0,10	espessante
	EDTA Na ₂	Dissodium EDTA	0,10	antioxidante/quelante
FA	Glicerina	Glycerin	8,00	umectante
	Fenoxietanol/ 2-Metil-4-Isotiazolin-3-ona	Phenoxyethanol/ 2-Methyl-4-Isotiazolin-3-one	0,50	conservante
	Água desmineralizada	Aqua	q.s.p 100,0	veículo

Legenda: FO – Fase Oleosa/ FA – Fase Aquosa/ INCI- International Nomenclature of Cosmetic Ingredient/ SA – Substância Ativa

A formulação foi concebida dentro do conceito “ecologicamente correto”, não contém parabenos e óleo mineral (derivado do petróleo) (CRODA, 2010). O conservante utilizado é isento de parabenos e os emolientes empregados são de origem natural.

A seguir, estão descritos os componentes da *Formulação 2*, uma base de caráter não-iônico, elaborada com o conceito “Cosmético Verde”, nova tendência mundial em cosméticos, que visa proteger a pele e o meio ambiente (VITAL ESPECIALIDADES, 2010; CRODA, 2010).

Tabela 2. Componentes da *Formulação 2*

	Substância	INCI	% p/p	Análise crítica
FO	Óleo de oliva	<i>Olea Europaea</i> (Olive) Fruit Oil	2,50	emoliente
	Olivato de Cetearila/Olivato de Sorbitano	Cetearyl Olivate/Sorbitan Olivate	7,00	emulsionante
	Álcool cetílico	Cetyl Alcohol	5,00	emoliente
	Triglicérides dos ácidos cáprico/caprílico	Caprylic/capric Triglyceride	2,50	emoliente
	Soiato de metila	Methyl Soyate	6,30	emulsionante
	Vitamina E	Tocopheryl Acetate	0,05	antioxidante
	Ácido ursólico (Livre ou Nanoparticulado)	Ursolic Acid	1,00	antioxidante e antimicrobiano (PA)
FA	Goma xantana	Xanthan Gum	0,25	espessante
	EDTA NA ₂	Dissodium EDTA	0,10	antioxidante/quelante
	Sorbitol	Sorbitol	10,30	umectante
	Fenoxietanol/ 2-Metil-4-Isotiazolin-3-ona	Phenoxyethanol/ 2-Methyl-4-Isotiazolin-3-one	0,30	conservante
	Água desmineralizada	Aqua	q.s.p. 100,0	veículo

Legenda: FO – Fase Oleosa/ FA – Fase Aquosa/ INCI- International Nomenclature of Cosmetic Ingredient/ SA – Substância Ativa

A *Formulação 2* é composta por um emulsionante natural, derivado da oliva, biodegradável e não etoxilado (Olivato de cetearila/Olivato de Sorbitano); além disso, não contém parabenos, silicones, PEG (polietilenoglicol), propilenoglicol e óleo mineral. Ao ser aplicada na pele e ao ser visualizada ao microscópio, apresenta formação de cristais líquidos, que além de aumentar a estabilidade da formulação, melhoram o sensorial de hidratação da pele (VITAL ESPECIALIDADES, 2010; MORAIS, 2006).

A seguir, estão descritos os componentes das *Formulações 3 e 4*.

Tabela 3. Componentes da *Formulação 3*

	Substância	INCI	% p/p	Análise crítica
	Álcool cetoestearílico/Álcool estearílico etoxilado	Cetearyl Alcohol, Cetareth-20	6,00	Cera autoemulsionante não-iônica
	Manteiga de cacau	<i>Theobroma cacao</i> Seed butter	12,20	agente de consistência e emoliente
FO	Óleo de jojoba	<i>Simmondsia</i> <i>chinensis</i> Seed Oil	8,00	emoliente
	Óleo de coco babaçu refinado	<i>Orbignya oleifera</i> Seed Oil	4,00	emoliente
	Ácido ursólico (Livre ou Nanoparticulado)	Ursolic Acid	1,00	antioxidante e antimicrobiano (PA)
FA	Glicerina	Glycerin	4,00	umectante
	Água desmineralizada	Aqua	q.s.p. 100,0	veículo
<i>Legenda: FO – Fase Oleosa/ FA – Fase Aquosa/ INCI- International Nomenclature of Cosmetic Ingredient/ SA – Substância Ativa</i>				

Tabela 4. Componentes da *Formulação 4*

	Substância	INCI	% p/p	Análise crítica
	Álcool cetoestearílico/Álcool estearílico etoxilado	Cetearyl Alcohol, Cetareth-20	6,00	Cera autoemulsionante não-iônica
	Óleo de semente de uva	<i>Vitis vinifera</i> Seed Oil	16,30	emoliente
FO	Óleo de jojoba	<i>Simmondsia chinensis</i> Seed Oil	8,00	emoliente
	Ácido ursólico (Livre ou Nanoparticulado)	Ursolic Acid	1,00	antioxidante e antimicrobiano (PA)
FA	Glicerina	Glycerin	4,00	umectante
	Água desmineralizada	Aqua	q.s.p. 100,0	veículo
<i>Legenda: FO – Fase Oleosa/ FA – Fase Aquosa/ INCI- International Nomenclature of Cosmetic Ingredient/ SA – Substância Ativa</i>				

As formulações foram desenvolvidas com o apelo “natural” por possuírem grande quantidade de matérias-primas naturais, como manteiga de cacau, óleo de jojoba, semente de uva e de coco babaçu refinado. Estes componentes podem conferir sensorial emoliente, hidratam a pele pela oclusão, diminuindo a perda de água transepidermal (TEWL - *Transepidermal Water Loss*) (AGNER & SERUP, 1993).

4 MÉTODOS

4.1 Preparo das formulações

O método de preparação envolveu a inversão de fases, considerando massa de 750 g. Neste método, pesaram-se os componentes da fase oleosa e aquosa separadamente até a temperatura de $75,0 \pm 5,0^{\circ}\text{C}$ e verteu-se a aquosa sobre a oleosa de forma lenta e constante com agitação manual até o resfriamento à 45°C (PRISTA, 1995). Cerca de 250 g foram adicionados de AUL (1% p/p), 250 g a adição de AUE (nanopartícula polimérica) (1% p/p) e 250 g a adição de AUC (carreador lipídico nanoestruturado; sendo que o AUC utilizado para o ensaio foi a Formulação 2 otimizada pelo planejamento fatorial descrito na Tabela 10 do Capítulo 2)(1% p/p) todos à temperatura ambiente e com homogeneização manual. Após a preparação, o conteúdo foi transferido para 8 frascos de vidro transparente de boca larga, tampa do tipo rosca, de cor translúcida e capacidade de 70 g para cada tipo de preparação. As formulações mantiveram-se em repouso por 48 horas após o preparo antes de serem submetidas à avaliação da estabilidade.

4.2 Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE)

4.2.1 Teste de Centrifugação

Foram pesados cerca de 5 g das formulações em tubos para centrífuga. O ensaio de centrifugações foi realizado nas seguintes condições: temperatura ambiente (25°C); velocidade de rotação de 3000 rpm, por 30 minutos.

Após o ensaio as formulações analisadas de acordo com o aspecto e classificadas da seguinte maneira (RIBEIRO, KHURY & GOTTARDI, 1996; ANVISA, 2004):

(IM) – intensamente modificada;

(M) – modificada;

(**LM**) – levemente modificada;

(**N**) – normal, sem alteração quanto ao aspecto

4.2.2 Teste de Estresse Térmico

Foram pesados cerca de 5 g das formulações em tubos de ensaio. As amostras foram submetidas ao estresse térmico, em banho-maria termostatizado Nova Ética, no intervalo de temperatura controlada entre 40 – 60°C, com progressão de elevação de 5°C/30 minutos.

Após o término, as formulações foram classificadas como **F1** (*Formulação 1*), **F1n** (*Formulação 1 com ácido ursólico em nanopartículas poliméricas*), **F2** (*Formulação 2*), **F2n** (*Formulação 2 com ácido ursólico em nanopartículas poliméricas*), **F3** (*Formulação 3*), **F3n** (*Formulação 3 com ácido ursólico em nanopartículas poliméricas*), **F4** (*Formulação 4*) e **F4n** (*Formulação 4 com ácido ursólico em nanopartículas poliméricas*).

4.3 Teste de Estabilidade Normal (TEN)

4.3.1 Condições dos testes

Os parâmetros avaliados envolvem as possíveis alterações físicas e físico-químicas, como: aspecto, cor, odor, valor de pH e de viscosidade aparente.

Os seguintes critérios foram adotados:

- i. Aspecto: integridade das amostras mantendo o aspecto inicial nas condições de armazenamento, exceto em temperatura elevada que pequena, modificação foi aceita;
- ii. Cor e odor: normais durante o armazenamento à luz solar indireta e ao abrigo da luz, leves modificações foram aceitas em temperatura elevada;
- iii. Valor de pH: não se admitiu variação superior $\pm 10\%$ comparada com o valor inicial, sob todas as condições de armazenamento;
- iv. Viscosidade aparente: admitiram-se modificações, desde que não comprometessem a percepção visual das amostras (ANVISA, 2004);

Em geral, o Teste de Estabilidade Normal apresenta duração de 90 a 120 dias e as condições de armazenamento são menos extremas (temperatura ambiente e luz solar indireta, $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; geladeira, $5,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; e estufa, $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ou $45,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), quando comparadas àquelas empregadas na APE. Os resultados obtidos no TEN podem ser extrapolados, a fim de prever o tempo de vida útil do produto, avaliar compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento empregado (BABY *et al.*, 2004; ANVISA, 2004).

As condições de armazenamento e periodicidade de leitura empregadas neste estudo foram, considerando 0º dia após 48h de repouso do preparo (ANVISA, 2004; RIBEIRO, 1996):

- Temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) ao abrigo da luz durante 90 dias - avaliação no 0º, 1º, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dias.
- Geladeira ($5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) durante 90 dias - avaliação no 0º, 1º, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dias.
- Temperatura ambiente com exposição à luz solar indireta ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) durante 90 dias – avaliação no 0º, 1º, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dias.
- Estufa ($45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) durante 90 dias - avaliação no 0º, 1º, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dias.

Ao iniciar a avaliação de estabilidade, o formulador deve planejar e sistematizar o estudo, por exemplo, qual a quantidade (massa ou volume) do produto que é necessária para a realização de todos os ensaios que foram pré-determinados, como: determinação do valor de pH; viscosidade aparente; características organolépticas e quantificação do teor de substância ativa e outras análises que o analista julgar serem necessárias (BABY *et al.*, 2004).

Nesta pesquisa, as variáveis analisadas foram: aspecto, cor, odor (características organolépticas), pH e viscosidade aparente (ANVISA, 2004).

As características organolépticas foram avaliadas por meio de percepção visual e olfativa, e em bancada de fundo branco, considerando-se as características das amostras recém preparadas.

A seguinte nomenclatura foi empregada para classificar as formulações quanto ao aspecto, cor e odor:

N = Normal, sem alteração; **LM** = Levemente Modificado; **M** = Modificado e **IM** = Intensamente Modificado.

É válido relatar que, para análise de pH, pesou-se 1g de cada formulação em tubo de ensaio, acrescentando-se 9 mL de água neutralizada (pH 7,0). Após dispersão da mistura, o pH foi mensurado à temperatura ambiente em pHmetro aferido com solução tampão pH 4,0 e 7,0 (VELASCO *et al.*, 2008).

A viscosidade aparente foi determinada utilizando-se viscosímetro (*spindle* 10) Fungilab®, modelo Visco Star-R. As formulações foram retiradas das condições de armazenamento 30 minutos antes de se iniciar as medições que foram conduzidas à temperatura ambiente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE)

A **Tabela 5** descreve os resultados obtidos após a APE por meio dos testes de centrifugação e estresse térmico.

Tabela 5 - Avaliação das formulações no estudo da Avaliação Preliminar da Estabilidade (teste de centrifugação e estresse térmico)

Formulações	Centrifugação	Estresse Térmico
Aspecto		
F1	N	M
F1n	N	M
F2	N	N
F2n	N	N
F3	N	IM
F3n	N	IM
F4	N	IM
F4n	N	IM

Legenda: **N** – aspecto normal; **LM** – levemente modificado; **M** – modificado; **IM** – intensamente modificado/ **F1 a 4** = Formulação 1 a 4/ **F1 a 4n**= Formulação 1 a 4 com ácido ursólico 1% p/p em nanopartículas poliméricas

A Avaliação Preliminar da Estabilidade demonstrou que, as *Formulações 3 e 4* apresentaram aspecto intensamente modificado com separação de fase durante o teste de estresse térmico, por isso foram eliminadas, enquanto que, para a *Formulação 1* foi modificado apenas quando a temperatura atingiu 60°C, sob as condições impostas. A *Formulação 2* manteve aspecto normal nas condições impostas.

A **Figura 2** ilustra as formulações após estresse térmico.

Figura 2. Formulações no Teste de Estabilidade Preliminar no intervalo de temperatura controlada entre 40 – 60°C, com progressão de elevação de 5°C/30 minutos: a) **F1 a 4**= Formulação 1 a 4, **F1 a 4n**= Formulação 1 a 4 com ácido ursólico 1% p/p em nanopartículas poliméricas

5.2 Teste de Estabilidade Normal (TEN)

5.2.1 Características organolépticas, valor de pH e de viscosidade

Existem inúmeros fatores que afetam a estabilidade das emulsões, incluindo o método de preparação, a natureza das matérias-primas, os efeitos dos eletrólitos, volume das fases interna e externa, concentração e o tipo dos emulsificantes (ÖZER *et al*, 2000).

O critério que controla a qualidade das formulações cosméticas envolve as propriedades físicas e sua relação com a estabilidade. Mudanças nas propriedades reológicas representam um aviso de maior predisposição para a ocorrência de problemas. As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, e as fontes da instabilidade das emulsões são comuns para todos os sistemas dispersos e os

agravantes deste problema são cremeação, floculação e coalescência das gotículas oleosas. Assim, a estabilidade representa um importante fator que pode ser percebido pelo consumidor, sendo que a desestabilização do sistema pode acarretar a perda das propriedades das emulsões (MOSTEFA *et al*, 2006).

Na **Figura 3** observam-se as formulações cosméticas durante Teste de Normal em exposição à luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, contendo emulsões com ácido ursólico livre e nanoparticulado.

Nas **Tabelas 6 e 7** estão descritos resultados da avaliação das características organolépticas, valor de pH e de viscosidade aparente das *Formulações 1 e 2* contendo AUL e AUE, e **Tabela 8** resultados da avaliação das características organolépticas, valor de pH e de viscosidade aparente da *Formulação 2* durante Teste de Estabilidade Normal.

Figura 3. Formulações no Teste de Estabilidade Normal: **a)** Exposição à luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; **b)** temperatura ambiente $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; **c)** refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e **d)** estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. *Legenda: AUE= Ácido ursólico em nanopartículas poliméricas, AUL= Ácido ursólico livre, F1= Formulação 1, F2= Formulação 2*

Tabela 6. Avaliação das características organolépticas, valor de pH e da viscosidade aparente (cP) da *Formulação 1* contendo ácido ursólico livre (AUL) e ácido ursólico em nanopartículas poliméricas (AUE) durante o Teste de Estabilidade Normal

Formulação 1 - Teste de estabilidade normal		Condições de armazenamento																																			
		Refrigerador (5,0 ± 2,0°C)									Temp. ambiente (25,0 ± 2,0°C)									Estufa (45,0 ± 2,0°C)									Luz solar indireta (25,0 ± 2,0°C)								
		tempo (dias)																																			
Variáveis		to	1	7	15	30	60	90	1	7	15	30	60	90	1	7	15	30	60	90	1	7	15	30	60	90											
Aspecto	AUE	Hom.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N										
	AUL	Hom.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N										
Odor	AUE	Carac.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N										
	AUL	Carac.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N										
Cor	AUE	L.E.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N										
	AUL	L.E.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N										
cP x 10 ²	AUE	21	22	21	20	19	20	21	21	21	25	23	11	12	36	35	27	14	6	7	25	34	32	35	32	33											
	AUL	22	22	22	22	22	25	23	22	23	28	29	22	24	33	34	27	14	6	7	28	36	36	40	35	35											
pH	AUE	4,6	4,5	4,7	5,9	5,4	6,8	6,0	4,6	4,6	4,6	5,7	5,5	5,8	5,5	4,6	4,5	5,7	5,1	6,2	4,9	4,6	5,8	5,5	5,7	5,6											
	AUL	4,7	4,7	4,7	5,8	5,7	6,8	6,0	4,7	5,0	5,4	5,8	5,8	5,7	4,6	4,8	5,7	5,2	5,8	5,7	4,9	4,7	5,8	5,5	6,0	5,7											

Legenda: Aspecto, odor e cor - **N** = normal; **LM** = Levemente modificado; **IM** = Intensamente modificado; **Hom.** = Homogêneo; **Carac.** = Característico; **L.E.** = Levemente esverdeado; cP = viscosidade aparente; t₀ = 48h do preparo

Tabela 7. Avaliação das características organolépticas, valor de pH e da viscosidade aparente (cP) da *Formulação 2* contendo ácido ursólico livre (AUL) e ácido ursólico em nanopartículas poliméricas (AUE) durante o Teste de Estabilidade Normal

Formulação 2 - Teste de estabilidade normal		Condições de armazenamento																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
		Refrigerador (5,0 ± 2,0°C)									Temp. ambiente (25,0 ± 2,0°C)									Estufa (45,0 ± 2,0°C)									Luz solar indireta (25,0 ± 2,0°C)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
		tempo (dias)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Variáveis		to																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Aspecto	AUE	Hom.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: Aspecto, odor e cor - **N** = normal; **LM** = Levemente modificado; **IM** = Intensamente modificado; **Hom.** = Homogêneo; **Carac.** = Característico; **L.E.** = Levemente esverdeado; cP = viscosidade aparente; t₀ = 48h do preparo

Tabela 8. Avaliação das características organolépticas, valor de pH e da viscosidade aparente (cP) da *Formulação 2* contendo ácido ursólico livre (AUL) e ácido ursólico em carreadores lipídicos nanoestruturados (AUC) durante o Teste de Estabilidade Normal

Formulação 2 - Teste de estabilidade acelerado+A38-AA68		Condições de armazenamento																								
		Refrigerador (5,0 ± 2,0°C)									Estufa (45,0 ± 2,0°C)									Luz solar (25,0 ± 2,0°C)						
Variáveis		tempo (dias)																								
		to	1	7	15	30	60	90	1	7	15	30	60	90	1	7	15	30	60	90						
Aspecto	AUC	Hom.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N						
	AUL	Hom.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N						
Odor	AUC	Carac.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N						
	AUL	Carac.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N						
Cor	AUC	L.E.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N						
	AUL	L.E.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N						
cP x 10 ²	AUC	1018	1133	1342	1150	1212	1197	1233	1052	979	1227	1246	1199	1074	979	1197	1179	1170	978	944						
	AUL	921	1009	1312	1231	1329	1231	1256	938	1140	1077	1051	1013	1099	1119	1132	896	1098	1119	1358						
pH	AUC	6,7	5,9	6,8	5,7	5,9	5,8	6,3	6,0	6,9	5,8	6,0	5,6	6,5	6,0	6,9	5,7	5,7	5,7	5,8						
	AUL	5,0	6,1	6,9	5,6	5,8	5,4	6,3	5,8	6,8	5,6	6,4	4,3	6,5	6,2	6,8	5,7	5,7	5,1	7,9						

Legenda: Aspecto, odor e cor - **N** = normal; **LM** = Levemente modificado; **IM** = Intensamente modificado; **Hom.** = Homogêneo; **Carac.** = Característico; **L.E.** = Levemente esverdeado; cP = viscosidade aparente; t₀ = 48h do preparo

Ao final dos 90 dias do estudo do Teste de Estabilidade Normal, a avaliação das características organolépticas revelou que as *Formulações 1* e *2* contendo AUE submetidas à condição de temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) apresentaram aspecto levemente modificado (textura mais líquida do que no t_0) nos tempos (t_{60}) e (t_{90}), e mais fluida que as formulações com AUL nas mesmas condições (variação de 100%), possivelmente devido ao AUE possuir água na formulação da sua nanopartícula.

Na condição geladeira ($5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), as *Formulações 1* e *2* contendo AUL obtiveram aspecto levemente modificado, apresentado uma textura um pouco mais viscosa, variando 20%, em comparação com o início (t_0), indicando que a condição de geladeira foi mais favorável para o armazenamento do AUE, enquanto que o AUL pode ser armazenado na temperatura ambiente e refrigerador, pelo atributo viscosidade. A maioria dos Testes de Estabilidade Normal aceitam 10% de variação no pH, porém estudos complementares deveriam ser realizados para verificar se haveria impacto a variação do pH de 10 para 20% (BABY, 2004).

A análise do valor de pH (**Tabela 6, 7 e 8**) não demonstrou mudança significativa para as Formulações, nas 4 condições de armazenamento, quando comparou-se o valor de pH no tempo (t_0) e ao final do estudo tempo (t_{90}). Sabendo-se que o ácido ursólico possui melhor ação antioxidante entre o pH 2 e 4 do que o α -tocoferol (YIN & CHAN, 2007), e que a pele saudável apresenta pH levemente ácido entre 4,6 – 5,8 (RIBEIRO, 2010; LEONARDI, GASPAR & CAMPOS, 2002). As *Formulações 1* e *2* foram preparadas com valor de pH próximo da atividade antioxidante e pH fisiológico da pele, ou seja, entre 4,6 e 5,2. A variação de pH abaixo ou acima o intervalo de 4,6 - 5,2 são regulamentadas pela lei, pela legislação brasileira e pelos estudos de eficácia e segurança de acordo com a aplicação do produto. Ao longo do estudo, nas condições de refrigerador, temperatura ambiente, e estufa, verificou-se tendência de elevação de pH para a *Formulação 2*, exceto na condição de luz solar indireta. Para a *Formulação 1*, a elevação do pH foi menor e mais homogênea em todas as condições. Em relação a variação do pH *versus* tempo, o AUC alcançou melhor desempenho que o AUL na *Formulação 2* e que o AUE na variação do pH x tempo.

A seguir, encontram-se os gráficos de variação da viscosidade x tempo da *Formulação 1* (**Figuras 4, 5 e 6**) e da *Formulação 2* (**Figuras 7, 8 e 9**) e de variação do pH x tempo da *Formulação 1* (**Figuras 10, 11 e 12**) e da *Formulação 2* (**Figuras 13, 14 e 15**) nas 4 variáveis do Teste de Estabilidade Normal.

5.3 Variação da viscosidade x tempo (Formulação 1)

Figura 4. Gráfico da *Formulação 1* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 5. Gráfico da *Formulação 1* com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 6. Comparação entre as Figuras 4 e 5 das condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ da *Formulação 1* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE)

Na **Figura 6** observou-se a comparação entre o AUL e o AUE na *Formulação 1* e o seu comportamento nas condições do Teste de Estabilidade Normal, frente a variação da viscosidade %. O AUL se comportou de forma semelhante ao AUE nas variáveis luz solar e estufa, enquanto que, em refrigerador o ácido ursólico em nanopartícula polimérica obteve ótimo desempenho, pois não houve variação significativa de viscosidade ($\leq 10\%$) durante os 90 dias de armazenamento, estando coerente com as recomendações da literatura (BABY, 2007). Na temperatura ambiente houve uma variação da viscosidade de aproximadamente 45% do AUE, enquanto que no AUL variou 30%. Esta diferença não foi perceptível visualmente pelo analista. Verifica-se que o refrigerador é a melhor condição para o AUL e AUE, sendo a temperatura ambiente a segunda escolha. A estufa foi a condição de maior alteração, em concordância com a resposta obtida na literatura, pois em temperaturas elevadas as formulações apresentam maior predisposição à degradação (BABY, 2007).

Em relação à viscosidade aparente (cP), não houveram alterações perceptíveis para as formulações, nas 4 condições de armazenamento, quando se comparou os valores no tempo (t_0) e ao final do estudo tempo (t_{90}) (KLEIN, 1999). Pôde-se observar no entanto, uma menor variação da viscosidade na *Formulação 2* contendo AUE comparando-se o tempo (t_0) em relação ao (t_{90}).

5.4 Variação da viscosidade x tempo (Formulação 2)

Figura 7. Gráfico da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$

Figura 8. Gráfico da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$

Figura 9. Comparação entre as Figuras 7 e 8 das condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE)

Observou-se na **Figura 9** a comparação entre as **Figuras 7** e **8**. O AUE se apresentou mais estável nas condições refrigerador, estufa e luz solar como pode-se comparar nos gráficos da *Formulação 2*. Enquanto que na condição estufa verificou-se alterações significativas apenas para o AUL. O AUE obteve uma maior variação da viscosidade (20%) no t(60) apenas na temperatura ambiente enquanto que o AUL obteve a mesma porcentagem de variação no t(30), esta variação não foi perceptível pelo analista.

Pode-se concluir que o AUE alcançou um melhor desempenho com a *Formulação 2* comparando-se com o AUL e a *Formulação 1* na variação da viscosidade *versus* tempo, em todas as condições, fator que propiciou a sua escolha neste estudo e no teste de penetração cutânea (Capítulo 4).

5.5 Variação pH x tempo (Formulação 1)

Figura 10. Gráfico da *Formulação 1* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 11. Gráfico da *Formulação 1* com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 12. Comparação entre as Figuras 10 e 11 das condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ da *Formulação 1* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE)

Como pôde-se observar comparando as Figuras 10 e 11, na Figura 12 o AUL e o AUE se comportaram de maneira similar em todas as condições do Teste de Estabilidade Normal analisando-se a variação do pH *versus* tempo na *Formulação 1*. As variações de pH foram superiores a 20% no final do Teste, sabendo-se que o aceitável na literatura é até 10% (BABY, 2004). A condição de refrigerador não foi adequada para o AUL e AUE, sendo esta uma condição referência, a temperatura ambiente e luz solar indireta foram as melhores condições da *Formulação 1* tanto com AUL como AUE.

5.6 Variação pH x tempo (Formulação 2)

Figura 13. Gráficos da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a 5,0 ± 2,0°C; temperatura ambiente a 25,0 ± 2,0°C; estufa a 45,0 ± 2,0°C e exposição a luz solar indireta 25,0 ± 2,0°C

Figura 14. Gráficos da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a 5,0 ± 2,0°C; temperatura ambiente a 25,0 ± 2,0°C; estufa a 45,0 ± 2,0°C e exposição a luz solar indireta 25,0 ± 2,0°C

Figura 15. Comparação entre as Figuras 13 e 14 das condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de nanopartícula polimérica (AUE)

Analisando-se a **Figura 15**, pôde-se verificar que o AUE (variou 40%) se comportou de forma melhor que o AUL (variou de 50 a 60%) nas variáveis refrigerador e estufa, mas não foi perceptível visualmente pelo analista. A condição luz solar indireta foi a melhor condição de armazenamento tanto para o AUL como AUE com variação inferior a 20%. A partir dos resultados é mais seguro se trabalhar com o prazo de 30 dias para a *Formulação 2*, mantendo em condição temperatura ambiente.

Permite-se, portanto afirmar que em relação a variação do pH *versus* tempo, o AUE e AUL se comportaram de forma similar, tanto na *Formulação 1* como na *Formulação 2*.

Tendo em vista a maior estabilidade da *Formulação 2*, esta foi selecionada para a realização do Teste de Estabilidade Normal comparando-se o AUL com o ácido ursólico na forma de carreador lipídico nanoestruturado (AUC) e para o teste de penetração cutânea.

A seguir, encontram-se os gráficos de variação da viscosidade x tempo (Figuras 16, 17 e 18) e de variação do pH x tempo (Figuras 19, 20 e 21) da *Formulação 2*, selecionada em ensaio anterior de estabilidade normal, nas 4 variáveis do Teste de Estabilidade Normal comparando-se o AUL com o AUC (carreador lipídico nanoestruturado).

5.7 Variação da viscosidade x tempo (AUC)

Figura 16. Gráfico da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 17. Gráfico da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma de carreador lipídico nanoestruturado (AUC) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 18. Comparação entre as Figuras 16 e 17 das condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de carreador lipídico nanoestruturado (AUC)

Observou-se na **Figura 18** a comparação entre as **Figuras 16** e **17**. O AUC se apresentou mais estável nas condições refrigerador, estufa e luz solar do Teste de Estabilidade Normal, frente a variação da viscosidade %, como pode-se comparar nos gráficos acima. O AUC obteve uma maior variação da viscosidade (20%) que o AUL na condição temperatura ambiente, porém esta variação não foi perceptível visualmente pelo analista. Na condição estufa, o AUC obteve um desempenho inferior ao AUL apenas no t(15).

Comparando-se as nanopartículas, AUC com AUE na variação da viscosidade x tempo para *Formulação 2*, o AUE obteve variação superior a 20% no t(60) na condição temperatura ambiente, enquanto que o AUC obteve variação superior a 20% no t(7) na condição refrigerador. Desta maneira as nanopartículas se comportaram de maneira similar na variação da viscosidade x tempo.

Pode-se concluir que o AUC alcançou um melhor desempenho com a *Formulação 2* comparando-se com o AUL na variação da viscosidade *versus* tempo, em todas as condições.

5.8 Variação pH x tempo (AUC)

Figura 19. Gráfico da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 20. Gráfico da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma de carreador lipídico nanoestruturado (AUC) e suas condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$

Figura 21. Comparação entre as Figuras 19 e 20 das condições do Teste de Estabilidade Normal: refrigerador a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; temperatura ambiente a $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; estufa a $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e exposição a luz solar indireta $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ da *Formulação 2* com 1% p/p de ácido ursólico na forma livre (AUL) e com 1% p/p de ácido ursólico na forma de carreador lipídico nanoestruturado (AUC)

Como pôde-se observar comparando as Figuras 19 e 20, na Figura 21 o AUC se comportou de forma mais estável que o AUL variando no máximo 20%, em todas as condições do Teste de Estabilidade Normal analisando-se a variação do pH *versus* tempo na *Formulação 2*. A variação do pH foi superior a 20% para o AUL em todas as condições do estudo de estabilidade normal, observando-se uma variação de até 60% do pH no t(90) na condição estufa.

Permite-se, portanto afirmar que em relação a variação do pH *versus* tempo, o AUC alcançou melhor desempenho que o AUL na *Formulação 2*.

Comparando-se as nanopartículas, AUC com AUE na variação do pH x tempo para *Formulação 2*, o AUE obteve variação superior a 20% a partir do t(15) em todas as condições do Teste de Estabilidade Normal, enquanto que o AUC obteve variação de no máximo 20% em todas as condições do Teste. Pode-se constatar a maior estabilidade do AUC em relação a AUE na variação do pH x tempo.

A partir dos resultados observou-se que o ácido ursólico na forma de carreador lipídico nanoestruturado obteve melhor estabilidade físico-química em

comparação ao AUL tanto na variação de viscosidade como na variação do pH, além de ter obtido melhor estabilidade em relação a AUE na variação de pH x tempo.

6 CONCLUSÕES

- O AUE alcançou um melhor desempenho com a *Formulação 2* comparando-se com o AUL e com a *Formulação 1* na variação da viscosidade *versus* tempo, em todas as condições de armazenamento (temperatura ambiente e luz solar indireta, $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; geladeira, $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; e estufa, $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), fator determinante na sua escolha neste estudo e no teste de penetração cutânea.
- Em relação a variação do pH *versus* tempo, o AUE e AUL se comportaram de forma similar, tanto na *Formulação 1* como na *Formulação 2*, no entanto, a condição temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) com luz solar indireta foi a melhor condição de armazenamento tanto para o AUL como AUE, com variação inferior a 20%. Na condição de temperatura ambiente, a resposta foi adequada até o tempo de 30 dias, o que sugere controlar o prazo de validade.
- A partir dos resultados obtidos a *Formulação 2* foi selecionada para a realização do Teste de Estabilidade Normal comparando-se o AUL com o AUC e para o teste de penetração cutânea.
- Observou-se que o AUC obteve melhor estabilidade físico-química em comparação ao AUL tanto na variação de viscosidade como na variação do pH, além de ter obtido melhor estabilidade em relação a AUE na variação de pH x tempo.

7 REFERÊNCIAS

* As referências estão de acordo com a norma NBR6023/2002, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. v.1, 47p. (Séries Temáticas da Anvisa. Qualidade em cosméticos, 1).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.211, de 14 de julho de 2005. Ficam estabelecidos a definição e a classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, conforme Anexos I e II dessa Resolução. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 jul. 2011.

AGNER, T.; SERUP, J. Time course of occlusive effects on skin evaluated by measurement of transepidermal water loss (TEWL) Including patch tests with sodium lauryl sulphate and water. **Contact Dermatitis**, v. 28, n. 1, p. 6-9, 1993.

ALLIANZ; OECD. Small sizes that matter: opportunities and risks of Nanotechnologies: report in co-operation with the OECD International Futures Programme. Allianz Center for Technology, 2005. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/4/38/35081968.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2011.

BABY, A. R; MACIEL, C. P. M; ZAGUE, V; KANEKO, T. M; CONSIGLIERI, V. O; VELASCO, M. V. R. Estabilidade de Produtos de Aplicação Tópica. **International Journal of Pharmaceutica Compounding**, v.6, n° 3, p 130-139, 2004.

BABY, A. R. **Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. São Paulo. 144p, 2007 (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

BALSAM, M. S.; SANGARIN, E. **Cosmetics: science and technology**. New York: Wiley-Interscience, v. 3, 1972.

BATLLE, C.; VILA, O.C. Protectores solares. **Venta OTC**, p.43-46, 1988.

BECHER, P. **Emulsions: theory and practices**. New York: Reinhold, 1965, p.1.

- BECHER, P., SCHICK, M. J. Macroemulsions In: SCHICK, M. J. **Nonionic Surfactants - Physical Chemistry**, v. 23, New York: Marcel Dekker Inc., 1987. p.435-491.
- BROOKS, B. W.; RICHMOND, H. N.; ZERFA, M. Phase inversion and drop formation in agitated liquid-liquid dispersions in the presence of nonionic surfactants. In: BINKS, B.P. **Modern Aspects of Emulsion Science**, **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, p. 175- 203, 1998.
- CAPEK, I. Degradation of Kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid Interfacial Science**, Amsterdam, v.107, p. 125-55, 2004.
- CHENG, Y.; DONG, Y.Y.; DONG, M.X.; WANG, C.; SU, N.; SUN, Y.T.; LIU, J.; ZHENG, H.; SCHRADER, A.; ROHR, M.; LIU, W. Protection effect of cosmetics on human skin under simulated rigorous environment. *Skin Research and Technology*, v.14, n.1, p.45-52, 2008.
- COSTA, F. M.; REIS, L. M.; OLIVEIRA, M. M. C. D.; NETO, P. R.; BRESANI, R. S. **Bioquímica do envelhecimento**. Disponível em: <<http://bioqdoenvelhecimento.blogspot.com/2009/11/envelhecimento-da-pele.html>>. Acesso em: 16 de Julho, 2011.
- CRAVELLO, B.; FERRI, A. Relationships between skin properties and environmental parameters. *Skin Research and Technology*, v.14, n.2, p.180-186, 2008.
- CRODA, Soluções Verdes. **Up Close and Green**. São Paulo: CD-ROM, 2010.
- CUA, A.B.; WILHEM, K.P.; MAIBACH, H.I. Elastic properties of human skin: relation to age, sex and anatomical region. **Archives of Dermatological Research**, v.282, p.283-288, 1990.
- DECCACHE, D. S. **Formulação Dermocosmética contendo DMAE Glicolato e Filtros Solares: desenvolvimento de metodologia analítica, estudo de estabilidade e ensaio de biometria cutânea**. Rio de Janeiro. 152p, 2006 (Tese de Doutorado – Faculdade de Farmácia – UFRJ).
- FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 12, p. 417- 425, 2000.

- FRONZA, T.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; TEIXEIRA, H. F. **Nanocosméticos: em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios**. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2007.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tegumento. In: _____. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.253-266.
- GOPAL, E. S. R. In: SHERMAN, P. **Emulsion Science**. London: Academic Press, 1969.
- GRIFFIN, W. C.; LYNCH, M. J.; LATHROP, L. B. Emulsions, parts one/two. **Drug and Cosmetic Industry**, v.10, p.41-45, 170-173, 1967.
- GUTERRES, S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanosphere and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v.2, p. 1-11, 2007.
- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v.224, n.1/2, p.1-18, 2001.
- HARBER, L.C.; LEO, V.A.; PRYSTOWSKY, J.H. Intrinsic and extrinsic photoprotection against UVB and UVA radiation. In: LOWE, N.J., SHAATH, N.A., eds. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker, p.359-378 [**Cosmetic Science technology Series**, v.10], 1990.
- HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAM, B. **Surfactants and polymers in aqueous solution**, 2 ed. New York: John Wiley & Sons Ltd. 2002. p. 451-71.
- ISHIDA, M.; OKUBO, T.; KOSHIMIZU, K.; DAITO, H.; TOKUDA, H.; KIN, T.; YAMAMOTO, T.; YAMAZAKI, N. Topical preparations containing ursolic acid and/or oleanolic acid for prevention of skin cancer. **Chemical Abstract**, v. 113, 12173y, 1990.
- IYER, S.; KIEVSKY, Y.; SOKOLOV, I. Fluorescent silica colloids for study and visualization of skin care products. **Skin Research and Technology**, v. 13, p. 317– 322, 2007.

- JEONG, M. W.; OH, S. G.; KIM, Y. C. Effects of amine oxide compounds on the zeta potential of emulsion droplets stabilized by phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v.181, p. 247-256, 2001.
- JIMÉNEZ, M.M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M.F.; MARTINI, M.C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v.272, p.45-55, 2004.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.359-370.
- KLEIN, K. Formulators forum. **Cosmetic & Toiletries**, New York, v.114, n.15, p.42-45, 1999.
- KREUTER, J. Nanoparticles. In: KREUTER, **Journal of Colloidal Drug Delivery Systems**. New York: Marcel Dekker, p.219-342, 1994.
- KUMAR, M.N.V.R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.3, p.234-258, 2000.
- LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J.F.; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROT, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly (caprolactone) nanocapsule form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v.82, p.319-334, 2002.
- LEONARDI, G. R. **Cosmetologia Aplicada**. Medfarma, p. 56-57, 2004.
- LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

- MAIA, A.M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico**. São Paulo, 2002. 117p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- MACIEL, C. P. M.; BABY, A.R. ; VELASCO, M. V. R. . **Desenvolvimento e Avaliação da Estabilidade de Formulações Cosméticas Anticelulíticas Contendo Extrato Comercial de Catuaba e Marapuama**. In: 12 Simpósio Internacional de Iniciação Científica, 2004, Ribeirão Preto. 12 SIICUSP. Ribeirão Preto, 2004.
- MARTI-MESTRES, G.; NIELLOUD, F. Emulsions in health care applications- An overview. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 23, n. 1-3, p. 419-439, 2002.
- MORAIS, G. G., **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**, 2006. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- MORRISON, J. D.; ROSS, S. Emulsions. **Colloidal Dispersions – Suspensions, Emulsions and Foams**, New York: John Wiley & Sons, p. 420-455, 2002.
- MOSTEFA, N.M; SADOK, A.H; SABRI, N; HADJI. Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modeling. **International Journal of Cosmetic Science**, v.28, p. 211-218, 2006.
- OBAGI, Z.E. **Anatomia e fisiologia da pele: uma visão Pessoal**. Rio de Janeiro: Revinter, p. 13-22, 2004.
- ORIÁ, B. R et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n.4, p. 425-434, 2003.
- ÖZER, Ö; BALOGLU, E; ERTAN, G; MUGUET, V; YAZAN, Y. The effect of type and the concentration of the lipophilic surfactant on the stability and release kinetics of W/O/W multiple emulsions. **International Journal of Cosmetic Science**, v.22, p.459-470, 2000.

- PAOLA, M.V.R.V., RIBEIRO, M.E. Interação entre filtros solares. **Cosmetic & Toiletries** (ed. Port.), São Paulo, v.10, n.5, p.40-50, 1998.
- PINHO, J. J. R. G.; STORPIRTIS, S. Formação e estabilidade física das emulsões, **Cosmetic & Toiletries** (ed. Port.), v.10, n.6, p.44-56, 1998.
- PRISTA, L. Nogueira. **Tecnologia farmaceutica**. Colaboracao de A. Correia Alves; Rui Morgado. 4. ed. Lisboa: Fundacao Calouste Gulbenkian. v.1 e 2, 1995.
- RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**. São Paulo: Pharmabooks, 1. ed., p. 9-25, 2006.
- RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**. São Paulo: Pharmabooks, 2. ed., 2010.
- RIBEIRO, A.M.; KHURI, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: **Anais do 10º Encontro Brasileiro de Químicos Cosméticos**. São Paulo, p. 349 – 375, 1996.
- ROYAL SOCIETY; ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies**: opportunities and uncertainties. London: Royal Society, 2004. Disponível em: <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>. Acesso em: 10 ago. 2011.
- SCOTTI, L.; VELASCO M. V. R. **Envelhecimento Cutâneo à Luz da Cosmetologia**. São Paulo: Tecnopress, p. 12-108, 2003.
- SHERIDAN, R. L.; TOMPKINS, R. G. Skin substitutes in burns. **Burns**, v. 25, n. 2, p. 97- 103, 1999.
- SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controled Release**, v.70, p.1-20, 2001.
- STOCKDALE, M. Filtros solares UVA: Métodos para avaliação de sua eficácia. **Cosmetic & Toiletries** (ed. Port), São Paulo, v.3, n.2/3, p.26-30, 1991.

- TADROS, T. F.; BECKER, P. In:_____. **Encyclopedia of Emulsion Technology**, New York: Marcel Dekker, v.1, 1983. p. 129-285.
- VAUTHIER, C.; DUBERNET, C.; FATTAL, E. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, p. 519-548, 2003.
- VELASCO, M. V. R.; MACIEL, C. P. M.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; CONSIGLIERI, V. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A.R. Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 181-196, 2008.
- VITAL ESPECIALIDADES**, Linha de bases Vital Green. Disponível em: <http://www.vitalespecialidades.com.br/lermais_materias.php?cd_materias=1535>. Acesso em: 8 de Julho, 2010.
- WASAN, D. T.; NIKOLOV, A. D. Foams and emulsions: the importance of structural forces. **Australian Journal Chemistry**, v. 60, p. 633-637, 2007.
- YIN, M. C.; CHAN, K.C. Nonenzymatic Antioxidative and Antiglycative Effects of Oleanolic Acid and Ursolic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7177-7181, 2007.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO URSÓLICO EM FORMULAÇÃO COSMÉTICA

RESUMO

O estudo da via de penetração transdérmica tem sido intensificado em função das vantagens em relação a administração oral ou intravenosa: tais como o metabolismo rápido, a biodisponibilidade limitada ou tolerância reduzida. As principais vantagens da via de administração tópica incluem: eliminação do metabolismo de primeira passagem, entrega do fármaco de forma sustentada, menor frequência de administração, menor incidência de efeitos adversos e maior adesão do paciente. Este trabalho teve como objetivo avaliação da penetração cutânea *in vitro* do ácido ursólico presente em formulações cosméticas, comparando a ação do ácido ursólico em sua forma livre, em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e em nanopartículas poliméricas (NP) em diferentes concentrações. O método cromatográfico descrito para se determinar o AU nos ensaios de penetração cutânea foi desenvolvido e validado obtendo-se os parâmetros: linearidade de 0,09 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; coeficiente de correlação de 0,999; limites de detecção e de quantificação, respectivamente, 0,57 e 1,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$; média intra-dia e inter-dia do desvio padrão relativo da precisão menor que 1,00% para a concentração de 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados demonstraram que o ácido ursólico permaneceu na superfície da pele. O ensaio de penetração cutânea não apresentou tendência para favorecer o transporte da substância ativa para a fase receptora. A maior concentração de AU na pele foi obtida das amostras de AU livre + emulsão (65%) seguidas das amostras de CLN + emulsão (33%) e das NP + emulsão (20%). A penetração cutânea obteve resultado ideal, pois, por se tratar de nanopartículas contendo um componente ativo antioxidante na superfície da pele, se associado a um filtro solar, atuaria contra os radicais livres resultando na maior proteção contra a radiação ultravioleta.

Palavras-chave: penetração cutânea, nanopartículas, formulação cosmética, ácido ursólico.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Sistemas de liberação transdérmica

Nos últimos anos, os sistemas de liberação transdérmica têm ganho interesse crescente pelo fato de ser uma forma viável de administração de medicamentos com aceitação pelos pacientes. Atualmente, os sistemas de liberação são: nicotina para cessação do tabagismo, a testosterona para hipogonadismo, o estradiol para reposição hormonal, escopolamina para a doença de movimento, clonidina e nitroglicerina para a doença cardiovascular (BENSON, 2005). O sistema de entrega transdérmica apresenta várias vantagens devido a superfície da pele ser relativamente grande e acessível aos processos de penetração e permeação cutânea. É um método não-invasivo que permite a intervenção contínua e possível de se evitar sobredose (ROBERTS & CROSS, 2002; CLEARY, 2003). Além do exposto, o sistema de liberação transdérmica tem vantagens sobre outros métodos de administração de fármacos, incluindo sua liberação direta no órgão afetado, duração prolongada da atividade (a administração dura por um período de tempo mais longo, proporcionando maior adesão do paciente ao tratamento) e redução dos efeitos adversos devido à otimização da concentração x tempo (entrega de ordem zero do fármaco) (BISSETT, 1987; FRANZ, TOJO & KYDONIEUS, 1991). Adicionalmente, a liberação transdérmica tem várias vantagens sobre a rota de liberação oral, incluindo a prevenção do metabolismo hepático de primeira passagem do fármaco e os efeitos de toxicidade relacionados (KREILGAARD, 2002; JADHAV *et al.*, 2006), evitando sua degradação sob a acidez do estômago, prevenção da liberação errática devido às interações alimentares, baixa absorção e irritação gastrointestinal (ROBERTS & CROSS, 2002; CLEARY, 2003).

No entanto, o maior problema da liberação de fármacos da via cutânea é associado, principalmente, com as propriedades de barreira do estrato córneo e, por essa razão, apenas alguns medicamentos e formulações estão disponíveis comercialmente (KREILGAARD, 2002). Portanto, a permeabilidade do fármaco na pele pode ser melhorada por meio da concepção de melhores formulações ou utilizando promotores de permeação, com o intuito de utilizar esta via a fim de aumentar a penetração do fármaco na pele (ROBERTS & CROSS, 2002). Existem alguns fatores que devem ser considerados, incluindo a natureza de barreira da

pele, as características físico-químicas da pele e do fármaco, raça, idade, estado da pele e local de aplicação (ROBERTS & CROSS, 2002; CLEARY, 2003).

O desafio no desenvolvimento de um sistema de entrega transdérmica eficaz não envolve apenas o transporte de uma quantidade elevada de fármaco através do estrato córneo mas, também, protege-lo da desativação e biotransformação, bem como fornecer uma farmacocinética e farmacodinâmica adequadas (LANGER, 2004). O objetivo da administração transdérmica envolve a maximização do fluxo através da pele, melhorando a concentração do fármaco, a fim de proporcionar uma liberação constante, lenta e contínua do medicamento durante um período prolongado de tempo (HILTON *et al.*, 1994; NAIK, KALIA & GUY, 2000; THOMAS & FINNIN, 2004), bem como reduzir a absorção sistêmica, em alguns casos (ROBERTS & CROSS, 2002).

1.2 Penetração cutânea *in vitro*

A pele humana é uma barreira eficaz e seletiva à penetração das moléculas (BARRY, 1983). A capacidade destas em permear a pele para liberação, quer sistêmica ou local (por meio das células da camada córnea, e de folículos pilosos), geralmente, depende da combinação de propriedades e da adequada posologia do sistema de liberação do fármaco. Frequentemente, apenas uma pequena percentagem de princípios ativos penetram no estrato córneo, pois esta fornece a maior barreira para a pele. A penetração cutânea é dependente da taxa de liberação de ingredientes ativos a partir da formulação e da sua penetração através da barreira da pele (COOPER, 1985). Os principais fatores que influenciam nos processos de penetração através da pele envolvem: solubilidade do fármaco, tamanho da molécula e seu coeficiente de partição. O coeficiente de partição pode ser determinado pelo tamanho molecular e polaridade do fármaco. Fármacos altamente lipofílicos atravessam facilmente a membrana em comparação com aquelas de baixa lipofilicidade, devido à estrutura de bicamada lipídica no estrato córneo (TSUCHIDA & ABE, 1982). Além disso, a hidratação é um fator crítico que afeta o transporte transdérmico, devido a capacidade de retenção de água pela queratina, sendo necessária pelo menos 10% de umidade, a fim de manter a flexibilidade e suavidade da pele (WESTER, MOBAYEN & MAIBACH, 1985).

Para a obtenção de adequados resultados terapêuticos, o sistema de liberação eficaz da pele deve liberar o fármaco para o seu local de destino e uma concentração terapêutica deve ser mantida durante um período de tempo adequado. Além disso, é importante compreender como os princípios ativos penetram na pele e como este processo pode ser influenciado para melhorar a sua penetração. Em alguns produtos cosméticos, tais como filtros solares, os compostos ativos são dirigidos para aderir às camadas superiores do estrato córneo, com uma penetração mínima na pele (SHROOT & AUST, 2006).

1.2.1 Rotas para penetração cutânea de fármacos

Existem três vias principais através da pele na qual o fármaco presente em uma formulação tópica pode difundir-se do nível mais externo da pele para o tecido viável. Estas vias são: transcelular (através da célula da camada córnea), intercelular (entre os espaços da camada córnea) e folicular (através de folículos de cabelo com glândulas sebáceas associados e/ou das sudoríparas) (**Figura 1**) (ROBERTS & CROSS, 2002; BERARD, MARTY & NICOLAS, 2003; KANGA, 2006).

Figura 1. Diagrama de vias de penetração do fármaco na pele. A via intercelular (1), via transcelular (2) e através dos folículos pilosos com glândulas sebáceas associados (3) (BARRY, 2001)

As rotas transcelular e intercelular são vias para os compostos penetrarem através do estrato córneo e é, também, denominada como rota transepidérmica. A importância relativa da rota folicular contra transepidérmica tem sido debatida por pesquisadores ao longo dos anos. A via intercelular é considerado rota mais importante, enquanto as transcelular e folicular são, geralmente, menos importantes. Enquanto alguns pesquisadores dão importância para a rota transcelular, o interesse está crescendo e se tornando mais importante na rota de liberação folicular (ROBERTS & CROSS, 2002).

1.2.1.1 Rota Transepidérmica

A rota transepidérmica é a principal via de penetração do fármaco na penetração cutânea, mesmo o estrato córneo sendo amplamente conhecido como a principal barreira na pele. A estrutura do estrato córneo é descrito como "tijolos e argamassa" modelo (**Figura 2**). Os 'tijolos' se referem à camada córnea, composta de queratinócitos hidrofílicos, e o circundante é a membrana de bicamada lipídica multilamelar lipofílica que preenche os espaços extracelulares formando a "argamassa" (ELIAS & FEINGOLD, 2001; NEMES & STEINERT, 1999). A membrana é interrompida apenas por apêndices, tais como os folículos pilosos e glândulas sudoríparas. A estrutura da camada córnea inclui esteróis livres ou esterificados, ácido graxo livre, triglicerídeos e esfingolípido, que permanecem em camadas duplas, onde, os componentes hidrofílicos e lipofílicos estão em regiões separadas. Estas bicamadas formam regiões com estrutura líquida de gel semicristalina (ELIAS & FEINGOLD, 2001; NEMES & STEINERT, 1999).

Figura 2. Representação esquemática do "tijolo e argamassa" modelo de estrato córneo, a organização da bicamada lipídica e duas possíveis vias de penetração da droga através do estrato córneo, via transcelular ou intercelular (MOGHIMI, WILLIAMS & BARRY, 1999)

O fármaco atravessa o estrato córneo por duas vias distintas: a via transcelular ou intercelular. A via principal para a maior parte da droga aplicada é através de espaços intercelulares, que são os espaços livres entre os corneócitos. Trata-se de difusão do soluto entre células adjacentes. Portanto, a maioria dos métodos de avaliação da penetração cutânea tem por objetivo interromper ou ultrapassar esta estrutura molecular. Moléculas lipossolúveis encontram o seu caminho através do estrato córneo por difusão através das zonas hidrofóbicas, as membranas de bicamada lipídica; enquanto que as áreas hidrofílicas permitem a passagem do material solúvel em água, tais como moléculas polares ou carregadas circularem. No entanto, a via transcelular fornece o movimento de solutos através do interior da célula e da membrana basolateral por processos ativos ou passivos. O comprimento de difusão através da via transcelular corresponde à espessura média da camada córnea, ou seja, a partir de 10-40 μm . Contudo, a via intercelular é estimada em ~ 500 μm , o que é muito mais longo do que a espessura do estrato córneo (BERARD, MARTY & NICOLAS, 2003). Através desta via, a difusão envolve repetidos passos

de particionamento para os domínios hidrofílicas e lipofílicas dos corneócitos e camadas de lipídios antes de atingirem a epiderme viável. Além disso, esta via é limitada pelo tamanho da molécula e por mudanças com a existência de junções estritas (HADGRAFT, 2004).

Promotores da penetração cutânea podem afetar o estrato córneo a nível de hidratação, via transcelular, rompimento de lipídeos intercelulares ou causando mudança conformacional de queratinócitos (HATANAKA *et al.*, 1995; BLACK, 1993). Promotores, tais como o etanol ou sulfato dodecil de sódio (SDS), pode trocar o percurso de penetração dos fármacos entre as vias intercelulares e transcelular, dependendo do seu modo de ação e lipofilicidade (MOGHIMI, WILLIAMS & BARRY, 1996).

1.2.1.2 Rota Folicular

A rota Folicular na liberação transdérmica tem sido controverso e permanece desta maneira. Entretanto, esta via desempenha um papel importante no transporte na pele, apesar do orifício dos folículos pilosos, ocuparem apenas cerca de 0,1% do total da área de baixa densidade da superfície de pele, e até 10% em áreas de alta densidade, tais como a face e do couro cabeludo (RHEIN, 2006; ROBERTS & CROSS, 2002; SCHAEFER *et al.*, 1990; WAUGH, NOBLE & SCOTT, 2004). De fato, os folículos pilosos demonstram potencial para penetração devido a uma invaginação da epiderme estendendo-se profundamente na derme (EBLING, HALE & RANDALL, 1991). Devido aos folículos pilossebáceos e glândulas sudoríparas atravessarem a camada córnea, estes proporcionam uma rota que contorna intacta o estrato córneo da rota de liberação transepidérmica. As vias oferecem uma zona de menor resistência a penetração de fármacos (BERARD, MARTY & NICOLAS, 2003), especialmente para grandes substâncias polares e íons que encontram dificuldades para atravessarem intactos o estrato córneo. Micro e nanopartículas demonstram penetrar e concentrar-se no fundo dos folículos pilosos (CONTRERAS, 2007; ALVAREZ-ROMAN *et al.*, 2004) (**Figura 3**). Este fenômeno pode ser considerado como altamente permeável a barreira devido a esta possuir apenas algumas camadas de queratinócitos diferenciados (CONTRERAS, 2007).

Figura 3. Representação esquemática do efeito do tamanho molecular sobre a penetração de solutos em folículos pilosos (LIEB *et al.*, 1997)

Comparado aos queratinócitos no estrato córneo, as células das glândulas sebáceas proporcionam uma via mais permeável. Por conseguinte, os medicamentos podem atingir a camada intermediária da pele (derme) mais facilmente, ignorando o estrato córneo. A absorção também é reforçada pelo sangue, mesmo a rota possuindo relativamente pequena área transversal (BARRY, 2001). Outras vantagens farmacocinéticas da liberação folicular incluem, a redução da toxicidade sistêmica, pois os folículos atuam como reservatório de liberação a longo prazo diminuindo a frequência da dose aplicada e aumentando o efeito de alvos terapêuticos específicos, especialmente no tratamento de pilossebáceos ou folículo piloso associados a doenças (CONTRERAS, 2007; ALVAREZ-ROMAN *et al.*, 2004, LAUER *et al.*, 1995). Características especiais de partículas coloidais e polímeros podem direcionar os folículos, modificando suas propriedades (BARRY, 2001). Além disso, Lademann têm demonstrado que a penetração depende do tamanho de partícula independente do tipo de cabelo (pêlos terminais *versus* vellus), e sim, da atividade do folículo, isto é, a produção de crescimento do cabelo e sebo

(LADEMANN *et al.*, 1999; 2001; 2006; SCHAEFER & LADEMANN, 2001), que proporciona uma rota lipoidal (EBLING, HALE & RANDALL, 1991).

1.3 Fatores físico-químicos da penetração cutânea

Um eficaz promotor de penetração da pele deve satisfazer os seguintes requisitos: deve ser inodoro e incolor; específico no seu modo de ação; farmacologicamente inerte; compatível com fármacos e outros excipientes, quimicamente e fisicamente estável; não-alérgico, não irritante e não-tóxico; o seu efeito sobre a barreira da pele deve ser reversível e ter efeito rápido para uma duração previsível de tempo. No entanto, é improvável que um composto particular seja capaz de satisfazer todos estes critérios (LEITE-SILVA *et al.*, 2012).

Promotores de penetração podem ser produtos naturais, tais como terpenos ou ácidos graxos, ou materiais sintéticos. Alguns exemplos de promotores de penetração são álcoois, terpenos, uréia e seus derivados, fosfolípidos, propilenoglicol, miristato de isopropila (TROMMER & NEUBERT, 2006; WILLIAMS & BARRY, 2004).

Ao se considerar a escolha de um promotor de penetração a segurança é o fator principal e, conseqüentemente, há relativamente poucos em uso com suas propriedades bem compreendidas. Efeitos sinérgicos resultantes da combinação de duas substâncias atuando por diferentes mecanismos, têm sido demonstrada por um número de combinações, incluindo terpenos, ácido oléico ou análogos de uréia e co-solventes, tais como propilenoglicol, transcutool ou álcoois (BENSON, 2005; GU *et al.*, 2009)

Várias técnicas físicas podem ser utilizadas antes ou durante a aplicação tópica para intensificar a penetração da pele. Estas podem ser classificados de acordo com o seu efeito sobre a pele. Os métodos mecânicos, tais como dermoabrasão e *tape stripping* reduzem a espessura do estrato córneo, enquanto a flexão, alongamento ou massagem enfraquecem a barreira geral. Técnicas de injeção direta (micro-agulhas) ultrapassam a barreira do estrato córneo, técnicas abrasivas ou cavitacionais utilizam a aplicação de energia (ultrassom, radiofrequência, etc.) diretamente sobre a pele. Finalmente, as técnicas, tais como iontoforese, magnetoforese e ultrassom não-cavitacional aumentam a força motriz na molécula

penetrante. Cada técnica possui vantagens que podem torná-las mais adequadas para fins específicos, bem como desvantagens. Combinações e/ou aprimoramento físico com formulação otimizada, incluindo promotores químicos são estratégias promissoras que podem vir a ser cada vez mais empregadas (LEITE-SILVA *et al.*, 2012).

1.4 Nanotecnologia na penetração cutânea

Nos últimos anos, o campo de nanomaterial na liberação de fármaco na pele progrediu a um ponto onde existem ferramentas específicas, tais como as nanopartículas de lipídeos sólidos ou flexíveis, e dendrímeros com capacidade para liberação personalizada ou orientada. Existem nanopartículas para aumentar ou diminuir o fluxo, personalizar o local de depósito de fármacos, e até mesmo para selecionar a permeabilidade no estrato córneo (PROW *et al.*, 2011). Para aumentar ainda mais a penetração na pele de moléculas encapsuladas, as partículas mais recentes, como niosomas, etosomas, e transfersomas têm sido desenvolvidas para melhorar algumas das características dos lipossomas.

Niosomas são produzidas de misturas de tensoativos não-iônicos, colesterol, e, por vezes, pequenas quantidades de fosfolipídeos e foram desenvolvidas para aumentar a estabilidade dos lipossomas. Estas partículas são rígidas e podem ser negativamente ou positivamente carregadas (CHOI & MAIBACH, 2005). Os etosomas, contém 20 a 45% de etanol, foram criados para aumentar a penetração na pele, aumentando a elasticidade da vesícula lipídica. Suas bicamadas lipídicas são fluidas e estas são geralmente carregadas negativamente (GODIN & TOUITOU, 2003). Transfersomas são constituídos de fosfolípidos adicionados a tensoativos que atuam como ativadores, proporcionando elasticidade e deformabilidade a vesícula. Eles são ultradeformáveis e, geralmente, carregado negativamente (BAROLI, 2010; BENSON, 2006).

Em 2010, GEUSENS desenvolveu os nanosomas, denominados tensoativo-etanol-colesterol-osomas (SECosomas), que apresentaram excelente tamanho, carga de superfície, morfologia, deformabilidade, eficiência de transfecção, estabilidade e capacidade de penetração na pele após a complexação com pequenos fragmentos de RNA. A maior flexibilidade destas partículas aumentam sua

capacidade de atravessar a membrana epidérmica humana intacta para liberar a sua carga (fármaco/substância ativa) no alvo das células epidérmicas.

Avanços na tecnologia de produção e na compreensão de como as nanopartículas interagem com a barreira do estrato córneo, as características estruturais da pele, tais como sulcos e seus apêndices são essenciais para o desenvolvimento de nanocarreadores viáveis para os sistemas de liberação de fármacos. Assim como o entendimento da absorção e da cinética de eliminação de substâncias ativas a partir de reservatórios, (sulcos e apêndices) permitem a concepção de nanocarreadores com propriedades específicas para distribuição exata de cargas em doses efetivas para alvos celulares. Ao mesmo tempo, é essencial que os efeitos toxicológicos de sistemas baseados em liberação de nanopartículas sejam entendidos antes de serem aprovados para uso pelo paciente/consumidor (PROW *et al.*, 2011).

2 OBJETIVOS

Avaliação da penetração cutânea *in vitro* do ácido ursólico presente em formulações cosméticas, comparando a ação do ácido ursólico em sua forma livre, em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e em nanopartículas poliméricas (NP) em diferentes concentrações.

3 MATERIAL

3.1 Matérias-primas - (*INCI – International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) e grau de pureza.

Todas as matérias-primas possuem grau de pureza farmacêutico.

- Ácido ursólico -- (*Ursolic acid*) 90%, HighChem;
- Água desmineralizada, MilliQ®;
- Álcool cetílico, Vital especialidades;
- Dodecil sulfato de sódio – (*Sodium dodecil sulfate*) (SDS) 99%, Merck;
- EDTA dissódico, Vital especialidades;
- Fenoxietanol/2-Metil-4-Isotiazolina-3-ona (Conserv NE®), Vital especialidades;
- Goma xantana (CG SFT®), Vital especialidades;
- Lecitina – (*Lecithin*), Mapric;

- Monoestearato de sorbitan – (*Sorbitan monoestearate*) (Span[®] 60), J.T.Baker;
- Monooleato de sorbitano – (*Polysorbate 80*) (Tween[®] 80), J.T.Baker;
- Oleato de sorbitan – (*Sorbitan oleate*) (Polissorbato 80), J.T.Baker;
- Óleo de oliva - (*Olea europaea* (Olive) Fruit Oil), Vital especialidades;
- Olivato de Cetearila/Olivato de Sorbitano – (*Cetearyl Olivatate/Sorbitan Olivatate*) (Olivem 1000[®]), Vital especialidades;
- Palmitato de cetila – (*Cetyl palmitate*), Mapric;
- Poli ϵ -caprolactona -- (*Poly ϵ -caprolactone*) MM: 60 000 Dalton;
- Polímero de metiloxirano com oxirano – (*Poloxamer 188*), (Lutrol[®] micro 68 MP), Basf;
- Soiato de metila – (*Methyl soyate*), Vital especialidades;
- Sorbitol - (*Sorbitol*), Vital especialidades;
- Triglicérides dos ácidos cáprico/caprílico – (*Caprylic/capric trygliceride*), Mapric;
- Vitamina E - (*Tocopheryl Acetate*), Vital especialidades;

3.2 Padrão de referência

- Ácido ursólico com teor de pureza de 99%, grau de pureza farmacêutico, Sigma-Aldrich[®].

3.3 Solventes e reagentes

- Acetona, padrão de pureza analítico 99,5%, Synth;
- Acetonitrila grau de pureza cromatográfico, Synth;
- Ácido fosfórico grau de pureza cromatográfico, Synth;
- Água MilliQ;
- Etanol grau de pureza cromatográfico, Synth;
- Metanol grau de pureza cromatográfico, Synth;
- Tampão fosfato, PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pH 7,4, grau de pureza analítico, Merck;

3.4 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Agitador Magnético com aquecimento, modelo Q261, Quimis®;
- Balança analítica, modelo AUY 220, Shimadzu®, precisão 1 mg-220 g;
- Banho termostático digital com agitação e graduação de temperatura entre 25 a 100°C – Nova Ética;
- Células de difusão vertical área 3,14cm²;
- Coluna Luna C18 150 x 4,60 mm 5 µm, Phenomenex® catálogo N° AJO-4287;
- Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência, Shimadzu®, detector de arranjo de diodos SPD-M10AVP, auto injetor Shimadzu SIL-10A, bomba Shimadzu LC-10AS gerido por Shimadzu Class VP Software e Excel 2002, detector ultravioleta (UV) variável com integrador CBM-20A;
- Cronômetro digital para uso em laboratório SW2018, Cronobio;
- Fitas *tape stripping*, padrão *D-squame* D100, *Cuderm Corporation*;
- Fórceps inoxidável, Sayco;
- Frasco de vidro de capacidade de 30 mL;
- Membrana filtrante com abertura 0,45 µm, Millipore®;
- Multímetro digital, Q1563 3,5 dígitos 24 voltagm 240V, Fluke;
- Peagâmetro, Quimis®;
- *Swab* de algodão n° 240, *Macpherson's Consumer Products Pty Ltd*;
- Tesoura inoxidável n° 07243006 25mm 1" , *J Blackwood and Sons Pty Ltd*;

4 MÉTODOS

4.1 Penetração cutânea – Procedimento

A pele humana utilizada para este estudo foi excisada de cirurgia plástica abdominal com aproximadamente 2 cm de profundidade de gordura subcutânea e 15 cm de extensão, foi limpa e a gordura subcutânea removida antes de ser congelada durante aproximadamente 2 meses. Após ser reidratada durante 10 minutos em toalha de papel embebido com tampão fosfato, a integridade da amostra de pele foi examinada pelo método físico da resistência utilizando o multímetro digital para verificar a presença de dano. Valores maiores que 20 g/h⁻¹m⁻² indicou a

não utilização da pele para o estudo, pois demonstraram que o estrato córneo não estava em boas condições.

Os estudos foram realizados com o método de célula de Franz (área 3,14 cm²). A pele foi posicionada entre o doador e o compartimento receptor de uma célula de difusão vertical e hidratada durante 1 hora com tampão fosfato de PBS (pH 7,4), secando-se gentilmente com *swab*.

As amostras aplicadas foram:

- Emulsão (INCI Nomeclaturas) - (*Olea europaea (Olive) Fruit Oil* 2,50%, *Cetearyl Olivatate/Sorbitan Olivatate* 7,00%, *Cetyl Alcohol* 5,00%, *Caprylic/capric Triglyceride* 2,50%, *Methyl Soyate* 6,30%, *Tocopheryl Acetate* 0,05%, *Ursolic Acid* 1,00%, *Xanthan Gum* 0,25%, *Dissodium EDTA* 0,10%, *Sorbitol* 10,30%, *Phenoxyethanol/ 2-Methyl-4-Isouthiazolin-3-one* 0,30%, *Aqua* q.s.p. 100,0%);

- Ácido ursólico livre + emulsão;
- AU em carreadores lipídicos nanoestruturados + emulsão;
- AU em nanopartículas poliméricas + emulsão;

A emulsão utilizada foi a *Formulação 2*, previamente selecionada no Capítulo 3, e o carreador lipídico nanoestruturado utilizado para o ensaio foi a *Formulação 2* otimizada pelo planejamento fatorial descrito na Tabela 10 do Capítulo 2. As amostras foram aplicadas uma dose finita de 9mg/cm² no compartimento doador, com um espalhamento homogêneo sobre a área de pele. A quantidade de AU utilizado nas amostras foi de 2,5 mg + 5,0 g de emulsão, aplicada na dose de 9mg/cm² e resultaram em 4,5 µg aplicados na pele. Após, as mesmas foram expostas ao ar em condições não oclusivas, em temperatura ambiente de 22,0°C. O líquido receptor foi composto de PBS + 30% v/v de etanol e foi aquecido a 35,0°C, sob constante agitação magnética. A solubilidade do AU neste fluido foi verificada antes do experimento. Quatro replicatas foram utilizadas para neste estudo, portanto foram utilizados 16 pedaços de pele em 16 células de Franz. O fluido receptor foi recolhido após 1, 3, 6 e 24 horas do tempo de exposição.

4.2 Análise do AU na pele

A quantidade de AU foi determinada em cinco locais diferentes: superfície da pele (SP), estrato córneo (EC), epiderme viável (EV), derme (D) e no fluido receptor

(FR) por Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando método analítico desenvolvido e validado (USP, 2012).

Após 24h, a pele foi retirada da célula de Franz e com ajuda de *swabs* embebidos em acetonitrila foram removidas amostras da superfície da pele (SP) (triplicata), a fim de determinar-se a dose que não penetrou na superfície desta. Os 3 *swabs* foram colocados no mesmo frasco para cada pedaço de pele.

O próximo passo foi realizada a técnica do *tape stripping* (TS). Cada fita foi colocada em frascos diferentes. Foram utilizados 20 fitas e após a eliminação do EC pelo procedimento TS, a epiderme viável (EV) foi separada da derme (D), colocando-se os pedaços de pele em água corrente fervente a 60°C durante 90 segundos, separando-se a camada da epiderme da derme utilizando fórceps, cada componente foi colocado num frasco de vidro de capacidade de 30 mL (procedimento desenvolvido no laboratório *Therapeutics Research Unit - University of Queensland*, Brisbane/Austrália). As amostras da derme foram cortadas em fragmentos pequenos de 1-3 mm para desta maneira aumentar o processo de extração.

4.3 Extração do AU

As amostras de *swab* foram adicionados exatamente 1600 µL de acetonitrila (quantidade suficiente para cobrir a totalmente o *swab*), enquanto que 800 µL foram suficientes para as amostras das fitas, a epiderme viável e a derme, sendo que estas foram deixadas durante a noite antes de iniciar-se a medida por Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os seis primeiros TS foram analisados separadamente e os 14 restantes foram reunidos em grupos três e quatro, para se obter maior concentração de AU.

4.3.1 Validação do método

A solução padrão estoque de AU padrão de referência secundário (100,0 µg/mL) foi preparado por dissolução de exatamente 5,0 mg de AU em 50,0 mL de acetonitrila em balão volumétrico utilizando-se balança analítica. Uma alíquota de 300 µL da solução padrão estoque foi transferida para *ependorf* e adicionaram-se 300 µL de acetonitrila, obtendo-se a concentração de 50 µg/mL. Repetiu-se o

mesmo procedimento para a concentração de 50 µg/mL a fim de obter uma amostra de 25 µg/mL e assim sucessivamente, obtendo-se concentrações finais de 100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,79; 0,39; 0,19; 0,09 µg mL⁻¹.

A curva analítica para o ácido ursólico foi construída com valores da concentração versus a área do pico obtida. A equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

O método foi validado segundo a Resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003) e a *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use* (ICH, 1996) em termos de: linearidade, limite de detecção e de quantificação e precisão (inter e intra-dia).

A metodologia analítica seguiu as seguintes orientações:

- Coluna: Coluna Luna C18 150 x 4,60 mm 5 µm, Phenomenex[®] catálogo Nº AJO-4287
- Equipamento: Cromatógrafo a líquido Shimadzu
- Modo: fase reversa
- Método: isocrático
- Fase móvel: ACN (acetonitrila): solução aquosa de H₃PO₄ 0,1% v/v (88:12)
- Vazão: 1,0 mL/min
- Injeção: automática
- Volume injetado ("loop"): 50 µL
- Detecção no UV: 210 nm
- Temperatura: 25°C
- Tempo de retenção aproximado: 7 minutos

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Penetração cutânea

A avaliação da penetração cutânea do ácido ursólico veiculado a emulsão possui como modelo de membrana a pele humana excisada de cirurgia plástica abdominal. O procedimento para o estudo de penetração cutânea está descrito no item 4.1. As alíquotas foram coletadas do fluido receptor nos tempos pré-definidos 1; 3; 6; e 24 horas.

Conforme apresentado nos cromatogramas da **Figura 4**, o ensaio de penetração cutânea não apresentou tendência para favorecer o transporte da substância ativa para a fase receptora. Consequentemente, não foi verificada penetração cutânea do ácido ursólico através da pele humana no período de 24 horas.

Figura 4. Cromatogramas referentes: **(A)** Padrão de referência secundário de ácido ursólico, pureza de 99% (100,0 µg/mL) **(B)** Amostra do fluido receptor (4,5 µg/mL) **(C)** Amostra de solução do TS **(D)** Amostra de solução da Derme **(E)** Amostra de solução da Epiderme viável. Condições cromatográficas: coluna C18 150 x 4,60 mm 5 µm; fase móvel acetonitrila:solução aquosa de H₃PO₄ 0,1% v/v (88:12); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 50,0 µL; detecção 210 nm; temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C)

Verificou-se que o ácido ursólico permaneceu na superfície da pele como observado na **Tabela 1** nas amostras retiradas dos *swabs* (método descrito no item

4.2). Não foram detectados AU ao se analisar as fitas obtidas pelo processo de TS, na epiderme viável, na derme ou no fluido receptor como constatado na **Figura 4**.

Tabela 1. Áreas e concentrações de ácido ursólico detectados em cotonetes na superfície da pele

Amostras Swabs	Área	Concentração (µg/mL)
1	Pico não detectado	-----
2	“	“
3	“	“
4	“	“
5	128375	4,122
6	76017	3,619
7	50767	2,412
8	33859	1,604
9	25783	1,218
10	29618	1,401
11	38582	1,830
12	34710	1,645
13	12536	0,585
14	21345	1,006
15	18680	0,879
16	23703	1,119

Legenda: Swabs 1-4: Emulsão; Swabs 5-8: AU livre + emulsão; Swabs 9-12: AU em carreadores lipídicos nanoestruturados + emulsão; Swabs 13-16: AU em nanopartículas poliméricas + emulsão

Nas amostras 1 a 4 não foi detectado o ácido ursólico pois trata-se apenas da emulsão sem substância ativa substância ativa substância ativa. Os swabs 5 a 8 são referentes ao ácido ursólico livre obtendo-se grande concentração de AU (65%); os de nº 9 a 12 obtiveram concentração de 33% de ácido ursólico nos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN); nos swabs 13 a 16 foi obtida a menor concentração, 20% de AU nas nanopartículas poliméricas (NP). Portanto, pode-se concluir que a maior concentração de AU na pele foi obtida das amostras de emulsão + AU livre, seguidas das amostras de CLN + emulsão e das NP + emulsão. A incapacidade de penetração dos CLN foi confirmada por alguns experimentos realizados na compreensão do modo de ação destes carreadores (BAROLI, 2010). Foi demonstrado que estes formam uma película oclusiva na pele, sendo que algumas partículas podem ser encontradas intactas durante remoção do primeiro

tape stripping da camada córnea (MULLER, RADTKE & WISSING, 2002). Portanto, conclui-se que a incapacidade de penetração observada foi devida às propriedades de oclusão das partículas carreadoras, ou seja, comparando-se os 2 tipos de nanopartículas CLN e NP, os primeiros geram a oclusão, menor penetração cutânea de AU e portanto maior % de AU detectado nos *swabs*. Demonstrou-se também que a maior oclusividade poderia ser obtida por meio da utilização de partículas menores que 400 nm (SHAFER-KORTING, MEHNERT & KORTING, 2007; WISSING & MULLER, 2001). Sendo assim, pode presumir-se que, a incapacidade de absorção na pele dos CLN pode ser explicada simplesmente pela sua dimensão e rigidez (BAROLI, 2010). De forma semelhante, as nanopartículas poliméricas foram incapazes de atravessar o estrato córneo, por se tratar de um polímero biodegradável e portanto foram recuperadas nos sulcos da superfície da pele (ALVAREZ-ROMÁN, 2004).

Pode-se afirmar que a penetração cutânea obteve resultado ideal, pois, por se tratar de nanopartículas contendo um componente ativo antioxidante na superfície da pele, se associado a um filtro solar, atuaria contra os radicais livres resultando na maior proteção contra a radiação ultravioleta (BABY, 2007).

5.1.1 Extração do AU

5.1.1.1 Validação do método

A fim de garantir precisão nos resultados de extração do AU para o ensaio de penetração cutânea, um rápido método de validação foi desenvolvido obtendo-se a linearidade, limites de detecção e quantificação, e precisão intra e inter-dia.

A curva analítica foi construída no intervalo de $0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para estudar a linearidade do método. Os resultados indicaram que a resposta foi linear (área pico x concentração) e a equação da reta apresentou o coeficiente de correlação de 0,999; dentro das especificações da ANVISA que recomenda valor acima de 0,99 (BRASIL, 2003) (**Figura 5**).

Figura 5. Curva analítica do ácido ursólico padrão de referência secundário, pureza de 99%. Condições cromatográficas: coluna C18 150 x 4,60 mm 5 µm; fase móvel acetonitrila:solução aquosa de H₃PO₄ 0,1% v/v (88:12); vazão 1,0mL/min; volume de injeção 50,0 µL; detecção 210 nm; temperatura ambiente (25,0 ± 2,0°C)

(a)	(b)
$y = 21307x - 5326,8$	
$R^2 = 0,99998$	

Equação 1 – Equação da curva analítica

Onde: “a” representa sua inclinação e “b” o valor da ordenada; R^2 = coeficiente de correlação linear

A **Tabela 2** apresenta os resultados obtidos para o limite de detecção e de quantificação do ácido ursólico no método de cromatografia à líquido de alta eficiência. O desvio padrão foi dividido pela inclinação da curva analítica para se obter uma estimativa do ruído associado ao método. O limite de detecção aceitável é de três vezes o valor do sinal-ruído do método e o limite de quantificação deve ser dez vezes o valor do sinal-ruído, obtendo-se resultados dentro dos limites estabelecidos (SWARTZ & KRULL, 1998; USP, 2012).

Tabela 2. Cálculo do limite de detecção e de quantificação do método de cromatografia à líquido de alta eficiência para o ácido ursólico

Ácido ursólico	Limites (µg mL ⁻¹)	
	Detecção	Quantificação
	0,57	1,73

A **Tabela 3** apresenta os resultados obtidos na determinação do ácido ursólico padrão de referência, pureza de 99% a partir de 10 determinações. Os valores apresentados são para cada dia, valor médio e desvio padrão relativo (DPR). A média intra-dia do DPR foi 0,40% na concentração de 50,0 µg mL⁻¹. O desvio padrão

relativo tanto intra-dia como inter-dia, foram menores do que 1%, indicando assim pouca variabilidade do método durante três dias consecutivos, quando executado. Estes resultados indicaram uma boa reprodutibilidade do método e a concordância entre os resultados obtidos (VALENTE, 2001; ICH, 2005; INMETRO, 2003).

Tabela 3. Precisão obtida na análise do ácido ursólico usando o método de cromatografia à líquido de alta eficiência

Intra-dia	Ácido ursólico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Dia 1</i>	49,9
DPR (%)	-0,10
<i>Dia 2</i>	50,1
DPR (%)	0,10
<i>Dia 3</i>	50,2
DPR (%)	0,40
Inter-dia	49,5
DPR (%)	-1,00

DPR – Desvio padrão relativo

6 CONCLUSÕES

- O método cromatográfico descrito para se determinar o ácido ursólico nos ensaios de penetração cutânea foi desenvolvido e validado obtendo-se os parâmetros: linearidade de 0,09 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; coeficiente de correlação de 0,999; limites de detecção e de quantificação, respectivamente, 0,57 e 1,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$; média intra-dia e inter-dia do desvio padrão relativo da precisão menor que 1,00% para a concentração de 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

- Verificou-se que o ácido ursólico permaneceu na superfície da pele. O ensaio de penetração cutânea não apresentou tendência para favorecer o transporte da substância ativa para a fase receptora.

- A maior concentração de AU na pele foi obtida das amostras de AU livre + emulsão (65%) seguidas das amostras de CLN + emulsão (33%) e das NP + emulsão (20%).

- A penetração cutânea obteve resultado ideal, pois, por se tratar de nanopartículas contendo um componente ativo antioxidante na superfície da pele, se associado a um filtro solar, atuaria contra os radicais livres resultando na maior proteção contra a radiação ultravioleta.

7 REFERÊNCIAS

* As referências estão de acordo com a norma NBR6023/2002, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

ALVAREZ-ROMAN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 1, p. 53-62, 2004.

BABY, A. R. **Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rotina em emulsões cosméticas**. São Paulo. 144p, 2007 (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

BAROLI B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 99, n. 1, p. 21-50, 2010.

BARRY, B.W. Dermatological Formulations. Percutaneous Absorption. **Drugs and the Pharmaceutical Sciences**, v. 18. 1983, New York and Basel: Marcel Dekker Inc.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 101-114, 2001.

BENSON, H.A.E. Transdermal drug delivery: Penetration enhancement techniques. **Current Drug Delivery**, v. 2, p. 23-33, 2005.

BENSON, H.A.E. Transfersomes for transdermal drug delivery. **Expert Opinlon on Drug Delivery**, v. 3, n. 6, p. 727-737, 2006.

BERARD, F.; MARTY J. P.; NICOLAS J. F. Allergen penetration through the skin. **European Journal of Dermatology**, v.13, n. 4, p. 324-330, 2003.

BISSETT, D.L. **Anatomy and biochemistry of the skin, in Transdermal Delivery of Drugs**, A. Kydonieus and B. Berner, Editors. 1987, CRC: Boca Raton, FL.

BLACK, J.G. **Interaction between anionic surfactants and skin, in Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement.**, K.A. Walters and J. Hadgraft, Editors. 1993, Marcel Dekker: New York. p. 145-173.

BRASIL, Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. [Diário oficial da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02/06/2003.

CHOI, M.J.; MAIBACH, H.I. Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 18, n. 5, p. 209-219, 2005.

CLEARY, G.W. Transdermal and transdermal-like delivery system opportunities: today and the future. **Drug Delivery Technology**, v. 3, n. 5, p. 35-40, 2003.

CONTRERAS, J.E.L. **Human Skin Drug Delivery Using Biodegradable PLGA-nanoparticles**, in Faculty Natural Sciences and Technology III Chemistry, Pharmacy, Bio- and Materials Sciences. 2007, Saarland University: Saarbrücken. p. 146.

COOPER, E. **Vehicles effects on skin penetration, in Percutaneous Absorption**, R. Bronaugh and H. Maibach, Editors. 1985, Marcel Dekker: New York. p. 525-529.

EBLING, F. J. G.; HALE P. A.; RANDALL V. A. **Hormones and hair growth, in Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin**, L.A. Goldsmith, Editor. 1991, Oxford Press: Oxford. p. 660-696.

ELIAS, P. M.; Feingold K. R. Coordinate regulation of epidermal differentiation and barrier homeostasis. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 14, p. 28-34, 2001.

FRANZ, T.; TOJO, K.; KYDONIEUS A. **A transdermal delivery, in Treatise on Controlled Drug Delivery**, A. Kydonieus, Editor. 1991, Marcel Dekker: New York p. 341.

GEUSENS B.; VAN GELE, M.; BRAAT S., *et al.* Flexible Nanosomes (SECosomes) Enable Efficient siRNA Delivery in Cultured Primary Skin Cells and in the Viable Epidermis of Ex Vivo Human Skin. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 23, p. 4077-4090, 2010.

GU S.; GAO J.; HOU X.; *et al.* Effects of penetration enhancers on Shuangwu traumatic formula: In vitro percutaneous absorption and in vivo pharmacodynamic

- evaluation of an herb medicine. **European Journal of Pharmceuthics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 3, p. 385-390, 2009.
- GODIN, B.; TOUITOU, E. Ethosomes: new prospects in transdermal delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 20, n. 1, p. 63-102, 2003.
- HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 291-299, 2004.
- HATANAKA, T., *et al.* Time-dependent percutaneous-absorption enhancing effect of ethanol. **Journal of Controlled Release**, v. 33, n. 3, p. 423-428, 1995.
- HILTON, J., *et al.*, Vehicle effects on in-vitro percutaneous-absorption through rat and human skin. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 10, p. 1396-1400, 1994.
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION- ICH.* Instrumento: **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, novembro, 2005. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em 10/10/2010.
- JADHAV, K.R., *et al.*, Applications of microemulsion based drug delivery system. **Current Drug Delivery**, v. 3, p. 267-273, 2006.
- KANGA, V.D. **Skin Care Delivery Systems: An overview, in Skin Delivery Systems: Transdermal, dermatologicals, and cosmetic actives**, J.J. Willie, Editor. 2006, Blackwell Publishing: Ames, Iowa. p. 174-185.
- KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S77-S98, 2002.
- LADEMANN, J., *et al.* Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 12, n. 5, p. 247-256, 1999.

- LADEMANN, J., *et al.* Investigation of follicular penetration of topically applied substances. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 14, p. 17-22, 2001.
- LADEMANN, J., *et al.* Hair follicles - A long-term reservoir for drug delivery. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 4, p. 232-236, 2006.
- LANGER, R. Transdermal drug delivery: past progress, current status, and future prospects. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n.5, p. 557-558, 2004.
- LAUER, A.C., *et al.*, Transfollicular drug-delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 179-186, 1995.
- LEITE-SILVA, V. R.; ALMEIDA, M. M.; FRADIN, A.; GRICE, J. E.; ROBERTS, M. S. Delivery of drugs applied topically to the skin, **Expert Review of Dermatology**, v. 7, n. 4, p. 383-397, 2012.
- LIEB, L.M., *et al.*, Description of the intrafollicular delivery of large molecular weight molecules to follicles of human scalp skin in vitro. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 9, p. 1022-1029, 1997.
- MOGHIMI, H.R.; WILLIAMS A. C.; BARRY B. W. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids .4. Effects of terpene penetration enhancers on the permeation of 5-fluorouracil and oestradiol through the matrix. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, n. 1-2), p. 49-59, 1996.
- MOGHIMI, H. R.; WILLIAMS A. C.; BARRY B. W. **Stratum corneum and barrier performance; a model lamellar structural approach, in Percutaneous Absorption**, R.L. Bronaugh and H.I. Maibach, Editors. 1999, Marcel Dekker: New York. p. 515-553.
- MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 54, p. 131–155, 2002.
- NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 9, p. 318-326, 2000.

- NEMES, Z.; STEINERT P. M. Bricks and mortar of the epidermal barrier. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 31, n. 1, p. 5-19, 1999.
- PROW, T.W.; GRICE, J.E.; LIN L.L., *et al.* Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.
- RHEIN, L.D. **Future Considerations for Advanced Delivery Systems, in Skin Delivery Systems: Transdermals, Dermatologicals, and Cosmetic Actives**, J.J. Willie, Editor. 2006, Blackwell Publishing: Ames, Iowa. p. 375-384.
- ROBERTS, M.S.; CROSS, S.E. **Skin transport, in Dermatological and Transdermal Formulations: Drugs and the pharmaceutical sciences**, K.A. Walters, Editor. 2002, Marcel Dekker Inc: New York. p. 89-195.
- SCHAEFER, H., *et al.* **Follicular penetration, in Prediction of Percutaneous Penetration: Methods, Measurements, and Modelling**, R.C. Scott, R.H. Guy, and J. Hadgraft, Editors. 1990, IBC Technical Services: London. p. 163-173.
- SCHAEFER, H.; LADEMANN, J. The role of follicular penetration - A differential view. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 14, p. 23-27, 2001.
- SCHAEFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Review**, n. 59, p. 427-443, 2007.
- SHROOT, B.; AUST D. **Current trends in dermatologicals and delivery systems, in Skin Delivery Systems: Transdermals, dermatologicals, and cosmetic actives**, J.J. Willie, Editor. 2006, Blackwell Publishing: Ames, Iowa. p. 129-136.
- SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, Ed. Bras., São Paulo, v.2, n.3, p.12-20, 1998.
- THOMAS, B.J.; FINNIN, B. C. The transdermal revolution. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 16, p. 697-703, 2004.
- TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. **Skin pharmacology and physiology**, v. 19, n. 2, p. 106-121, 2006.

TSUCHIDA, E.; ABE, K. Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes. **Advances in Polymer Science**, v. 45, p. 1-119, 1982.

UNITED States Pharmacopeia, 35. ed. Rockville: **United States Pharmacopeial Convention**, 2012.

VALENTE, S.L.M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.60, n.1, p.79-84, 2001.

WAUGH, J.; NOBLE S.; SCOTT L. J. Adapalene - A review of its use in the treatment of acne vulgaris. **Drugs**, v. 64, n. 13, p. 1465-1478, 2004.

WESTER, R.; MOBAYEN M.; MAIBACH H. **Influence of hydration on percutaneous absorption, in Percutaneous Absorption**, R. Bronaugh and H. Maibach, Editors. 1985, Marcel Dekker: New York.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 603-618, 2004.

WISSING, S. A.; MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) — A novel carrier for UV blockers. **Pharmazie**, n. 56, p. 783–786, 2001.

ANEXO