UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Segurança e eficácia antioxidante pré-clínica e clínica de etossomas contendo rutina de orientação de uso cosmético

Thalita Marcílio Cândido

Dissertação para obtenção do Título de

MESTRE

Orientador: Prof. Dr. André Rolim Baby

Coorientadora: Prof. Dra. Catarina Rosado

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Segurança e eficácia antioxidante pré-clínica e clínica de etossomas contendo rutina de orientação de uso cosmético

Thalita Marcílio Cândido

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de

MESTRE

Orientador: Prof. Dr. André Rolim Baby

Coorientadora: Prof. Dra. Catarina Rosado

São Paulo

2016

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

Cândido, Thalita Marcílio
C217s Segurança e eficácia antioxidante pré-clínica e clínica de etossomas contendo rutina de orientação de uso cosmético / Thalita Marcílio Cândido. -- São Paulo, 2016.
108p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo. Departamento Farmácia.
Orientador: Baby, André Rolim
Co-orientador: Rosado, Catarina

1. Cosmetologia 2. Antioxidantes(Atividades) I. T. II. Baby, André Rolim, orientador. III. Rosado, Catarina Co-orientador.

668.55 CDD

Thalita Marcílio Cândido

Segurança e eficácia antioxidante pré-clínica e clínica de etossomas contendo rutina de orientação de uso cosmético

Comissão Julgadora da Dissertação

para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. André Rolim Baby
Orientador / Presidente

_____
1º examinador

_____
2º examinador

_____
3º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2016.

Dedicatória

À Deus por me dar forças e aumentar sempre a minha fé..

À minha querida mãe pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu pai pela segurança e proteção.

À minha amada irmã pela amizade e ternura.

Ao meu namorado por me fazer acreditar no meu melhor.

Ao pequeno Vítor, que me ensinou o verdadeiro significado do amor.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida, iluminando o meu caminho e dando forças a cada dia.

À minha querida mãe, Maria Salete, por ser o meu maior exemplo de garra e dedicação, nunca me deixando desistir e sempre me ajudando, sem medir esforços. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos, lições, colo quentinho e palavras de apoio, ofertadas sempre com muito amor, que fazem de mim a pessoa que sou hoje.

Ao meu querido pai, Gercino, que sempre esteve presente, me proporcionando segurança e proteção para continuar batalhando pelos meus ideais. Pela importância dada aos estudos de suas filhas, desde a infância e pela sabedoria de vida dividida conosco.

À minha irmã maravilhosa, Renata, por ser a melhor irmã que eu poderia desejar. Obrigada por me tratar sempre com tanta ternura e preocupação.

Ao meu namorado, Felipe, que me instiga sempre a dar o melhor de mim, me apoiando em todos os momentos! Agradeço profundamente por todos os momentos juntos, sempre preenchidos com muitas risadas, amor e carinho. No seu colo eu tenho paz.

Ao pequeno Vítor, que enriquece minha vida com leveza e alegria. Por tornar o mais difícil dos dias em uma nuvem passageira, simplesmente por sorrir ao me ver.

Ao meu orientador André, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório, por toda a dedicação em me guiar nesta jornada e por todo o carinho e amizade em todos os momentos. Nada disso seria possível sem você. Meus mais sinceros agradecimentos.

À minha coorientadora Profa. Dra. Catarina, por todo o suporte em correções e opiniões dedicadas a este estudo.

À Professora Dra. Vladi Olga Consiglieri e Prof. Dr. Marcelo Guimarães, por me guiar tão gentilmente nos meus primeiros passos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos técnicos de laboratório Claudinéia e Edgar por terem me recebido e acolhido com tanto carinho em seu laboratório e por toda a assistência, momentos engraçados e aprendizado compartilhado.

À minha pequena grande amiga, Tatty, por ser sempre meu ombro amigo, sensato e maduro. Por puxar minha orelha nos momentos necessários, por me empurrar quando minha vontade é desistir e por pular junto comigo nos momentos mais felizes! Nossa amizade é para a vida toda, e todo esse tempo não é o suficiente para agradecer por essa amizade tão especial!

Aos meus amigos da Pós, Maíra, Dani, Camila, Karina, Larissa, André, Michelli, Thamires, Thayanne, Gabi, Mirela e Letícia, por me acompanharem fielmente na trajetória. Sem vocês, tudo teria sido menos divertido. Guardo cada um de vocês em um lugarzinho especial no coração.

Aos meus companheiros animais, Mel, Marie e Charlie, pelos afagos e momentos de brincadeiras. Obrigada por tornar a vida mais leve e colorida.

Epígrafe

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"

Cora Coralina

RESUMO

CANDIDO, T.M. **Segurança e eficácia antioxidante pré-clínica e clínica de etossomas contendo rutina de orientação de uso cosmético**. 2016. 80f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Os cuidados com a pele abrangem gama de ações: cuidados com a exposição solar, alimentação balanceada, não tabagismo e alcoolismo e aplicação de produtos cosméticos, dentre outras. Sabe-se que subtâncias antioxidantes, endógenas e exógenas, auxiliam na manutenção do aspecto saudável e jovial da pele. A rutina, flavonoide pertencente à classe dos flavonóis, apresenta intensa atividade antioxidante, sendo empregada na indústria alimentícia, na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e na prevenção aos danos causados pela radiação ultravioleta, por exemplo. Porém, a rutina possui taxa reduzida de permeação cutânea. O presente trabalho destinou-se a incorporar a rutina em etossomas, avaliando a segurança *in vitro* e *in vivo,* e a eficácia *in vitro* e *ex vivo*. As vesículas foram analisadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, taxa de encapsulação da rutina, atividade antirradicalar e potencial de irritação *in vitro*. As formulações foram avaliadas quanto ao valor de pH, características organolépticas, atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo* e permeação cutânea *ex vivo*. Os etossomas, com e sem rutina, foram obtidos por meio técnica de dispersão mecânica seguida de nova hidratação de filme, com partículas em dimensão nanométrica (369,5 e 247,0 nm, respectivamente). O potencial zeta para os etossomas sem rutina correspondeu à -39,3, enquanto que para aqueles com rutina foi -19,6. A rutina associada ao sistema etossomal foi igual a 80,1%. A rutina nas vesículas etossomais foi capaz de manter o potencial antirradicalar do flavonoide, verificado em ensaio *in vitro*. Os etossomas com rutina demonstraram-se seguros por meio dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo aplicados em ensaio posterior de permeação cutânea *ex vivo*, em voluntários. Foi observada taxa de permeação cutânea superior da rutina em etossomas em comparação com a rutina livre, assim, etossomas contendo rutina tornam-se um possível ingrediente ativo para adição em dermocosméticos destinados para uso contra o envelhecimento precoce.

Palavras-chave: etossomas, rutina, atividade antioxidante, permeação cutânea.

ABSTRACT

CANDIDO, T.M. **Preclinical and clinical safety and antioxidant efficacy of rutin-loaded ethosomes of cosmetic use guidance.** 2016. 80f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Skin care covers a range of actions: limited sun exposure, a balanced diet, non smoking and non-alcoholism, and application of cosmetics. It is known that antioxidants, both endogenous and exogenous substances, assist in maintaining a healthy and youthful appearance of the skin. Rutin, a flavonoid belonging to the class of flavonols, has intense antioxidant activity and it is used in the food industry, in the prevention or treatment of venous or lymphatic insufficiency, and to prevent the damage caused by UV radiation. However, rutin has low skin permeation rate. This study was designed to incorporate rutin in ethosomes, evaluating their safety *in vitro* and *in vivo*, and efficacy *in vitro* and *ex vivo*, in order to assess the improvement of the skin permeation of the flavonoid. The ethosomes with and without rutin were obtained by a mechanical dispersion technique followed by a new lipid film hydration. The ethosomes were analyzed for particle size, zeta potential, encapsulation rate of rutin, antiradical activity and *in vitro* irritation potential. The formulations were evaluated for pH, organoleptic characteristics, antioxidant activity *in vitro* and *ex vivo* and *ex vivo* skin permeation. The association of rutin with ethosomal vesicles was able to mantain the antiradical potential of flavonoid. The ethosomes with rutin have shown to be safe through *in vitro* and in vivo *safety* assays, being applied in subsequent *ex vivo* tests to evaluate the skin permeation of rutin in human volunteers. A higher skin permeation rate was observed for rutin in ethosomes compared to the free rutin, thus rutin loaded ethosomes have potential as a compound in dermocosmetic formulations for premature aging.

Keywords: ethosomes, rutin, antioxidant activity, skin permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Indução de interdigitação de uma bicamada lipídica pelo etanol. Adaptado de Vierl et al., 1994. 6
Figura 2: Representação estrutural do etossoma (Adaptado de ASCENSO et al., 2015) 8
Figura 3: Visualização das vesículas etossomais por microscopia eletrônica de transmissão: (A) vesículas multilamelares sem fármaco; (B) vesículas unilamelares contendo eritromicina. Escala: 100nm (GODIN & TOUITOU, 2003) 8
Figura 4: Mecanismo proposto de permeação cutânea promovida por sistemas etossomais (Adaptado de RAKESH e ANOOP, 2012) 10
Figura 5: Estrutura molecular dos flavonoides (Adaptado de Han e colaboradores, 2012) 16
Figura 6: Esquematização das reações entre compostos fenólicos e radicais livres (Adaptado de Han et al., 2012). 17
Figura 7: Estrutura molecular da rutina e sinalização de regiões importantes à atividade antioxidante (Adaptado de WILLIAMS et al., 2004) 18
Figura 8: Sítios de ligação de metais na molécula de rutina (adaptado de PIETTA, 2000)..... 19
Figura 9: Dispersão de etossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo (A) com rutina (B)..... 39
Figura 10: Representação da estrutura molecular da fosfatidilcolina (MERTINS et al., 2008) 40
Figura 11: Representação gráfica da distribuição de tamanho por intensidade dos etossomas sem rutina..... 43
Figura 12: Representação gráfica da distribuição de tamanho por intensidade dos etossomas com rutina..... 43
Figura 13: curva analítica da rutina padrão de referência primário (T=97,1%) 47
Figura 14: Cromatograma referente ao flavonoide rutina, amostra comercial (95,0%; 1,0 µg/mL)..... 52
Figura 15: Cromatograma referente à amostra de etossomas sem rutina 53

Figura 16: Cromatograma referente a solução obtida a partir da extração da fita com metanol 53
Figura 17: Atividade antioxidante dos etossomas 54
Figura 18: Atividade antioxidante das formulações A e B 57
Figura 19: Atividade antioxidante da rutina em voluntários 60
Figura 20: Concentração de rutina quantificada por tape stripping nos voluntários 62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação do potencial de irritação (KALWEIT et al., 1990)..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição qualitativa e quantitativa das formulações antioxidantes 32
Tabela 2: Escala de Draize para avaliação do grau de irritação cutânea 35
Tabela 3: Determinação do diâmetro e potencial zeta dos etossomas de fofatidilcolina de gema de ovo 42
Tabela 4: Determinação dos valores de pH das suspensões de etossomas... 45
Tabela 5: Dados de área sob a curva para construção da curva analítica da rutina padrão de referência primário (T=97,1%)..... 46
Tabela 6: Análise de regressão da curva analítica da rutina padrão de referência primário (T=97,1%)..... 46
Tabela 7: Exatidão interdia a partir do ensaio de recuperação do padrão de referência primário (T=97,1%) na presença da preparação de etossomas sem adição de rutina..... 50
Tabela 8: Resultados do ensaio de segurança in vitro 55
Tabela 9: Características organolépticas e físico-químicas das formulações.. 56
Tabela 10: Ensaios de Segurança in vivo das formulações A e B..... 58
Tabela 11: Idade e fototipo dos voluntários selecionados para os ensaios ex vivo 59
Tabela 12: Atividade antioxidante da epiderme, de acordo com ensaio ex vivo, em porcentagem de inibição do DPPH 59
Tabela 13: Concentração de rutina quantificada por tape stripping nos voluntários, em ug/mL. 62

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEP	-	Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
EB	-	Etossomas sem rutina
ER	-	Etossomas contendo rutina
HPLC	-	*High-performance liquid chromatography*
INCI	-	*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
mV	-	Mili volts
nm		Nanômetros
pH	-	Potencial hidrogeniônico
RL	-	Rutina livre
SBD	-	Sociedade Brasileira de Dermatologia
UV	-	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 4
2.1. Vesículas lipossomais 4
2.1.1. Transfersomas® 4
2.1.2. Niossomas 5
2.1.3. Etossomas 5
2.1.4. Vesículas etossomais em aplicações tópicas 10
2.2. Pele 11
2.3. Radicais livres e estresse oxidativo 12
2.3.1. *Tape Stripping* 14
2.4. Flavonoides 15
2.4.1.Rutina 17
2. OBJETIVOS 22
2.1. Objetivo geral 22
2.2. Objetivos específicos 22
3. MATERIAL E MÉTODOS 23
3.1. Material 23
3.2. Métodos 25
3.2.1. Obtenção dos etossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo contendo rutina 25
3.2.2. Caracterização física dos etossomas 25
3.2.2.1. Distribuição do tamanho de partícula e do potencial zeta 25
3.2.3. Caracterização físico-química dos etossomas 26
3.2.3.1. Determinação do valor de pH 26
3.2.4. Avaliação da eficiência de associação da rutina nos etossomas 29

3.2.5. Caracterização funcional dos etossomas 30

3.2.5.1. Atividade antioxidante 30

3.2.6. Avaliação do potencial de irritação por HET-CAM -*Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane* 30

3.2.7. Desenvolvimento das formulações dermocosméticas antioxidantes .. 31

3.2.8. Caracterização físico-química e organolépticas das formulações dermocosméticas..... 33

3.2.9. Atividade antioxidante das formulações..... 33

3.2.10. Ensaios *ex vivo* e *in vivo*..... 34

3.2.10.1. Aspectos legais e éticos..... 34

3.2.10.2. Voluntários 34

3.2.10.3 Ensaios *in vivo* 34

3.2.10.4. Ensaios *ex vivo* 36

3.11. Análise estatística dos resultados..... 38

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 39

4.1. Obtenção dos etossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo contendo ou não rutina..... 39

4.2. Caracterização física dos etossomas 41

4.2.2. Distribuição do tamanho de partícula e do potencial zeta 41

4.3. Caracterização físico-química dos etossomas..... 44

4.3.1. Determinação do valor pH..... 44

4.4. Avaliação da eficiência de associação da rutina aos etossomas..... 45

4.4.1. Validação da metodologia analítica para quantificação de rutina em etossomas..... 45

4.4.2. Determinação da eficiência de associação da rutina aos etossomas 53

4.5.1. Atividade antioxidante 54

4.6. Avaliação do potencial de irritação por método *in vitro* HET-CAM -*Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane* 55

4.7. Caracterização físico-química e organolépticas das formulações dermocosméticas 56

4.8. Atividade antioxidante das formulações 57

4.9. Ensaios *in vivo* de segurança 58

4.10. Ensaios *ex vivo* de eficácia 58

4.10.1. Atividade antirradicalar *ex vivo* pelo método *tape stripping* 59

4.10.2. Estudo *ex vivo* da permeação da rutina livre e em etossomas pelo método de *tape stripping* 61

7. CONCLUSÕES 66

8. REFERÊNCIAS 68

ANEXOS 82

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo natural que acomete o organismo como um todo, sendo mais perceptível visualmente na pele. Este processo pode ser acelerado por diversos fatores, como o tabagismo, alcoolismo, exposição à radiação ultravioleta (UV) e poluição. Tais fatores desencadeiam a formação de radicais livres no tecido cutâneo, os quais são os principais responsáveis pelo envelhecimento acelerado e/ou precoce da tez, resultando no aparecimento de rugas, aspereza, manchas e flacidez.

O aumento da expectativa de vida de homens e mulheres orienta a busca por uma melhor qualidade de vida, por meio da prática de atividade física, alimentação balanceada e cuidados preventivos e estéticos, como uso de dermocosméticos e fotoprotetores.

Os cosméticos anti-idade podem associar em sua composição moléculas antioxidantes, visando retardar os efeitos cutâneos dos radicais livres. Por sua vez, os fotoprotetores devem incluir filtros químicos e/ou físicos em sua constituição. A associação destas duas classes de moléculas (antioxidantes e fotoprotetoras) torna o produto cosmético mais atrativo e eficaz na manutenção da saúde da pele.

É importante destacar que existem diversos componentes encontrados em numerosas espécies vegetais, como os flavonoides, que apresentam os potenciais tanto antioxidante quanto fotoprotetor.

A rutina (3-*o*-rutinosídeo-quercetina) é um flavonoide pertencente à classe dos flavonóis e, como tal, apresenta em sua estrutura molecular regiões passíveis de doação de elétrons, neutralizando radicais livres; e regiões de ressonância, absorvendo a radiação na faixa do UV.

A permeação cutânea de princípios ativos presentes nas formulações cosméticas propicia melhor desempenho quanto à atividade antioxidante. É sabido que a rutina, apresenta baixa taxa de permeação cutânea, sendo assim, indispensável veiculá-la de forma aprimorada, visando o melhor aproveitamento de sua capacidade antioxidante nas camadas mais profundas da epiderme. A alternativa proposta para a resolução deste impasse foi a associação do flavonoide rutina a vesículas etossomais.

Os etossomas são vesículas lipídicas reconhecidas por sua segurança, biodegradabilidade, maleabilidade e promoção de permeação melhorada, quando comparada aos lipossomas clássicos.

A concepção da presente pesquisa fundamentou-se no desenvolvimento e a avaliação funcional e de permeação de etossomas contendo rutina. Com base nestes resultados, foi possível averiguar *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, por meio de métodos recomendados, a segurança e eficácia das formulações quanto aos parâmetros de fotoproteção e atividade antioxidante.

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Vesículas lipossomais

Os lipossomas clássicos foram os pioneiros quanto ao desenvolvimento de vesículas lipossomais em escala nanométrica. Apresentam-se como vesículas compostas por moléculas lipídicas (como os fosfolipídeos), produzidas usualmente, por meio do método da hidratação de filme lipídico (BARRY, 2001; GODIN & TOUITOU, 2003). Basicamente, lipossomas são resultantes da organização, em camadas, de moléculas de fosfolipídios em um ambiente aquoso. Os fosfolipídios são moléculas anfifílicas que apresentam um grupo apolar (didaticamente descrito como cauda) e um grupo polar (didaticamente descrito como cabeça). As moléculas anfifílicas dos fosfolipídios organizam-se em vesículas fechadas protegendo os grupos hidrofóbicos, enquanto mantém contato com a fase aquosa por meio dos grupos hidrofílicos. As vesículas lipossomais podem encapsular moléculas solúveis no meio aquoso no interior do compartimento ou armazenar moléculas hidrofóbicas na membrana de dupla camada (VENKATESWARLU *et al*., 2011)

Mezei e colaboradores, 1980, foram vanguardistas no uso de lipossomas para a aplicação tópica de fármacos. Diversos estudos subsequentes demostraram que os lipossomas propiciam o depósito de várias moléculas no estrato superior da pele. Assim, lipossomas clássicos, também denominados como rígidos, ficam retidos no estrato córneo resultando na formação de um reservatório de fármaco nas camadas superiores da pele, não propiciando absorção percutânea ou a permeação. Devido à este impasse, alterações foram propostas e novos sistemas foram desenvolvidos, como por exemplo, os etossomas, transfersomas® e niossomas (BARRY, 2001; CEVC, 2004; GODIN & TOUITOU, 2003; RAKESH & ANOOP, 2012).

2.1.1. Transfersomas®

Os transfersomas (*Transfersomes*®) também foram desenvolvidos com o objetivo de melhorar a permeação dos lipossomas. Correspondem à uma classe de vesículas lipídicas elásticas, primeiramente desenvolvidas e patenteadas por Cevc e Blume, em 1992.

Os transfersomas são vesículas constituídas, usualmente, por fosfolipídeo e tensoativo. O tensoativo atua como ‘ativador de borda’ (*edge activator*), que instabiliza as bicamadas lipídicas, propiciando o aumento da deformabilidade da vesícula, assim como o etanol nos etossomas (BARRY, 2001; CEVC, 2004).

Segundo a literatura, diferentes tensoativos podem ser empregados, como por exemplo os tensoativos da classe Span® (ésteres de sorbitano) e os da classe Tween® (ésteres do polioxietileno sorbitano ou polissorbatos). Conforme o tensoativo escolhido, haverá alterações nas propriedades físico-químicas das vesículas, tais como: tamanho de partícula, potencial zeta e eficiência de encapsulamento (ELSAYED *et al.,* 2007).

2.1.2. Niossomas

Os niossomas, assim como os lipossomas, etossomas e transfersomas®, podem apresentar-se como vesículas uni ou multilamelares. São obtidos por meio da hidratação de agentes tensoativos e quantidades apropriadas de colesterol. São vesículas adequadas como transportadores de fármacos, tanto hidrofílicos e lipofílicos, sendo eficazes na entrega de princípios ativos no sítio de ação desejado (BARRY, 2001; ELSAYED *et al*., 2007; MARIANECCI *et al*. 2014).

Ademais, as vesículas niossomais são geralmente não tóxicas, requerem menor custo de produção (devido ao emprego de tensoativos não iônicos) e são estáveis por um longo período de tempo em diferentes condições. A maior estabilidade dos niossomas os torna mais atrativos em comparação aos lipossomas clássicos, que apresentam baixa estabilidade físico-química. (MARIANECCI *et al.,* 2014).

2.1.3. Etossomas

Os etossomas são principalmente compostos por fosfolipídios, etanol e água. Pensava-se que altas concentrações de etanol em sistemas vesiculares lipídicos fossem destrutivas devido ao efeito de interdigitação, assim, se etanol fosse empregado em alguma etapa da obtenção de lipossomas, este era removido ao final. A formação de fases interdigitadas ocorre quando as cadeias

acilo de um folheto da bicamada lipídica interpenetram no outro folheto, resultando no desaparecimento do plano médio da bicamada, conforme ilustrado na **Figura 1**.

Figura 1: Indução de interdigitação de uma bicamada lipídica pelo etanol. Adaptado de Vierl *et al*., 1994.

Os estudos de Godin e Touitou, 2003, demonstraram que a coexistência de fosfolipídios e etanol em altas concentrações foi viável e propiciou a formação de um sistema carreador aprimorado devido ao efeito fluidificador do etanol nas vesículas lipídicas.

São quatro os métodos descritos para a preparação de etossomas. O método à quente e o à frio são os mais convencionais visto a sua simplicidade e conveniência, já que não envolvem o emprego de instrumentos sofisticados ou processos complexos. A seguir, serão descritos os métodos envolvidos em cada:

- ✓ Método à quente: o fosfolipídio é disperso em água por aquecimento e agitação em banho maria a 40ºC até a obtenção de uma solução coloidal. Em um recipiente separado, etanol e propilenoglicol são misturados e aquecidos a 40ºC. Uma vez que ambas as misturas atinjam a mesma temperatura, a fase orgânica é adicionada à fase aquosa. A droga é dissolvida em água ou etanol, dependendo de suas propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas. Por fim, a suspensão pode ser submetida à sonicação ou método de extrusão para diminuição do tamanho das vesículas (TOUITOU, 1998).
- ✓ Método à frio: o fosfolipídio e a molécula a ser incorporada são dissolvidos por agitação vigorosa em etanol em um recipiente coberto à temperatura ambiente. Propilenoglicol, ou outro poliol, é adicionado durante a agitação. Esta mistura é aquecida a 30ºC em banho maria. Paralelamente, água é aquecida também a 30ºC e adicionada a mistura,

seguida de agitação por cinco minutos no recipiente fechado. O processo de sonicação ou método de extrusão também podem ser utilizados. Por fim, deve-se armazenar a suspensão etossomal obtida sob refrigeração (DONGARE *et a*l., 2012)

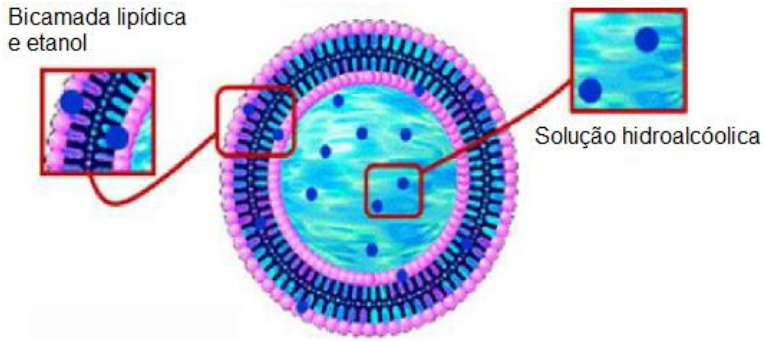
- ✓ Método clássico de dispersão mecânica: a fosfatidilcolina é dissolvida em solvente orgânico (como por exemplo, clorofórmio) em frasco de fundo redondo, juntamente com a substância ativa de interesse. O solvente é removido com evaporador rotativo a vácuo acima da temperatura de transição de lipídeo até a formação de uma película lipídica fina na parede do frasco. A hidratação da película formada pode ser realizada com diferentes concentrações de solução etanólica, seguida de agitação mecânica e sonicação (DONGARE *et al*., 2012; PARK *et al*., 2014). Este foi o método de escolha para o presente trabalho.
- ✓ Método clássico: o fosfolipídio e a substância são dissolvidas em etanol e aquecidas a 30ºC em banho de maria. Água bidestilada é adicionada, sob agitação constante de 700 rpm, em recipiente fechado. A suspensão obtida é homogeneizada por passagem através de uma membrana de policarbonato utilizando extrusor por três ciclos (DONGARE *et al*., 2012).

Todos os métodos descritos são eficientes para o propósito, desta maneira, cabe ao pesquisador escolher o que for mais conveniente de acordo com os recursos disponíveis para tal.

O efeito de fluidificação de etanol nas bicamadas de fosfolipídios contribui para a criação de vesículas com estrutura maleável. Estudos de ressonância magnética nuclear indicaram que em formulações onde o etanol possui concentrações de até 45%, a fosfatidilcolina aparece organizada em bicamadas na forma de vesículas fechadas (GODIN & TOUITOU, 2003; TOUITOU *et al*., 1999).

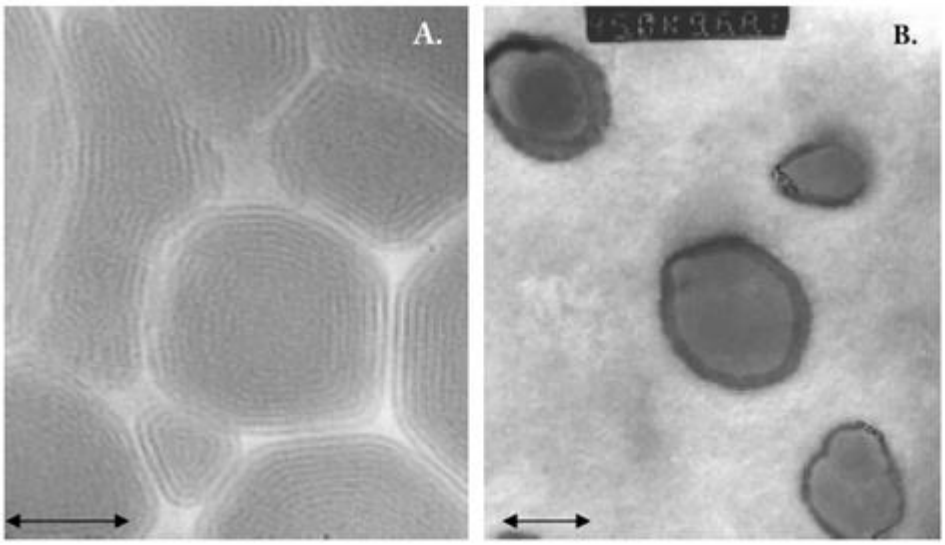
Assim, os etossomas apresentam-se como vesículas maleáveis que possibilitam o alcance de moléculas (drogas, fármacos ou agentes ativos) a camadas mais profundas da pele ou a circulação sistêmica (SHEN *et al.* 2014; TOUITOU *et al*. 1999; RAKESH & ANOOP 2012; PARK *et al*. 2014). A **Figura 2** representa a estrutura de um etossoma.

Figura 2: Representação estrutural do etossoma (Adaptado de ASCENSO *et al*., 2015)



Devido à sua estrutura, são capazes de encapsular e carrear moléculas altamente lipofílicas, como canabinóides, assim como moléculas catiônicas, como propranolol. A aplicação da microscopia de transmissão eletrônica mostrou que os etossomas podem ser uni ou multilamelares, conforme pode ser observado na **Figura 3** (ELSAYED *et al.,* 2007; GODIN & TOUITOU, 2003; TOUITOU *et al*., 1999).

Figura 3: Visualização das vesículas etossomais por microscopia eletrônica de transmissão: (A) vesículas multilamelares sem fármaco; (B) vesículas unilamelares contendo eritromicina. Escala: 100nm (GODIN & TOUITOU, 2003)

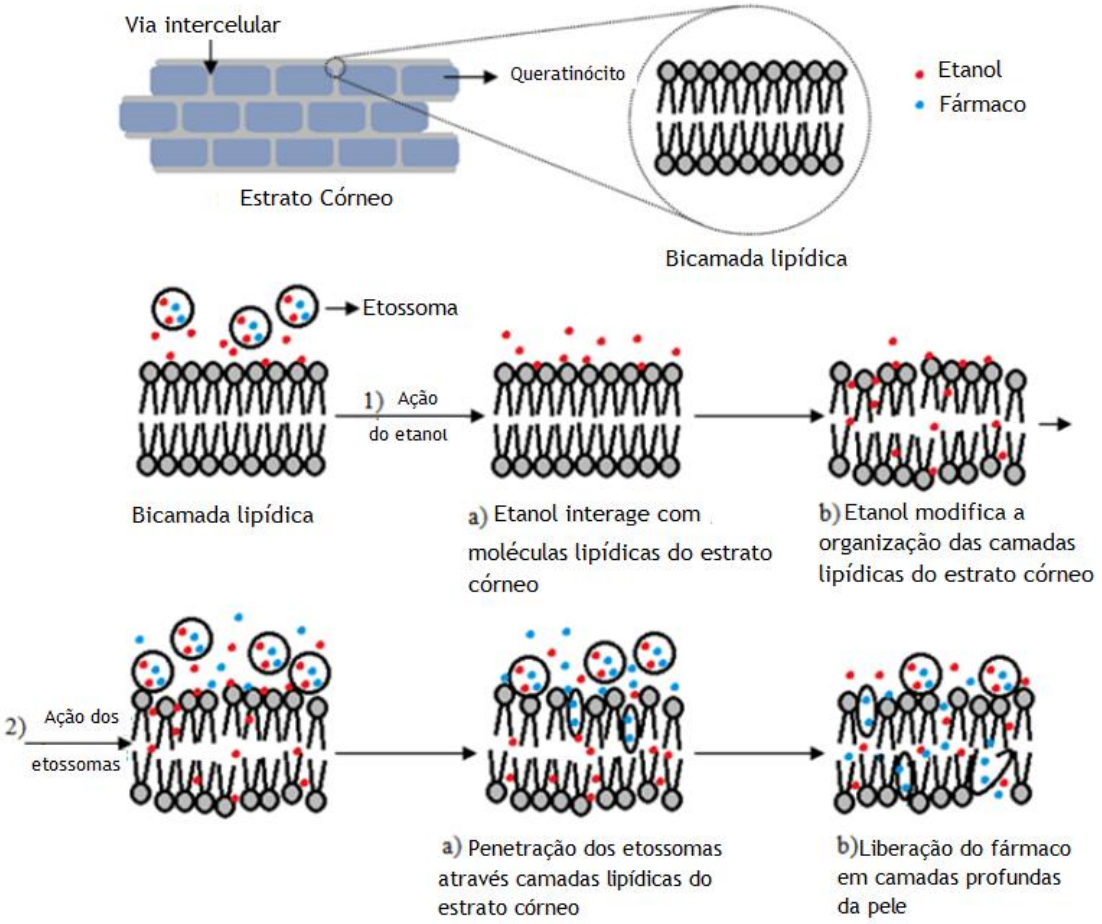


A distribuição de tamanho dos etossomas pode variar de dezenas de nanômetros à micrometros, sendo que esta variação se relaciona à composição do sistema etossomal. Estudos demonstram que o aumento da concentração de etanol em sistemas etossomais contendo 2% (p/p) de fosfatidilcolina, ocasionam uma gradual redução de tamanho de 193 para 103 nm, por exemplo. Tal

constatação pode ser atribuída ao efeito de interdigitação do etanol que ocasiona diminuição da espessura da bicamada lipídica, devido à inclinação dos fosfolipídios da camada (Figura 1). Entretanto, um acréscimo na concentração de fosfatidilcolina de 0,5 a 4% em formulações contendo 30% de etanol resultam no dobro do tamanho de vesícula (de 118 a 249 nm), que pode ser atribuído à formação de vesículas multilamelares. As moléculas carreadas pelos etossomas também exercem influência neste parâmetro, assim como o método de preparação e a etapa de sonicação (GODIN & TOUITOU, 2003; VIERL, 1994).

O mecanismo proposto para a melhora da permeação cutânea consiste na ação dúbia do etanol na fluidificação das bicamadas lipídicas dos etossomas e dos lipídeos presentes no estrato córneo, como pode-se observar na **Figura 4**. Dois efeitos podem ser observados: o etanol aumenta a fluidez dos lipídeos de membrana e diminui a densidade das suas múltiplas camadas de lipídeo celular; e os etossomas aumentam a fluidez dos lipídios da membrana celular causada pelo etanol de sua composição, resultando no aumento da permeabilidade, de modo que os etossomas consigam permear em camadas profundas da pele, onde é capaz de fundir-se com lipídeos da pele, liberando as moléculas de interesse (RAKESH & ANOOP, 2012; VERMA & FAHR, 2004).

Figura 4: Mecanismo proposto de permeação cutânea promovida por sistemas etossomais (Adaptado de RAKESH e ANOOP, 2012)



2.1.4. Vesículas etossomais em aplicações tópicas

A pele pode ser utilizada como via de entrada, seja o interesse na entrega dérmica ou transdérmica de moléculas ou fármacos para tratamento sistêmico ou localizado. Devido às propriedades de barreira da camada exterior da pele, em muitos casos, é necessária a incorporação de promotores de permeação às formulações, ou a utilização de sistemas nanométricos lipofílicos (ELSAYED *et al.,* 2007; NAIK *et al.,* 2000; TOUITOU *et al.,* 2000*)*.

Conforme elucidado nos tópicos anteriores, sistemas lipossomais clássicos são eficazes na formação de reservatório de fármaco nas camadas superiores da pele, para o tratamento local da pele. Já os etossomas, apresentam-se eficientes em estimular a administração transdérmica e dérmica de moléculas hidrofílicas e lipofílicas (TOUITOU *et al*., 2000).

Godin e colaboradores, 1999, estudaram a entrega de minoxidil (fármaco utilizado em casos de queda de cabelo, aplicado topicamente no couro

cabeludo). Para tal, o fármaco foi incorporado à etossomas e lipossomas e as formulações obtidas foram aplicadas no dorso de ratos sem pelos. Foi constatado que os etossomas apresentaram maior capacidade de entrega, para as unidades pilossebáceas, em comparação com os lipossomas clássicos (TOUITOU *et al.* 2000).

Esposito e equipe, 2004, incorporaram ácido azelaico (fármaco utilizado no tratamento da acne vulgar e rosácea papulopustulosa) à etossomas e à lipossomas. Em ensaio de permeação em células de Franz, utilizando membrana sintética como modelo de membrana, foi constatado que a taxa de liberação foi mais rápida nos sistemas etossomais e que os etossomas produzidos com maior concentração de etanol liberaram o ácido azelaico ainda mais rapidamente (ESPOSITO *et al*., 2004; ELSAYED *et al*., 2007).

Além disso, estudos clínicos realizados por Horwits e colaboradores, 1999, com o aciclovir, mostraram que as formulações com etossomas foram superiores para a terapêutica tópica no tratamento de herpes labial recorrente, em comparação com medicamento disponível no mercado. Os parâmetros avaliados incluíram o tempo para formação de crosta, tempo para perda da crosta e proporção de lesões (ELSAYED *et al*., 2007).

Os sistemas etossomais também são eficientes na entrega transdérmica de fármacos. Touitou e colaboradores, 1999, estudando a permeação *in vitro* e absorção *in vivo* de testosterona em pele de coelho, constataram que emplastros contendo o hormônio em etossomas foram mais eficazes no fornecimento de testosterona, aumentando em até trinta vezes a sua permeação cutânea (ensaio *in vitro*). A concentração sérica do hormônio encontrada foi maior em cobaias que receberam os emplastros contendo etossomas contendo testosterona.

2.2. Pele

A pele diversifica-se quanto à região do corpo que reveste, quanto ao tipo de anexo cutâneo, espessura e revestimento. Áreas onde há maior atrito, como a região palmo-plantar, por exemplo, exibe camada queratínica mais espessa e ausência de pelos (pele glabra), enquanto que, nas demais superfícies do corpo há a predominância da pele pilificada (com pelos e pregas características). Organiza-se em dois tipos de tecidos: epitelial (epiderme) e conjuntivo (derme e

hipoderme). A epiderme apresenta orifícios provenientes dos anexos cutâneos em sua superfície, é permeosseletiva, avascular, e, portanto, nutrida por capilaridade oriunda da microcirculação da derme. É constituída, quase em sua totalidade, por queratinócitos (células epiteliais estratificadas), os quais diferenciam-se conforme se afastam da camada basal até à superfície da pele, passando a denominar-se corneócitos no estrato córneo. O processo de diferenciação, pelo qual os queratinócitos são submetidos, inclui a perda de organelas e núcleo e queratinização. Os queratinócitos e os corneócitos são fortemente interligados uns aos outros por meio de junções desmossômicas, propiciando resistência ao sistema epitelial. Ao contrário da epiderme, a derme é extremamente vascularizada (vasos linfáticos e sanguíneos). Integra-se por fibras interconectadas de colágeno, elastina e substância intersticial (glicoproteínas e glicosaminoglicanas), além de diversos tipos celulares, como os fibroblastos, abrigando também os anexos cutâneos (glândulas e pelos) (RAWLINGS & HARDING, 2004; NOTMAN & ANWAR, 2013).

Devido à sua constituição biológica, brevemente elucidada anteriormente, a barreira natural da pele dificulta a absorção e/ou permeação de substâncias ou princípios ativos por via tópica, logo há o interesse em desenvolver novas técnicas que possibilitem tais eventos e que promovam o aumento da eficácia de produtos para a aplicação na pele (NAIK et al., 2000; BARRY, 2001; ELSAYED et al., 2006).

2.3. Radicais livres e estresse oxidativo

Os radicais livres são átomos, íons ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados centrados em átomos de oxigênio, nitrogênio ou enxofre: ERO (espécies reativas de oxigênio), ERN (espécies reativas de nitrogênio) e ERS (espécies reativas de enxofre) (BARREIROS *et al*., 2006; HAN *et al.,* 2012; LIANG *et al*., 2012).

São gerados naturalmente nos processos de produção de energia, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e fagocitose, dentre outros, ou em disfunções biológicas, provenientes da alimentação ou por exposição a radiações. Em processos metabólicos, reações de oxidação

envolvendo elétrons transferem energia, otimizando a vida aeróbica, mas, concomitantemente, produz radicais livres (HAN *et al*., 2012).

As espécies reativas de oxigênio podem ser divididas em radicalares e não-radicalares. A espécies radicalares compreendem: superóxido ($O2^{\bullet -}$), peroxila ($ROO^{\bullet}$), alcoxila ($RO^{\bullet}$) e hidroxila ($OH^{\bullet}$). Os não-radicalares são: oxigênio, ácido hipocloroso e peróxido de hidrogênio. O óxido nítrico (NO•), o óxido nitroso (N_2O_3), o ácido nitroso (HNO_2), os peroxinitritos ($ONOO^-$), os nitritos (NO_2^-) e os nitratos (NO_3^-) são representantes das espécies reativas de nitrogênio. O radical superóxido, por exemplo, é gerado, por reações enzimáticas envolvendo a enzima NADPH-oxidase e xantina-oxidase, além de ser um produto secundário da reação da cadeia respiratória nas mitocôndrias; já o óxido nítrico é gerado pela enzima óxido nítrico sintase (HAN *et al*., 2012; LIANG *et al*., 2012; MASAKI, 2010).

Dentre as espécies reativas citadas, o radical hidroxila é o mais deletério ao organismo visto que possui meia-vida curta, dificultando seu sequestro *in vivo*. Pode ser formado no organismo, principalmente, por dois mecanismos: reação de peróxido de hidrogênio com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante. A incidência de radiação ultravioleta, assim como radiação gama e raios X podem propiciar a formação do radical hidroxila na epiderme (**Equação 1**). O estresse oxidativo neste órgão pode ocasionar o desenvolvimento de mutações genéticas e câncer. Ainda na pele, os radicais livres podem atuar nos melanócitos de forma paradoxal: propiciando a despigmentação, mas, também, aumentando a pigmentação (melanogênese) (SANDER *et al.,* 2004; MASAKI, 2010; HAN *et al*., 2012).

$$H_2O \xrightarrow{\text{Luz UV}} HO\bullet + H\bullet$$

Equação 1: homólise da água por exposição a luz UV

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a formação dos radicais livres e a presença de moléculas antioxidantes no organismo (HAN *et al*., 2012). Os efeitos deletérios dos radicais livres podem ser exemplificados pela peroxidação de lipídios de membrana, danos às proteínas membranares e

tecidos, DNA, enzimas e carboidratos. Tais efeitos relacionam-se ao envelhecimento, doenças degenerativas do sistema cardiovascular, disfunção cognitiva, cataratas e câncer (BARREIROS *et al.,* 2006; SANDER *et al*., 2004; SILVA & FERRARI 2011).

A aplicação tópica de produtos com ação antioxidante e/ou a ingestão de antioxidantes por meio da alimentação ou suplementação são ferramentas interessantes na tentativa de retardar alguns dos efeitos maléficos dos radicais livres (KOHEN, 1999; MASAKI, 2010).

Um bom antioxidante deve realizar uma ou mais das seguintes ações: (i) depleção de oxigênio; (ii) extinção de oxigênio singleto; (iii) quelação de íons metálicos que de outra forma poderiam catalisar reações de formação de espécies reativas de oxigênio; (iv) eliminação de espécies reativas de oxigênio ou rescisão de reação em cadeia de propagação de oxidação; (v) reparação de danos oxidativos (HAN *et al.,* 2012).

Como exemplos de antioxidantes são citados as vitaminas A, C e E, os carotenoides e os flavonoides, encontrados especialmente em frutas e hortaliças (MANELA-AZULAY & BAGATIN, 2009; PIETTA, 2000).

2.3.1. *Tape Stripping*

Diversos métodos são descritos para avaliar a eficácia de formulações cosméticas, tanto em relação ao seu potencial antioxidante quanto à sua capacidade de promover a permeação de substâncias ativas de interesse. Dentre os métodos existentes, destaca-se o *tape stripping.* Este consiste na aplicação tópica das formulações em voluntários seguida de sucessiva remoção das camadas de células do estrato córneo, a partir da mesma área de pele utilizando fitas adesivas (ALONSO *et al*., 2009; LADEMANN *et al.,* 2009; MUDUMBA *et al.,* 1998). O método de aplicação das formulações, a pressão exercida pelo avaliador no momento em aplicar as fitas na pele do voluntário e a rapidez com que se remove as fitas são algumas das variáveis extrínsecas que podem influenciar no resultado da análise. As características individuais da pele dos voluntários, como a disposição dos corneócitos (maior ou menor coesão entre eles) e o grau de hidratação cutâneo apresentam-se como variáveis intrínsecas (LADEMANN *et al.*, 2009).

As fitas contendo a quantidade de corneócitos e aquela correspondente de formulação que permeou as diferentes porções do estrato córneo removido podem ser submetidas à processos analíticos de quantificação, e análises de atividade antioxidante e de peroxidação lipídica (ensaios com DPPH•, TBARS, por exemplo) para averiguar eficácia e qualidade das formulações cosméticas testadas. Acredita-se que a remoção de 20 fitas adesivas é o suficiente para remover até 90% do estrato córneo, sendo que as primeiras fitas removem quase a totalidade desta camada (ALONSO *et al*., 2009; LADEMANN *et al.,* 2009).

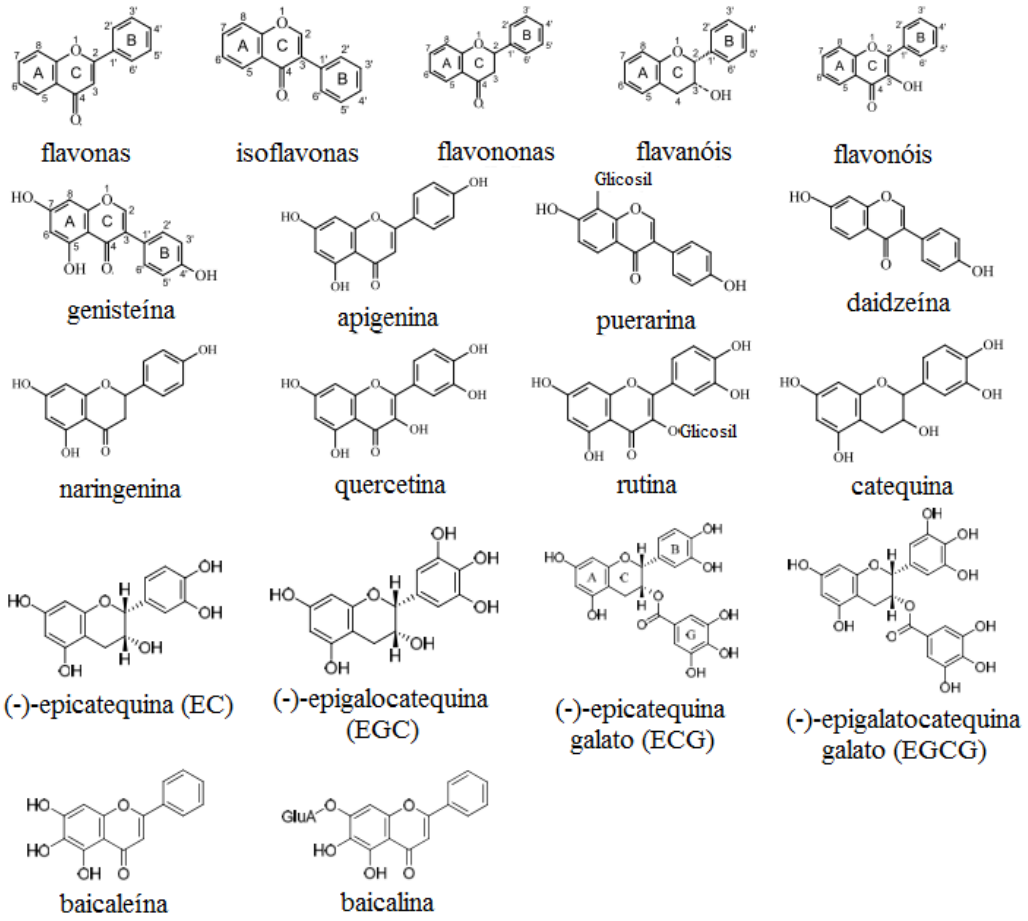
2.4. Flavonoides

Os flavonoides são encontrados em uma variedade de espécies vegetais e apresentam uma rica diversidade estrutural, sendo que mais de oito mil flavonoides já foram caracterizados. Flavonoides e seus glicosídeos atuam nos vegetais como antioxidantes hidrofílicos, antimicrobianos, fotorreceptores, atratores visuais, e como filtros da radiação UV, além de atuarem como substrato na proteção dos tecidos após agressão física (PIETTA, 2000).

Os flavonoides são compostos polifenólicos e constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono. Apresentam esqueleto de difenilpropano ($C_6C_3C_6$) com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano (ALVES *et al*, 2007; HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

Há variedade enorme de flavonoides descobertos e estudados em extratos vegetais. Essa variedade se deve ao fato de que a estrutura básica dos flavonoides pode sofrer modificações químicas, como: hidroxilação, metilação e glicosilação, entre outras. Os flavonoides são subdivididos em classes de acordo com a estrutura química. Os flavonoides possuem atividade antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antineoplásica, antiulcerosa, anti-inflamatória, inibitória enzimática e antialergênica, entre outras (ALVES *et al*, 2007; BEHLING *et al*., 2004; DORNAS *et al*., 2008; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; LOPES *et al.,* 2000). A **Figura 5** ilustra algumas estruturas representativas dos flavonoides.

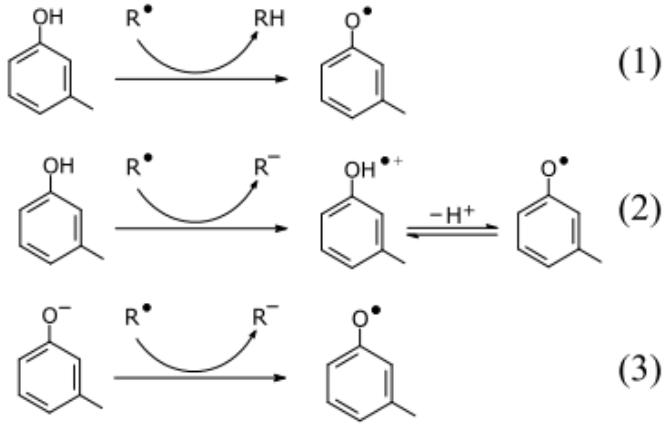
Figura 5: Estrutura molecular dos flavonoides (Adaptado de Han e colaboradores, 2012)



Devido ao seu baixo potencial de redução ($0.2 < E^0 < 0.8$), flavonoides são termodinamicamente capazes de reduzir grande parte dos radicais livres de relevância para os sistemas biológicos, tais como superóxido, peroxila, alcoxila e radicais hidroxila (HAN *et al*., 2012).

Ensaios de avaliação do potencial antioxidante dos flavonoides, classificam-nos em sua maioria como eliminadores de radicais livres pela transferência de elétrons ou pela transferência do hidrogênio atômico. De forma geral, há duas possibilidades de que antioxidantes fenólicos reajam com radicais livres (**Figura 6**): (i) transferência do átomo de hidrogênio em uma etapa (Equação 1), ou (ii) transferência de elétron seguida de transferência de próton (Equação 2). Em meio alcalino, os fenóis encontram-se desprotonados e apenas o mecanismo de transferência de elétrons é possível (Equação 3).

Figura 6: Esquematização das reações entre compostos fenólicos e radicais livres (Adaptado de Han et al., 2012).



Devido à absorção na região do UV de metabólitos secundários de plantas em extrato naturais, como os taninos, antraquinonas, polifenóis, alcaloides e flavonoides, o estudo da atuação destes metabólitos como agentes fotoprotetores vem se intensificando. O espectro de absorção UV dos flavonoides gera dois picos máximos de absorção, geralmente, sendo um deles entre 240 e 280 nm e o outro entre 300 e 550 nm, evidenciando a possibilidade do emprego de flavonoides como moléculas fotoprotetoras em potencial (BOBIN *et al.,* 1995; SOUZA *et al.,* 2005; VIOLANTE, 2008).

2.4.1.Rutina

A rutina (3-o-rutinosídeo-quercetina) é um flavonoide pertencente à classe dos flavonóis. Devido à sua intensa atividade antioxidante, a rutina é empregada na indústria alimentícia, na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar, além de ser empregada na prevenção aos danos causados pela radiação UV (GUARDIA *et al.,* 2001; VELASCO *et al.,* 2008; BABY *et al.,* 2008).

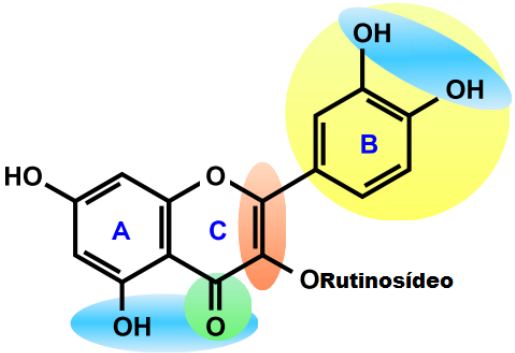
A rutina (de massa molar de 610,5175 g/mol) apresenta quatro constantes de dissociação, correspondentes à desprotonação das hidroxilas nas posições: 4’-OH; 7-OH; 3’-OH, 5-OH, em ordem de ocorrência de perda de H^+, conforme variação do valor de pH do meio (PIETTA, 2000). Os valores de pKa, que

descrevem a capacidade relativa para cada centro ácido de ionização da molécula, variam de acordo com a literatura. Segundo Mielczarek, 2005, as constantes de dissociação da rutina apresentam os seguintes valores: $pK_1 = 7,35 \pm 0,02$; $pK_2 = 8,8 \pm 0,10$; $pK_3 = 11,04 \pm 0,10$; $pK_4 = 11,9 \pm 0,10$ (MIELCZAREK, 2005; HOWARD & WENDER, 1952).

Quanto à sua solubilidade, a rutina apresenta baixa solubilidade em água (0,125 g/L) e em meios lipofílicos, sendo seu log P aproximadamente 0,64. Tal evidência dificulta a permeação do flavonoide através de membranas biológicas. (BABY, 2007)

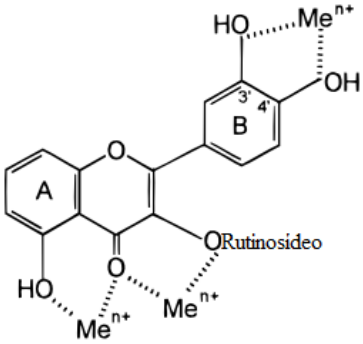
O potencial antioxidante da rutina é atribuído a três regiões moleculares, como pode ser observado na **Figura 7**: os dois grupamentos hidroxilas em configuração *orto* (sinalizados em azul) no anel B, que conferem estabilidade ao radical formado; a dupla ligação C2-C3 (sinalizada em vermelho) em conjugação com a função 4-oxo (sinalizado em verde) no anel C, responsável pela deslocalização eletrônica do anel B e a presença de hidroxilas nas posições 7 e 5 do anel A (LUE *et al.,* 2010; YANG *et al.*, 2008).

Figura 7: Estrutura molecular da rutina e sinalização de regiões importantes à atividade antioxidante (Adaptado de WILLIAMS *et al*., 2004)



A avaliação da capacidade antioxidante da rutina é descrita em diversos estudos. Lue e colaboradores, 2010, por exemplo, compararam a atividade antioxidante da rutina à dois de seus ésteres (possuindo grupamentos acila nos carbonos C12 e C16) e ao hidroxitolueno butilado (BHT). Constataram que, *in vitro*, os ésteres estudados apresentaram poder redutor e habilidade quelante de metais inferiores aos apresentados pela rutina, porém, semelhante atividade sequestradora do radical livre DPPH•. A capacidade quelante da rutina se deve primordialmente à presença de grupamento catecol, conforme **Figura 8**.

Figura 8: Sítios de ligação de metais na molécula de rutina (adaptado de PIETTA, 2000)



Kerdudo e colaboradores, 2014, encapsularam a rutina e naringenina em vesículas multilamelares visando melhoras na atividade antioxidante destes flavonoides, em comparação com os flavonoides livres. A pesquisa envolveu a separação da rutina livre e adsorvida às vesículas lipídicas, da rutina encapsulada nestas, por meio de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC). Os pesquisadores observaram que apenas a rutina livre ou adsorvida às vesículas apresentou atividade antioxidante, em ensaio *in vitro* com DPPH•. Observaram também que, a encapsulação da rutina foi capaz de proteger a molécula, sendo que, a rutina não encapsulada converteu-se em quercetina (KERDUDO *et al.,* 2014).

Yang e colaboradores, 2008, estudaram a capacidade antioxidante da rutina em comparação com BHT e ácido ascórbico. O desempenho antioxidante da rutina, em ensaio com DPPH• *in vitro*, só foi inferior ao do ácido ascórbico. Constataram também que este desempenho foi concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração de rutina, melhor o desempenho antioxidante do flavonoide. Quanto à inibição da peroxidação lipídica, averiguada por ensaio de TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico), a performance da rutina foi superior à apresentada pelo ácido ascórbico (YANG *et al.,* 2008).

Visando avaliar ou propiciar melhor permeação cutânea da rutina, Valenta, Nowack e Bernkop-Schnürch (1999), associaram a rutina à três géis, sendo o primeiro à base de deoxicolato de sódio, o segundo à base de hidroxietilcelulose e o terceiro à base de poliacrilato de sódio com o intuito de avaliar a taxa de penetração da rutina em pele de rato. Segundo esse estudo, o

gel a base de deoxicolato de sódio apresentou taxa de permeação superior aos demais géis estudados. Segundo Baby e colaboradores (2008), a incorporação da rutina em um sistema emulsionado contendo propilenoglicol como promotor de penetração cutânea, não favoreceu a penetração da rutina através da pele de muda de *C. durissis* (modelo de biomembrana escolhido para este estudo). Zillich e colaboradores (2013), estudaram as taxas de liberação e permeação de diversos polifenóis (rutina, quercetina, resveratrol, catequina, ácido protocatecuico e epigalocatequina-3-galato) apresentadas em duas emulsões com diferentes proporções de fase oleosa e aquosa (50:50 e 25:75 o/a). Para o estudo da taxa de liberação dos polifenóis nas emulsões, utilizou-se membrana de celulose, enquanto que, para o estudo da taxa de permeação, utilizou-se pele de porco. Zillich e colaboradores, 2013, observaram que a emulsão com menor conteúdo lipídico (25:75 O/A) apresentou maiores taxas de liberação e permeação, com exceção da quercetina, cujas taxas não apresentaram diferença estatisticamente significativa de acordo com a emulsão empregada.

A rutina apresenta duas faixas de absorção na faixa do espectro ultravioleta: a faixa I, de comprimentos de onda entre 320 e 385 e a faixa II, compreendendo a banda de 250 a 285, característico de todo flavonoide.

Quanto ao potencial fotoprotetor da rutina, em estudo de Choquenet e colaboradores, 2008, verificou-se que a rutina presente em concentração de 10% (p/p) em emulsões do tipo óleo em água foi capaz de apresentar fator de proteção solar (FPS) equivalente ao homossalato, reconhecido como filtro UVB (Choquenet et al. 2008).

Oliveira e colaboradores associaram a rutina aos filtros benzofenona 3 e avobenzona em formulações fotoprotetoras. O acréscimo da rutina nestas formulações propiciou aumento da atividade antioxidante de 40 vezes superior ao das formulações controle, sem a adição do flavonoide. A adição da rutina também surtiu efeitos na melhora do desempenho fotoprotetor da formulação contendo rutina a 0,1% (p/p) e Benzofenona 3 a 6% (p/p). Para esta formulação, houve aumento do fator de proteção solar (FPS), *in vitro*, de 24 para 33 e foi observado prevenção da foto-oxidação do filtro UVA. Entretanto, a adição da rutina à Avobenzona propiciou decréscimo do valor de FPS (Oliveira *et al*., 2015).

Velasco e colaboradores associaram a rutina aos filtros p-metoxicinamato de octila e benzofenona 3 e constataram elevação de FPS de 7,4 para 9,9, sendo que a eficácia protetora da rutina foi dependente da presença e da concentração dos filtros empregados nas formulações. Verificou-se também que a rutina não associada aos filtros, apresentou eficácia fotoprotetora quando comparada à formulação controle (sem rutina e sem filtros) (Velasco *et al*.; 2008).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

A proposta do projeto envolveu a avaliação da segurança e eficácia antioxidante *in vitro, in vivo* e *ex vivo* de etossomas com rutina, para finalidade dermocosmética.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos estão descritos a seguir:

(i) o desenvolvimento de etossomas contendo rutina a partir da fosfatidilcolina de gema de ovo;

(ii) a caracterização física e físico-química das nanopartículas;

(iii) avaliação da segurança dos etossomas, em ensaios *in vitro* e *in vivo;*

(iv) a análise *ex vivo* da liberação da rutina livre e nanoestruturada (etossomas), em formulações, e atividade antioxidante por meio da técnica de *tape stripping* na pele de voluntários.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Matérias-primas, reagentes e solventes:

- ✓ Acetonitrila grau cromatográfico - Merck®
- ✓ Ácido fórmico PA - Synth®
- ✓ Água ultrapura Milli-Q (Merck Milipore®)
- ✓ Cloreto de sódio – Synth®
- ✓ Clorofórmio PA - Synth®
- ✓ Co-polímero do ácido sulfônico acriloil-dimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado - *ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer*, Aristoflex® AVC - Pharmaspecial®
- ✓ Dodecil sulfato de sódio PA – Synth®
- ✓ DPPH - *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* - Sigma Aldrich®
- ✓ Etanol PA - Synth®
- ✓ Fosfatidilcolina de gema de ovo - Sigma Aldrich®
- ✓ Hidróxido de sódio PA – Synth®
- ✓ Metanol grau cromatográfico - Merck®
- ✓ Ovos galados Leghorn
- ✓ Rutina PA - Fagron®
- ✓ Rutina trihidratada padrão de referência primário, de pureza 97,1% - (Sigma - Aldrich®).

Equipamentos e dispositivos diversos:

- ✓ Agitador mecânico - IKA® RW 20n;
- ✓ Balança analítica - Shimadzu® AUY 220;
- ✓ Balanças semi-analíticas - Gehaka® BG 4000 e Ohaus® ARD 110;
- ✓ Banho de ultrassom - Unique® UltraCleaner 1600A;
- ✓ Câmara de fotoestabilidade - Atlas Suntest® CPS+;
- ✓ Câmera microscópio – Dino-Lite® 206bl;
- ✓ Centrífuga - Hitachi® RX2;
- ✓ Chocadeira – Chocomaster network® y39uq;

- ✓ Coluna de fase reversa C-18, CLC-C8(M), com 4,6mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5µm - Shimadzu®;
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência, detector espectrofotométrico de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, equipado com programa LC solution - Shimadzu®;
- ✓ Espectrofotômetro UV-Visível - Thermo Scientific® Evolution 600, munido de cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e acoplado a um sistema computacional;
- ✓ Fitas adesivas - 3M® Scotch MagicTM Tape;
- ✓ Membrana filtrante com abertura 0,45 µm (Milipore®);
- ✓ Micropipetas monocanal - Eppendorf® 100-1000 µL e 1,0-10,0 mL;
- ✓ Peagômetro - Quimis® Q400 AS
- ✓ Refrigerador - Consul® Frost Free 60;
- ✓ Rotaevaporador RV10 digital, com banho de aquecimento - IKA®;
- ✓ Sistema purificador de água - Merck Millipore® Mili-Q® Simplicity UV
- ✓ Unidade de ultrafiltração e centrifugação Ultrafree-MC 10000 (Millipore®).
- ✓ Vortex Genius 3 (IKA®);
- ✓ Zetasizer® ZS90 - Malvern

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção dos etossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo contendo rutina

Os etossomas foram obtidos por meio da técnica de hidratação de filme, com modificações, segundo Park e colaboradores, 2014. Alíquota de 660 mg (2,0% p/v) de fosfatidilcolina de gema de ovo foi pesada em balança analítica, e dissolvida em 30 mL de clorofórmio (99,5%, Synth®), em béquer com auxílio de bastão de vidro. Dez miligramas de rutina (95% de pureza, (0,03% p/v)), previamente triturada com auxílio de almofariz e pistilo de vidro, foram incorporados à fosfatidilcolina de gema de ovo dissolvida no clorofórmio. A mistura foi submetida à evaporação rotativa até remoção do solvente, sendo a temperatura do banho correspondente à 40ºC e a rotação de 60 rpm. O filme lipídico formado foi hidratado com 15 mL de solução de etanol (PA) em concentração de 20% v/v (etanol:água – 20:80) sendo submetido à agitação constante por meio de agitador magnético a 500 rpm e temperatura de 40ºC por uma hora. A suspensão de partículas foi submetida ao banho ultrassônico por 30 minutos, sem aquecimento. Também foram desenvolvidos etossomas sem rutina (etossoma branco - EB).

3.2.2. Caracterização física dos etossomas

3.2.2.1. Distribuição do tamanho de partícula e do potencial zeta

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das partículas, contendo ou não rutina, foram determinados pelo método de espalhamento de luz dinâmica (DLS). Para tal, 20 µL das suspensões de etossomas foram dispersos em 1,0 mL de água ultrapura Milli-Q a fim de se obter condições adequadas para as medições, segundo necessidades do equipamento. As medidas foram executadas à temperatura de 25°C, observando-se a luz espalhada em ângulo de 90°, utilizando-se o Zetasizer® ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). A equação de Stokes-Einstein é aplicada na determinação deste parâmetro.

Para a verificação do potencial zeta, foi utilizado o método de espalhamento de luz eletroforético (ELS), com o equipamento Zetasizer® ZS90,

sendo a força do campo aplicada correspondente a 20 V/cm. Para tal, 20 µL das suspensões etossomais foram dispersos em 1,0 mL de água ultrapura e acondicionados em célula contendo dois eletrodos. A mobilidade eletroforética da partícula foi medida no equipamento e convertida em potencial zeta, em mV, usando a equação Helmholtz-Smoluchowski. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3. Caracterização físico-química dos etossomas

3.2.3.1. Determinação do valor de pH

O valor do pH das amostras (branco e com rutina) foi determinado em peagâmetro Quimis® Q400 AS por imersão direta do eletrodo na dispersão, à temperatura ambiente (aproximadamente 24,0ºC).

3.2.4. Validação de método analítico para determinação da taxa/eficiência de associação do flavonoide nos etossomas

3.2.4.1. Linearidade

Para averiguação da linearidade do método foram preparadas sete soluções de concentrações distintas a partir de uma solução de estoque (1.000,0 µg/mL) de rutina trihidratada, padrão de referência primário, de pureza 97,1%, sem purificação prévia, em metanol. A leitura cromatográfica em réplicas de três das sete soluções de rutina nas concentrações de 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL possibilitou a elaboração da curva analítica e determinação do coeficiente de correlação (R^2) (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005).

3.2.4.2. Limite de Detecção

O limite de detecção corresponde ao menor valor de concentração da substância em análise capaz de ser detectado pelo método, com grau de confiabilidade adequado, porém, não quantificado com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

O limite de detecção foi calculado segundo a **Equação 2** (SHABIR, 2003), descrita a seguir:

$$LD = {3{,}3 \times \sigma}/{CA}$$

Equação 2: Limite de detecção

Legenda: LD é o limite de detecção; σ é o desvio padrão médio obtido por meio da curva analítica e CA é o coeficiente angular da equação da reta.

3.2.4.3. Limite de Quantificaçao

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em análise que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

O limite de quantificação foi calculado segundo a **Equação 3** (BRASIL, 2003), descrita a seguir:

$$LQ = {10 \times \sigma}/{CA}$$

Equação 3: Limite de quantificação

Legenda: *LQ* é o limite de quantificação; *σ* é o desvio padrão médio obtido por meio da curva analítica e *CA* é o coeficiente angular da equação da reta.

3.2.4.4. Precisão

A determinação da precisão intracorrida e intercorrida foi realizada por meio da análise de soluções de rutina, padrão de referência primário, em três concentrações distintas (0,06; 0,1 e 0,5 µg/mL). As amostras foram previamente filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas (30,0 µL) no cromatógrafo, em triplicata, no mesmo dia e em dias diferentes. A precisão foi calculada como desvio padrão relativo por meio da **Equação 4** (BRASIL, 2003; BABY, 2007; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005,).

$$DPR(\%) = \frac{DP}{C} x100$$

Equação 4: Precisão, calculada como desvio padrão relativo (DPR, %)

Legenda: DP é desvio padrão e C é a média das concentrações

3.2.4.5. Exatidão

Alíquotas de 3,0 mL de concentrações conhecidas (0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL) de solução metanólica de rutina, padrão de referência primário, foram adicionadas a 1,0 mL de etossomas sem adição de rutina. Previamente à adição das soluções, os etossomas foram desestruturados da seguinte maneira: 45 mL de etanol absoluto foi adicionado à alíquota de 3 mL de etossomas sem rutina. A dispersão originada foi submetida a rotaevaporação até completa evaporação do solvente. O material foi acrescido de 3 mL de metanol, retornando ao seu volume original. Alíquotas das soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Milipore®) e injetadas (30,0 µL) no cromatógrafo. A exatidão (%) foi realizada em triplicatas, e os ensaios foram realizados intra e interdias (BRASIL, 2003; RIBANI *et al*., 2004). O cálculo de exatidão foi realizado de acordo com a **Equação 5**.

$$Exatidão\ (\%) = \frac{C}{CT}\ x\ 100$$

Equação 5: Exatidão (%)

Legenda: C é a média das concentrações e CT é a concentração teórica.

3.2.4.6. Especificidade e Pesquisa de interferentes

A especificidade foi determinada através da comparação dos cromatogramas obtidos a partir das análises das soluções de rutina padrão de referência primário soluções de rutina comercial.

3.2.4. Avaliação da eficiência de associação da rutina nos etossomas

A avaliação da eficiência de associação da rutina nos etossomas foi realizada por meio do método de ultracentrifugação seguida de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo López-Pinto e colaboradores, 2005, com modificações. A alíquota de 500 µL da suspensão etossomal foi acondicionada em dispositivo de ultrafiltração e submetida à centrifugação por 2 horas à 15000 rpm. A rutina livre presente no filtrado foi transferida para balão volumétrico de 1 mL e completou-se o volume com metanol (99,8%). A solução obtida foi posteriormente filtrada (0,45 µm) e injetada (10,0 µL) no cromatógrafo, em triplicata. A taxa de associação da rutina associada aos etossomas foi calculada por meio da seguinte relação (**Equação 6**).

$$EE = \frac{Qt - Qf}{Qt}\ x\ 100$$

Equação 6: Taxa de associação da rutina (%) com o sistema nanoestruturado do tipo etossoma.

Legenda: EE corresponde à eficiência de encapsulação; Qt à quantidade teórica do flavonoide nos etossomas e Qf à quantidade do flavonoide detectada no filtrado.

Quanto à detecção da rutina por CLAE, aplicou-se método descrito por Dubber & Kanfer, 2004. Para tal, a fase móvel foi composta por solução aquosa de ácido fórmico 0,3%: acetonitrila (80:20, v/v), sendo a vazão correspondente à 1,2 mL/min. A coluna cromatográfica correspondeu à coluna Shimadzu® de fase reversa C-18, de dimensões 4,6 mm por 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5,0 µm. A detecção foi obtida em 350,0 nm, à temperatura de 40,0 ± 1,0°C. O método analítico para a quantificação da rutina foi validado quanto aos parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação; especificidade e pesquisa de interferentes, precisão e exatidão, ambos inter e intradias (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005).

3.2.5. Caracterização funcional dos etossomas

3.2.5.1. Atividade antioxidante

O potencial antioxidante dos etossomas, branco e com rutina, foi determinado por meio da ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•). O radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é capaz de mudar de coloração quando reduzido por substâncias antioxidantes, por transferência de átomo de hidrogênio ou recebimento de elétrons. Ao ser reduzido, o composto passa de roxo a amarelo, levando à diminuição dos valores de absorbância, observados em espectrofotômetro (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1997; LUE *et al*. 2010).

Alíquotas de 0,1 mL das amostras (etossomas branco e com rutina) foram transferidas para tubos de ensaio, com adição de 2,9 mL de solução de DPPH• a 100,0 µM, solubilizada metanol. Os tubos foram agitados vigorosamente e permaneceram em repouso à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0°C) e ao abrigo de luz. Após 60 minutos de reação, as amostras foram avaliadas espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 515 nm, em cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico. Como controles negativo e positivo, foram utilizados, respectivamente, metanol e solução do flavonóide rutina (na mesma concentração de rutina presente nos etossomas com rutina – 0,5 mg/mL). A atividade antioxidante foi expressa por meio da porcentagem de inibição do DPPH• pelas amostras, de acordo com a **Equação 7**.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Equação 7: Cálculo da porcentagem de inibição do radical livre DPPH•.

Na qual: *Abs controle* = absorbância da solução de DPPH• preparada com o controle negativo (metanol); *Abs amostra*= absorbância da solução de DPPH• preparada com a amostra em teste.

3.2.6. Avaliação do potencial de irritação por HET-CAM -*Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*

Ovos de galinha fecundados foram incubados por 9 dias a 37ºC e 65% de umidade relativa. Após o período de incubação, os ovos foram abertos com

auxílio de uma pinça e a membrana da casca foi hidratada com solução fisiológica (NaCl 0,9% p/v). Após a hidratação, as amostras foram depositadas sobre a membrana corio-alantóide, e foram observadas a ocorrência dos possíveis eventos vasculares, como reações de coagulação, hemorragia ou lise de vasos sanguíneos, por meio de gravação (5 minutos) em câmera e posterior análise dos vídeos. O ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra. O controle positivo constou de dispersão de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1,0% (p/v) e solução de hidróxido de sódio (1M), sendo o controle negativo a solução fisiológica (NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES, 2006).

O índice de irritação ocular (IS) foi calculado de acordo com a **Equação 8** e as amostras foram classificadas de acordo com os parâmetros do **Quadro 1** (KALWEIT *et al.,* 1990; NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES, 2006).

$$300\ (IS) = 5\ (301 - H) + 7(301 - L) + 9\ (301 - C)$$

Equação 8: Cálculo de Potencial de Irritação

Legenda: IS– índice de irritação; H– tempo (s) para iniciar um evento hemorrágico; L - tempo (s) para iniciar uma lise vascular; C - tempo (s) para iniciar uma coagulação.

Quadro 1: Classificação do potencial de irritação (KALWEIT *et al*., 1990)

Índice de irritação ocular (IS)	Classificação
0 – 0,9	Não irritante
1 – 4,9	Levemente irritante
5 – 8,9	Moderadamente irritante
9 – 21	Fortemente irritante

3.2.7. Desenvolvimento das formulações dermocosméticas antioxidantes

Os etossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo com rutina foram incorporados a um gel à base de co-polímero do ácido sulfônico acriloil-dimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado (ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer, Aristoflex® AVC, Pharmaspecial).

As formulações foram desenvolvidas contendo os compostos descritos na **Tabela 1**. Estas foram preparadas para atuarem como veículo para os principais compostos ativos.

Tabela 1: Composição qualitativa e quantitativa das formulações antioxidantes

Formulação	**Proporção (%p/p)**			
	Aristoflex® AVC	ER	RL	Água destilada (q.s.p.)
A	1,0	60	-	100
B	1,0	-	0,03	100

Legenda: q.s.p: quantidade suficiente para; ER: suspensão de etossomas contendo rutina; RL: rutina livre

Devido os etossomas serem obtidos na forma de uma suspensão, durante o preparo das formulações que continham as nanopartículas, o volume final de água a ser adicionado no preparo do gel foi descontado do volume acrescido da suspensão etossomal, conforme descrito na **Tabela 1.**

O volume da suspensão de etossomas contendo rutina que constou na formulação A, baseou-se na concentração teórica de rutina presente nos etossomas, que corresponde a 0,5 mg/mL. Assim, 100 g da formulação apresentaram 60 mL da suspensão de nanopartículas, totalizando 30 mg de rutina nanoestruturada em 100 g da formulação (proporção de 0,03% p/p).

A preparação das formulações foi realizada da seguinte maneira: o agente geleificante co-polímero do ácido sulfônico acriloil-dimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado (Aristoflex® AVC, Pharmaspecial) foi previamente hidratado em um béquer de vidro com quantidade suficiente de água purificada. Após o acréscimo do restante da água, o gel foi homogeneizado com de agitação vigorosa com bastão de vidro. Os compostos ativos foram pesados e incorporados ao gel formado, seguida de agitação também com bastão de vidro. As formulações foram acondicionadas em refrigerador para posteriores análises.

3.2.8. Caracterização físico-química e organolépticas das formulações dermocosméticas

O valor do pH das formulações dermocosméticas foi determinado em peagâmetro, pela imersão direta do eletrodo na dispersão, à temperatura ambiente (aproximadamente 24,0 ± 2,0ºC). Ademais, as formulações foram avaliadas organolépticamente quanto à homogeneidade, cor e odor.

3.2.9. Atividade antioxidante das formulações

As formulações A e B (item 3.2.8.), foram submetidas previamente a um estudo de eficácia *in vitro* por meio da avaliação da ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1997; LUE *et al.,* 2010).

Alíquotas de 0,1g das formulações A (gel contendo etossomas com rutina) e B (gel contendo rutina livre), foram transferidas para tubos de ensaio, com adição de 2,9 mL de solução de DPPH• a 100,0 µM, solubilizada metanol. Os tubos foram agitados vigorosamente e permaneceram em repouso à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0°C) e ao abrigo de luz. Após 60 minutos de reação, as amostras foram avaliadas espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 515 nm, em cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico. Como controle negativo, foi utilizado metanol.

A atividade antioxidante foi expressa por meio da porcentagem de inibição do DPPH• pelas amostras, de acordo com a **Equação 9**.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Equação 9: Cálculo da porcentagem de inibição do radical livre DPPH•.

Na qual: *Abs controle*= absorbância da solução de DPPH• preparada com o controle negativo (metanol); *Abs amostra*= absorbância da solução de DPPH• preparada com a amostra em teste.

3.2.10. Ensaios *ex vivo* e *in vivo*

3.2.10.1. Aspectos legais e éticos

Os ensaios *ex vivo* e *in vivo* (descritos nos itens 5.10.4 e 5.10.5.) foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. As análises e cuidados com os voluntários, assim como a seleção destes, foram realizados respeitando a Legislação Brasileira vigente, após a obtenção da aprovação do CEP, regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa. Os voluntários tiveram ciência sobre os objetivos dos ensaios, assim como possíveis riscos, e poderiam abandonar os estudos a qualquer momento, se assim desejarem. (BRASIL, 1996). O parecer consubstanciado do CEP encontra-se disponível para consulta na seção Anexos da presente Dissertação.

3.2.10.2. Voluntários

No primeiro dia de cada teste, foi realizada a avaliação clínica da pele de cada participante, visando avaliar os critérios estabelecidos para inclusão/exclusão dos participantes em cada estudo.

3.2.10.3 Ensaios *in vivo*

3.2.10.3.1. Ensaios de Segurança

Os estudos de segurança têm por finalidade comprovar a segurança das formulações por dados pré-clínicos e minimizar riscos de reações, por meio da avaliação de mecanismos irritativos e/ou alergênicos de um produto na população estudada. Trata-se do primeiro contado das formulações com os participantes da pesquisa.

As formulações A e B, descritas na **Tabela 1**, foram avaliadas com relação à sua segurança por meio dos ensaios de Irritação Cutânea Primária, Irritação Cutânea Acumulada e Sensibilização Dérmica. A ocorrência de possíveis reações de sensibilização e irritação foram analisadas por médico dermatologista durante todo o estudo e ao término deste. Através da escala de Draize (**Tabela 2**) foi possível categorizar os resultados de acordo com a presença ou ausência de eritema ou edema na região de aplicação das

formulações A e B. Como controle negativo dos ensaios, foi utilizada água purificada (DRAIZE *et al.,* 1944).

Tabela 2: Escala de Draize para avaliação do grau de irritação cutânea

Parâmetros	Reações observáveis	Escala
Formação de Eritemas	Ausência de eritema	0
	Eritema leve	1
	Eritema definido	2
	Eritema moderado a severo	3
	Eritema grave e formação de escaras	4
Formação de Edemas	Ausência de edema	0
	Edema leve (apenas visível)	1
	Eritema leve (contornos nítidos)	2
	Eritema moderado (espessura inferior a 1 mm)	3
	Eritema grave (espessura superior a 1 mm)	4

3.2.10.3.2. Irritação cutânea primária e Irritação cutânea acumulada

A averiguação de reações de irritação foi realizada através da aplicação das formulações testes, de maneira oclusiva (*patch test* contendo o produto em teste), no dorso de 55 participantes do estudo. O *patch* corresponde à um adesivo que permite o contato da formulação com a pele do participante da pesquisa por tempo determinado. O tempo de contato dos produtos com a pele foi de 48 horas para o ensaio de irritação cutânea primária e três semanas (com troca do *patch* contendo a formulação em teste a cada 48 horas) para o ensaio de irritação cutânea acumulada. Após cada troca de *patch*, e ao final dos ensaios, a pele dos participantes foi avaliada por dermatologista com relação a possíveis reações de irritação (COSMETICS EUROPE, 1997).

3.2.10.3.3. Sensibilização dérmica

A avaliação da sensibilização dérmica foi efetuada simultaneamente aos ensaios de irritação cutânea, utilizando os mesmos 55 participantes. Após o período de três semanas de contato do produto em teste com a pele, durante o

ensaio de irritação cutânea acumulada (período de indução), os participantes ficaram por um período de no mínimo 10 dias, sem contato com os produtos em teste (período de repouso). Após este período, um novo *patch* contendo a mesma formulação foi aplicada no dorso dos participantes, em área onde nenhum *patch* tenha sido aplicado anteriormente (período de desafio). Após dois dias, o *patch* foi retirado, com avaliação da pele dos participantes para averiguar possíveis reações de sensibilização (COSMETICS EUROPE, 1997).

3.2.10.4. Ensaios *ex vivo*

3.2.10.4.1. Aplicação das formulações na pele de voluntários

Três regiões de área correspondente à 6,25 cm^2 foram demarcadas na pele do ventre do antebraço de 10 voluntários. Alíquotas das formulações A (rutina em etossomas) e B (rutina livre) foram aplicados à razão de 8 mg/cm^2. Foram realizadas duas aplicações de cada amostra, sendo o intervalo entre as aplicações correspondente a duas horas. Não houve aplicação de nenhuma formulação na terceira região, atuando como região controle para cada voluntário.

3.2.10.4.2. Remoção do estrato córneo pela técnica de *tape stripping*

A técnica de remoção do estrato córneo por *tape stripping* foi realizada duas horas após a última aplicação das formulações A e B. Um estêncil foi aderido ao local de aplicação das formulações para demarcar o local da remoção do estrato córneo (área definida de 2,25 cm^2).

As fitas foram aderidas ao local de aplicação das formulações A e B, assim como à pele não tratada, com auxílio de um rolo, para facilitar a adesão das fitas, e rapidamente removidas, com auxílio de pinça. Para cada região, foram coletadas 20 fitas e estas foram divididas em três porções para análise: 1) primeira fita; 2) fitas 2 a 10 e 3) as fitas 11 a 20. Cada porção foi transferida para um tubo de centrífuga contendo 5 mL de metanol.

Para a extração do estrato córneo presente nas fitas, os tubos foram submetidos à agitação por meio de vórtex por dois minutos seguida de banho

ultrassônico (Unique® UltraCleaner 1600 A) por trinta minutos. O sobrenadante foi utilizado nas análises de atividade antioxidante e permeação cutânea.

3.2.10.4.3. Atividade antirradicalar *ex vivo* pelo método de *tape stripping*

A atividade antirradicalar das nanopartículas de fosfatidilcolina de gema de ovo contendo rutina na pele de voluntários foi determinada por meio do método de radical livre de DPPH•, segundo Bondet e colaboradores, 1997 e Huang e colaboradores, 2005.

Alíquota de 1,5 mL do sobrenadante obtido a partir da remoção do estrato córneo (item 3.2.11.4.2) foi acrescido de 1,5 mL de solução metanólica de DPPH• a 100,0 µM. Os tubos foram agitados vigorosamente e permaneceram em repouso à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0°C) e ao abrigo de luz por 60 minutos. Ao término deste intervalo, as amostras foram avaliadas espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 515 nm, em cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico. Como controle negativo foi utilizado metanol, na mesma proporção amostra:DPPH• (1:1).

A atividade antioxidante foi expressa por meio da porcentagem de inibição do DPPH• pelas amostras, de acordo com a **Equação 10**.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Equação 10: Cálculo da porcentagem de inibição do radical livre DPPH

Legenda: *Abs controle*= absorbância da solução de DPPH• - controle negativo
Abs amostra= absorbância da solução de DPPH• preparada com a amostra em teste.

3.2.10.4.4. Ensaio *ex vivo* da permeação da rutina livre e em etossomas pelo método de *tape stripping*

O sobrenadante obtido a partir da remoção do estrato córneo (item 3.2.10.4.2) foi filtrado (membrana de 0,45 µm, Milipore®) e submetido à análise cromatográfica de alta eficiência (Shimadzu®) para detecção e posterior quantificação da rutina nas três porções em que as fitas foram organizadas.

3.11. Análise estatística dos resultados

Os dados coletados foram avaliados estatisticamente pelo programa Minitab®, versão 16. As análises foram realizadas em triplicata, sendo o nível de significância igual a 5% ($p \leq 0,05$). Nas comparações entre duas amostras, os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico *t-Student*, enquanto que nas comparações entre três ou mais amostras, o teste estatístico utilizado foi o ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey.

Resultados e Discussão

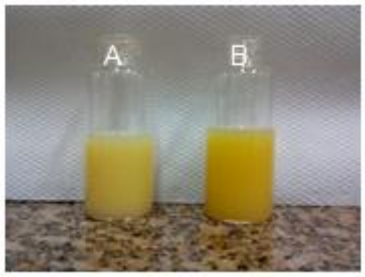
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção dos etossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo contendo ou não rutina

Os etossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo, contendo ou não rutina, foram obtidos de acordo com o método descrito no item 5.1. Ao empregar etanol 50% v/v, a dispersão dos etossomas apresentou separação de fases após o período de 4 dias, resultado corroborado pela literatura, considerando que etossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo possuem estabilidade quando preparados com etanol em concentração de, no máximo, 20 a 45% v/v, dependendo, também, da proporção do fosfolipídeo que é empregada (PARK *et al.*, 2012; PARK *et al.,* 2014).

Os etossomas contendo etanol 20% v/v resultaram em dispersão uniforme e homogênea, de coloração amarelada e odor característico de gema de ovo, **Figura 9**, sendo representados pela letra *A*. Os etossomas com rutina em sua composição apresentaram odor similar, porém a coloração obtida foi perceptivelmente mais escura, característica do próprio do flavonoide no grau de pureza utilizado (**Figura 9 B**). Oliveira, 2015, ao desenvolver nanopartículas de gelatina com e sem rutina, também observou aspecto amarelado nas amostras contendo o flavonoide.

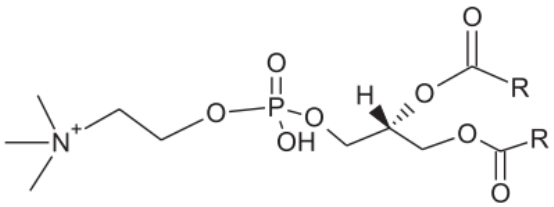
Figura 9: Dispersão de etossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo (A) com rutina (B)



O grau de pureza da fosfatidilcolina utilizada neste estudo foi de 80,1% segundo certificado de análise disponibilizado pelo fornecedor. A fostatidilcolina de elevado grau de pureza (maior que 99%, por exemplo) não possui coloração amarelada ou o odor característico de ovo, mesmo sendo obtida a partir da

mesma fonte. Assim, pode-se inferir que, se o grau de pureza da matéria-prima utilizada fosse superior, o apelo cosmético poderia ser aprimorado quanto à essa propriedade organoléptica. A fosfatidilcolina corresponde a uma combinação de fosfolipídeos naturais formados por um grupo colina e um grupo fosfato ligados à porção hidrofóbica, duas cadeias acílicas de 16 a 22 carbonos, por ligações ésteres com o glicerol (**Figura 10**). As cadeias acílicas podem conter insaturações. A presença do fósforo (carga negativa) é responsável pelo caráter polar destas estruturas, que, assim, apresentam-se como moléculas anfifílicas, fato que propicia a auto-organização destas em bicamadas (GŁADKOWSKI *et al.*, 2012; YOON & KIM 2002; MERTINS *et al.*, 2008).

Figura 10: Representação da estrutura molecular da fosfatidilcolina (MERTINS *et al.*, 2008)



Os fosfolipídeos apresentam temperatura de transição de fase (T_c) que pode variar de acordo com o grau de instauração da molécula e o comprimento das cadeias acílicas. A T_c corresponde àquela em que a membrana passa da fase gel, na qual a cadeia de hidrocarbonetos do lipídeo está em estado ordenado, para a fase de cristal-líquido, com as moléculas em movimentos mais livres e a membrana mais maleável, bem como os radicais hidrofílicos agrupados completamente hidratados. Submetendo os fosfolipídeos a temperaturas acima da T_c, propicia-se condição ideal para a reorganização do sistema em vesículas lipídicas e a incorporação da(s) molécula(s) desejada(s). Como a T_c é característica do fosfolipídeo empregado na obtenção dos etossomas, entende-se que vesículas compostas por lipídeos distintos podem apresentar diferenças quanto ao grau de fluidez na mesma temperatura, o que, consequentemente, influi na permeabilidade das vesículas lipídicas, visto que quanto menor a T_c,

menor a permeabilidade apresentada por estes, considerando que a permeabilidade pode ser medida por meio da observação do fluxo de saída do princípio ativo presente no compartimento aquoso das vesículas através das bicamadas (BATISTA *et al.,* 2007; FRÉZARD *et al*. 2005).

4.2. Caracterização física dos etossomas

4.2.2. Distribuição do tamanho de partícula e do potencial zeta

O método de espalhamento de luz dinâmico, utilizado para definição do tamanho de partículas e índice de polidispersão, baseia-se no conceito de movimento browniano de partículas em suspensão. Esta movimentação faz com que a luz aplicada na amostra seja espalhada com intensidades distintas, gerando flutuações de intensidade que resultam na velocidade do movimento browniano e, por fim, no tamanho de partícula por meio da relação Stokes-Einstein (**Equação 11**). A equação associa o tamanho da partícula (ou diâmetro hidrodinâmico) à temperatura da amostra e o coeficiente de difusão (obtido por meio da determinação das flutuações) (ZWIOREK, 2006).

$$d\ (H) = \frac{KT}{3\pi\eta D}$$

Equação 11: Equação Stokes-Einstein

Legenda: *d(H)* é o diâmetro hidrodinâmico; *K* é a Constante de Bolzmann; *T* é a temperatura absoluta (K); *η* é a viscosidade e *D* é o Coeficiente de difusão

A movimentação das partículas pode resultar em suas colisões. O que determina se as colisões irão propiciar a agregação das moléculas são as forças de interação entre elas. As partículas podem colidir e afastarem-se, mantendo o grau de dispersão do sistema coloidal ou colidir e agruparem-se. Assim, a avaliação do potencial zeta é relevante na previsão de estabilidade do sistema (ATTWOOD, 2005).

O método de espalhamento de luz eletroforético (ELS), utilizado para a verificação do potencial zeta, fundamenta-se no princípio físico da eletroforese. A célula que recebe a amostra mantém acoplados dois eletrodos nos quais é

aplicado um campo elétrico. Desta maneira, as partículas ou moléculas que têm carga líquida ou, mais propriamente, potencial zeta líquido, migram em direção ao eletrodo de carga oposta em determinada velocidade (ou mobilidade), e esta mobilidade relaciona-se ao potencial zeta da amostra (ZWIOREK, 2006). Os resultados referentes ao diâmetro (tamanho de partícula), potencial zeta e índice de polidirspersão dos etossomas, contendo ou não rutina, estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3: Determinação do diâmetro e potencial zeta dos etossomas de fofatidilcolina de gema de ovo

Suspensão de etossomas	Diâmetro (nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de polidispersão
Sem rutina	$247{,}0^{B} \pm 7{,}0$	$-39{,}3^{A} \pm 1{,}7$	$0{,}196^{A} \pm 0{,}015$
Com rutina	$369{,}5^{A} \pm 4{,}2$	$-19{,}6^{B} \pm 0{,}4$	$0{,}434^{B} \pm 0{,}010$

Legenda: Resultados de valores de diâmetro de partícula (nm) e potencial zeta (mV) expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Os etossomas contendo rutina apresentaram maior tamanho de partícula, quando comparados com aqueles sem o flavonoide. Tal evidência é corroborada pela literatura quanto aos etossomas desenvolvidos com as mesmas matérias-primas e sob as mesmas condições, pois segundo Park e colaboradores, 2014, etossomas “vazios” apresentaram diâmetro de 163,3 ± 2,0 nm, enquanto que aqueles com rutina geraram diâmetro entre 189 e 225 nm. O índice de polidispersão descreve a distribuição do tamanho de partícula das amostras. Valores até 0,3 para este parâmetro sugerem distribuição monomodal, o que não foi observado neste estudo para os etossomas com rutina (**Figura 12**), mas foi observado para os etossomas sem o flavonoide (**Figura 11**). O índice de polidispersão superior à 0,3 pode ser atribuído à formação de aglomerados, ou ainda, à formação de vesículas de diferentes diâmetros durante o desenvolvimento (KÜLKAMP *et al.*, 2009).

Figura 11: Representação gráfica da distribuição de tamanho por intensidade dos etossomas sem rutina

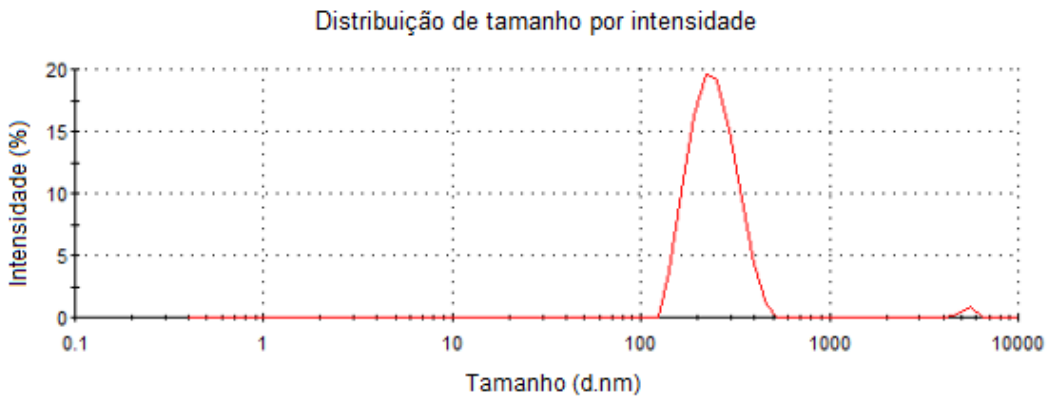


Figura 12: Representação gráfica da distribuição de tamanho por intensidade dos etossomas com rutina

Quanto ao potencial zeta, ressalta-se que quanto maior o valor em módulo deste parâmetro, mais estável é a formulação e menor a possibilidade da agregação das partículas. Segundo a literatura, partículas que apresentam valor em módulo de zeta de 30 mV são consideradas estáveis (CAO *et al*., 2009; TAVARES, 2013). Portanto, verificou-se que os etossomas sem rutina apresentaram-se estáveis aparentemente, enquanto que aqueles com rutina apresentaram potencial zeta, em módulo, igual a 19,6 mV.

Os valores observados para tais características foram similares àqueles descritos na literatura quando da preparação dessas nanopartículas por hidratação de filme lipídico. Adicionalmente, os valores de desvio padrão indicaram reprodutibilidade adequada do método utilizado. Ascenso e colaboradores, 2015, incorporaram cafeína em etossomas por meio de método

à frio. Os etossomas com cafeína apresentaram tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão de 137,07 ± 1,93 nm, -19,47 ± 6,07 e 0,171 ± 0,0067, respectivamente. Paolino e colaboradores, 2005, incorporaram glicirrizinato de amônio, fármaco utilizado em doenças inflamatórias da pele, em etossomas por meio do método clássico, variando as concentrações de etanol e de lecitina. Foi observado que etossomas com 30% (v/v) de etanol e 3% (p/v) de lecitina apresentaram maior tamanho de partícula (342 ± 31 nm) e índice de polispersão de 0,415 ± 0,041, enquanto que os etossomas obtidos com 45% (v/v) de etanol e 1% (p/v) de lecitina apresentaram tamanho de partícula de 102,0 ± 5,5 nm e índice de polispersão de 0,417 ± 0,007. Li e colaboradores, 2012, desenvolveram etossomas para incorporação do tacrolimo, fármaco imunossupressor utilizado no tratamento da dermatite atópica, por meio do método clássico. Observaram que os etossomas apresentaram menor tamanho de partícula quando comparados aos lipossomas clássicos com o mesmo fármaco. Assim, verifica-se que parâmetros como o tamanho de partícula, o potencial zeta e o índice de polidispersão variam em função da metodologia aplicada para obtenção das vesículas, das concentrações de etanol e fosfolipídeo utilizadas e da substância ativa a ser incorporada (ASCENSO *et al*. 2015; LI *et al*. 2012; PAOLINO *et al*. 2005).

4.3. Caracterização físico-química dos etossomas

4.3.1. Determinação do valor pH

A verificação do potencial hidrogeniônico das suspensões etossomais se fez necessária para averiguar sua compatibilidade com a pele e avaliar a dispensabilidade de correção do meio antes da incorporação dos etossomas às formulações dermocosméticas, além de caracterizá-los neste parâmetro. Os valores de pH obtidos no final do processo apontaram que os etossomas com rutina (ER) e aqueles sem rutina (EB) foram distintos para esse parâmetro ($p<0,05$), como observado na **Tabela 4**.

Tabela 4: Determinação dos valores de pH das suspensões de etossomas

Suspensão etossomal	Valor de pH
Sem rutina	4,11 ± 0,04[A]
Com rutina	3,90 ± 0,03[B]

Legenda: Resultados de valor de pH expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

De acordo com a análise estatística aplicada aos valores de pH mensurados em triplicata, constatou-se que a presença da rutina nos etossomas inferiu um caráter ácido à suspensão. Provavelmente, o aumento da acidez do meio pode ser atribuído à estrutura molecular deste flavonoide, que apresenta hidrogênios ionizáveis (JOVANOVIC, 1994).

4.4. Avaliação da eficiência de associação da rutina aos etossomas

4.4.1. Validação da metodologia analítica para quantificação de rutina em etossomas

4.4.1.1. Linearidade

A linearidade de um processo analítico corresponde à capacidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Para a construção da curva analítica, recomenda-se a utilização de ao menos cinco amostras de concentrações conhecidas. Caso constate-se relação linear, os resultados devem ser avaliados estatisticamente (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005).

A mensuração cromatográfica, em réplicas de três, das soluções de rutina (0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL) originou valores de área sob a curva expostos na **Tabela 5**, possibilitando a elaboração da curva analítica, ilustrada na **Figura 14**. O coeficiente de correlação e a equação da reta estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 5: Dados de área sob a curva para construção da curva analítica da rutina padrão de referência primário (T=97,1%)

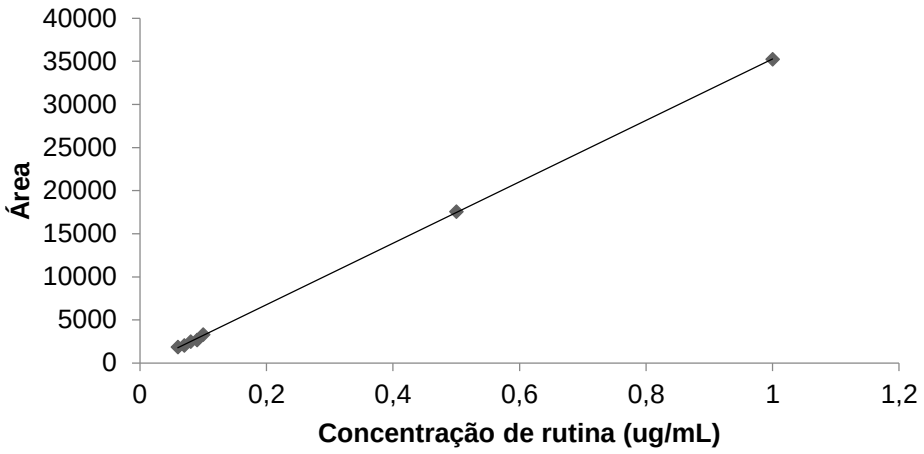
Concentração teórica de rutina padrão de referência primário (μg/mL)	Concentração Experimental			
	A_1	A_2	A_3	$A_{Média}$± dp
0,06	1716	1750	1849	1849 ± 69,10
0,07	2032	2417	2052	2052 ± 216,74
0,08	2735	2813	2499	2499 ± 163,49
0,09	2842	2357	2689	2689 ± 247,94
0,10	2970	3171	3319	3319 ± 175,17
0,50	17339	17182	17570	17570 ± 195,17
1,00	35533	35847	35229	35229 ± 309,01

Legenda: A1-A3: réplicas das áreas dos picos; $A_{Média}$± dp: média ± desvio padrão das áreas dos picos, (n=21)

Tabela 6: Análise de regressão da curva analítica da rutina padrão de referência primário (T=97,1%)

	Análise da regressão linear
Equação da reta	Área do pico = 35.636 (Concentração de rutina µg/mL) – 357,47
Coeficiente correlação linear (R^2)	0,9999

Figura 13: curva analítica da rutina padrão de referência primário (T=97,1%)



Conforme avaliação do R^2, igual a 0,9999, o método demonstrou-se linear nas condições adotadas (BRASIL, 2003).

4.4.1.2. Limite de detecção

Empregando a **Equação 8** e as informações apresentadas na **Tabela 6**, o limite de detecção estimado da rutina padrão foi **0,02 µg/mL**. O referido resultado foi compatível com aqueles descritos na literatura para métodos de quantificação do flavonoide rutina por CLAE (BRASIL, 2003; DUBBER & KANFER, 2004).

4.4.1.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação estimado foi **0,06 µg/mL** para o flavonoide padrão de referência primário. Valores de concentração superiores ao valor obtido são quantificados com precisão e exatidão aceitáveis pelo método empregado (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA,2013).

4.4.1.4. Precisão

A precisão de um método avalia o quão próximos estão os resultados obtidos em uma série de medidas. Dois níveis da precisão foram avaliados: repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada por meio da precisão intracorrida, averiguando a concordância entre os resultados em um curto período de tempo (mesmo dia) com o mesmos analista e instrumentação. A precisão intermediária corresponde à precisão intercorridas, na qual se avalia

a concordância entre os resultados obtidos em dias distintos de análise (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Os resultados do desvio padrão relativo (DPR, %), para três concentrações distintas (0,06; 0,10 e 0,50 µg/mL) das soluções de rutina padrão, apresentam-se nas **Tabelas 7** (precisão intradia) e **8** (precisão interdia). Os valores de desvio padrão relativo obtidos foram inferiores a 5,0%, para o ensaio intra e interdias. Por conseguinte, o método desenvolvido está em consonância com a normativa brasileira (BRASIL, 2003).

Tabela 7: Precisão intradia das soluções de rutina padrão de referência primário (T=97,1%)

Concentração teórica de rutina padrão de referência primário (µg/mL)	**Concentração Experimental**				
	C_1	**C_2**	**C_3**	**$C_{Média}$± dp**	**DPR(%)**
0,06	0,058	0,059	0,062	0,060 ± 0,00194	3,25
0,10	0,093	0,099	0,103	0,099 ± 0,00492	4,99
0,50	0,497	0,492	0,503	0,497 ± 0,00548	1,10

Legenda: Concentrações teóricas: concentração teórica das diluições do flavonoide rutina (µg/mL); C1 a C3: réplicas das concentrações calculadas (µg/mL) a partir dos resultados experimentais; Cmédia + dp: média + desvio padrão das concentrações calculadas do flavonoide rutina (µg/mL); DPR (%): precisão calculada como desvio padrão relativo (%). As concentrações calculadas do flavonoide rutina (µg/mL) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação: Área do pico = 35.636 (Concentração de rutina µg/mL) – 357,47

Tabela 8: Precisão interdia das soluções de rutina padrão de referência primário (T=97,1%)

Concentração teórica de rutina padrão de referência primário (μg/mL)	Concentração Experimental							
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	$C_{Média}$± dp	DPR (%)
0,06	0,058	0,059	0,062	0,065	0,063	0,065	0,062 ± 0,00288	4,6
0,10	0,093	0,099	0,103	0,103	0,101	0,102	0,100 ± 0,00380	3,8
0,50	0,497	0,492	0,503	0,507	0,500	0,503	0,500 ± 0,00529	1,1

Legenda: Concentrações teóricas: concentração teórica das diluições do flavonoide rutina (μg/mL); C1 a C6: réplicas das concentrações calculadas (μg/mL) a partir dos resultados experimentais; Cmédia + dp: média + desvio padrão das concentrações calculadas do flavonoide rutina (μg/mL); DPR (%): precisão calculada como desvio padrão relativo (%). As concentrações calculadas do flavonoide rutina (μg/mL) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação: Área do pico = Área do pico = 35.636 (Concentração de rutina μg/mL) – 357,47

4.4.1.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico retrata a proximidade dos resultados obtidos aos valores considerado nominalmente verdadeiros. A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação, onde o padrão de referência (rutina) foi adicionado à matriz isenta da substância (etossomas brancos).

Os cálculos de exatidão intra e interdias encontram-se representados pelas **Tabelas 9** e **10**, a partir do ensaio de recuperação do padrão. Os valores de exatidão obtidos foram entre 95 e 105%, desta forma pode-se compreender que o método analítico pode ser aplicado no ensaio de eficiência de associação de rutina aos etossomas, sem interferência da matriz etossomal (BRASIL, 2003).

Tabela 9: Exatidão intradia a partir do ensaio de recuperação do padrão de referência primário (T=97,1%) na presença da preparação de etossomas sem adição de rutina

Concentração teórica de rutina padrão de referência primário (μg/mL)	Concentração Experimental				
	C_1	C_2	C_3	$C_{Média}$± dp	E (%)
0,075	0,079	0,081	0,076	0,079 ± 0,0025	104,9
0,375	0,376	0,378	0,373	0,376 ± 0,0025	100,2
0,750	0,720	0,740	0,730	0,730 ± 0,01	97,3

Legenda: Concentrações teóricas: concentração teórica das diluições do flavonoide rutina (µg/mL); C1 a C3: réplicas das concentrações calculadas (µg/mL) a partir dos resultados experimentais; Cmédia + dp: média + desvio padrão das concentrações calculadas do flavonoide rutina (µg/mL); partir dos resultados experimentais; E (%): exatidão (%). As concentrações calculadas do flavonoide rutina (µg/mL) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação Área do pico = 35.636 (Concentração de rutina µg/mL) – 357,47

Tabela 10: Exatidão interdia a partir do ensaio de recuperação do padrão de referência primário (T=97,1%) na presença da preparação de etossomas sem adição de rutina

Concentração teórica de rutina padrão de referência primário (μg/mL)	Concentração Experimental							
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	$C_{Média}$± dp	E(%)
0,075	0,079	0,081	0,076	0,080	0,082	0,074	0,078 ± 0,003	104,9
0,375	0,376	0,378	0,373	0,376	0,372	0,375	0,377 ± 0,002	100,5
0,750	0,72	0,74	0,73	0,76	0,76	0,74	0,74 ± 0,01	98,9

Legenda: Concentrações teóricas: concentração teórica das diluições do flavonoide rutina (µg/mL); C1 a C6: réplicas das concentrações calculadas (µg/mL) a partir dos resultados experimentais; Cmédia + dp: média + desvio padrão das concentrações calculadas do flavonoide rutina (µg/mL); partir dos resultados experimentais; E (%): exatidão (%). As concentrações calculadas do flavonoide rutina (µg/mL) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação Área do pico = 35.636 (Concentração de rutina µg/mL) – 357,47

4.4.1.6. Especificidade e pesquisa de interferentes

Os parâmetros de especificidade e pesquisa de interferentes representam a capacidade que o método apresenta de detectar/quantificar exatamente um composto em presença de outros componentes, como componentes da matriz e impurezas (BRASIL, 2003).

A especificidade foi determinada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos a partir das análises das soluções de rutina padrão de referência primário (**Figura 13**) e soluções de rutina comercial (**Figura 14**). A partir da interpretação dos cromatogramas, observou-se que o pico cromatográfico no tempo de 5,942 minutos é atribuído à um só componente (rutina). Na **Figura 14** observa-se um segundo pico, com tempo de retenção de 7,488 segundos que corresponde à presença de isoquercetina presente na amostra de rutina comercial (DUBBER & KANFER, 2004).

Figura 13: Cromatograma referente ao flavonoide rutina, padrão de referência primário (97,1%; 1,0 µg/mL)

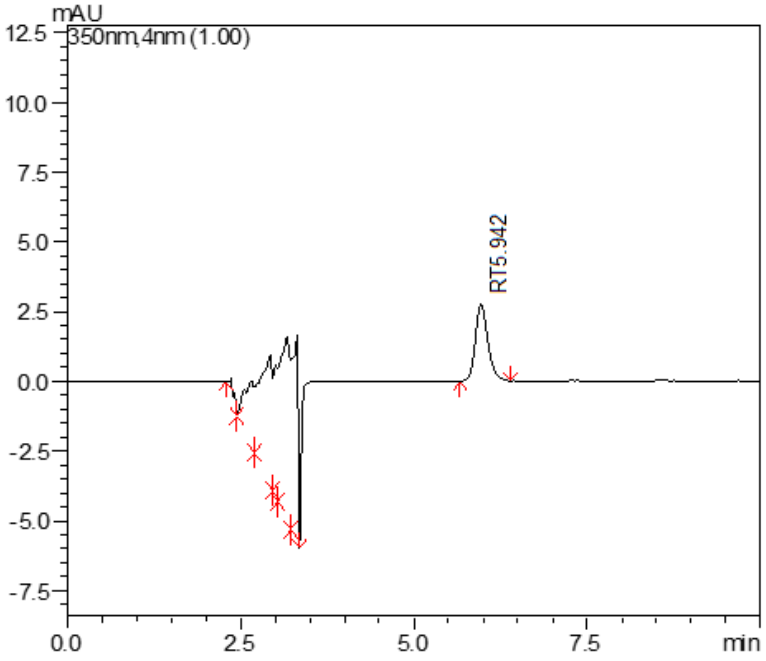
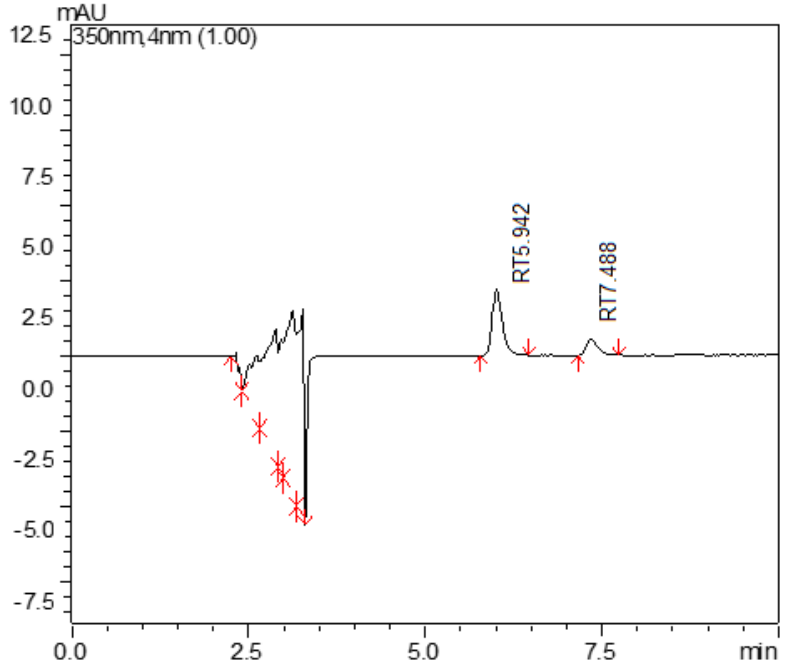


Figura 14: Cromatograma referente ao flavonoide rutina, amostra comercial (95,0%; 1,0 µg/mL)



A verificação da não interferência dos componentes da matriz etossomal foi realizada por meio de corrida cromatográfica de etossomas brancos (**Figura 15**).

Com o intuito de garantir que os componentes da fita utilizada na remoção do estrato córneo por meio da técnica de *tape stripping* não interferissem na quantificação da rutina, foi realizada extração com metanol, seguida de corrida cromatográfica desta solução (**Figura 16**). A análise dos cromatogramas correspondentes às amostras de etossomas sem rutina e de solução metanólica proveniente da extração das fitas utilizadas para o ensaio de permeação *ex vivo* (*tape stripping*) demonstrou que não houve pico cromatográfico que poderia influenciar na quantificação do flavonoide.

Figura 15: Cromatograma referente à amostra de etossomas sem rutina

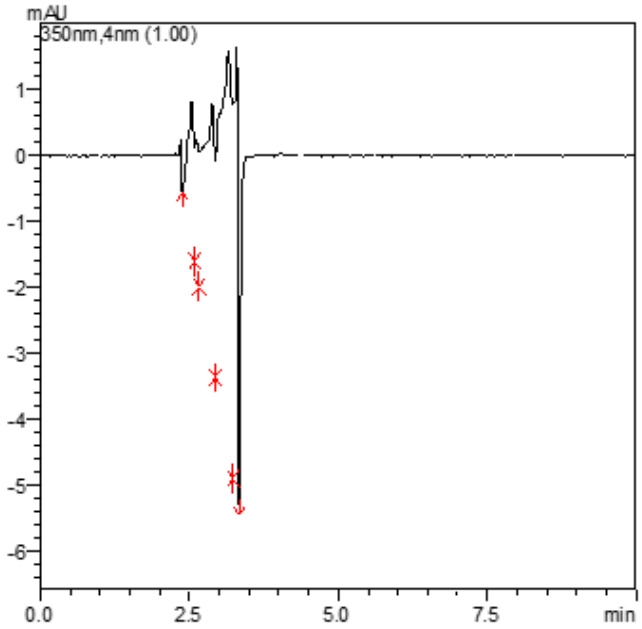
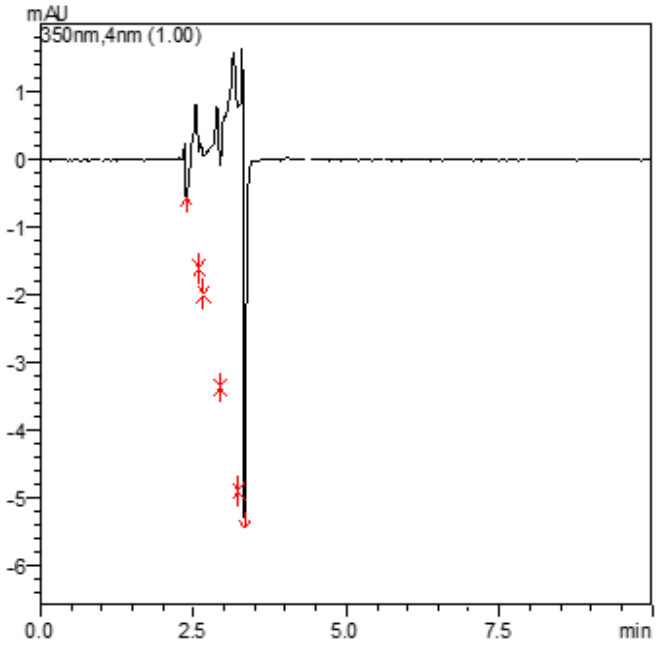


Figura 16: Cromatograma referente a solução obtida a partir da extração da fita com metanol



4.4.2. Determinação da eficiência de associação da rutina aos etossomas

Em estudo de Park e colaboradores, 2014, os etossomas com rutina foram desenvolvidos por meio da técnica de hidratação de filme lipídico, sendo a taxa de associação da rutina aos etossomas igual a 73,77 ± 0,01%. Kerdudo e

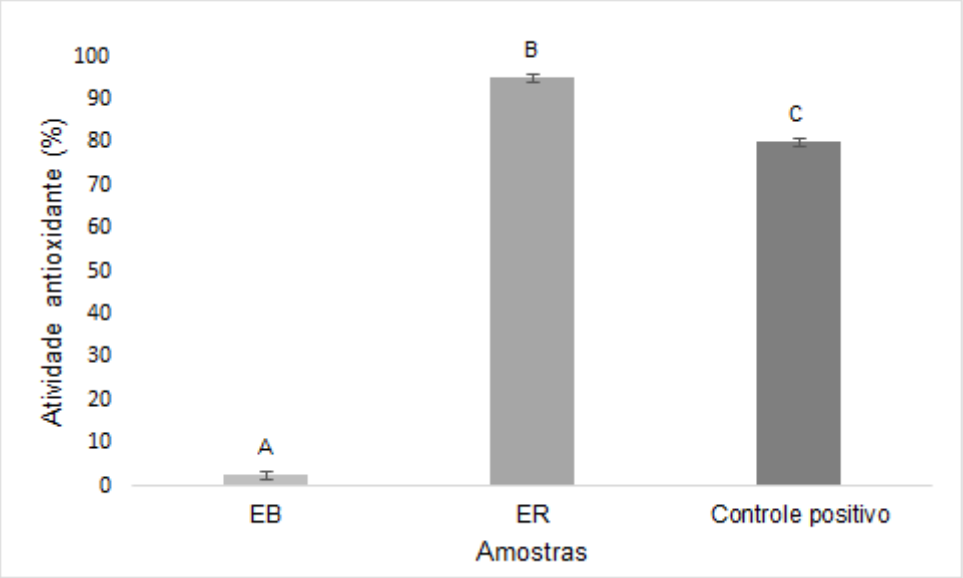
colaboradores, 2014, encapsularam a rutina em vesículas lipídicas multilamelares e a taxa de encapsulação do composto ativo foi 65,4 ± 0,3%. Nesta pesquisa, a partir dos cálculos envolvendo a **Equação 6**, verificou-se que 80,20 ± 0,02% da concentração de rutina empregada na obtenção dos etossomas foram associadas à estes, valor compatível com os descritos nas referências supracitadas. Tal resultado permite inferir que o método empregado na obtenção das vesículas, assim como os materiais utilizados, correspondem à fatores determinantes na eficiência de encapsulação de moléculas ativas em estruturas lipossomais/etossomais (GODIN & TOUITOU, 2003; PARK *et al.,* 2014; RAKESH & ANOOP, 2012).

4.5. Caracterização funcional dos etossomas

4.5.1. Atividade antioxidante

O desempenho antirradicalar das suspensões etossomais, com e sem rutina (ER e EB, respectivamente), encontram-se representadas na **Figura 17**.

Figura 17: Atividade antioxidante dos etossomas



Legenda: EB: etossoma branco e ER: etossoma com rutina. Letras diferentes nas barras representam diferenças estastiticamente significativas entre os grupos.

O potencial antioxidante de ER e EB, assim como o do controle positivo (solução do flavonóide rutina a 0,5 mg/mL), encontra-se representado em porcentagem de inibição do DPPH•. Constatou-se que ER apresentou atividade antioxidante superior (95% de sequestro de radicais livres) ao controle positivo (80%) que tratu-se de uma solução metanólica da rutina em concentração idêntica do flavonoide presente nos etossomas (0,5 mg/mL). A amostra EB não apresentou atividade antioxidante relevante (2,0%) (PARK *et al*., 2014; TOUITOU *et al.,* 2000).

4.6. Avaliação do potencial de irritação por método *in vitro* HET-CAM -*Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*

Os resultados obtidos no ensaio de segurança estão apresentados na **Tabela 11**, de acordo com a classificação do potencial de irritação, apresentada no Quadro 1 (KALWEIT *et al.,* 1990).

Tabela 11: Resultados do ensaio de segurança *in vitro*

	NaCl (0,9%)	NaOH (1M)	SDS (1%)	ER	Solução rutina 0,5 mg/mL
Índice de irritação	0	8,97	6,32	0	0

Legenda: ER – etossomas com rutina; SDS - dodecilsulfato de sódio

As soluções de hidróxido de sódio (1M) e de dodecilsulfato de sódio (1%) atuaram como controles positivos dos fenômenos de coagulação, lise e hemorragia. De acordo com a classificação apresentada no **Quadro 1**, categorizou-se os controles positivos como moderadamente irritantes (faixa de 5 a 8,9), enquanto que as amostras de etossomas com rutina e solução de rutina (0,5 mg/mL) não apresentaram potencial irritante (KALWEIT, 1990).

4.7. Caracterização físico-química e organolépticas das formulações dermocosméticas

As formulações foram avaliadas visualmente quanto ao seu aspecto e analisadas em relação ao valor de pH. Os resultados obtidos encontram-se expostos na **Tabela 12.**

Tabela 12: Características organolépticas e físico-químicas das formulações

Formulações	Aspecto	Características organolépticas	Valor de pH
A		Homogêneo, coloração amarela e odor característico	4,41 ± 0,04^{A}
B		Homogêneo, coloração amarelo claro e inodoro	4,61 ± 0,02^{A}

Legenda: Resultados de valor de pH expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

O co-polímero do ácido sulfônico acriloildimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado (Aristoflex® AVC) é um polímero sintético formador de gel em sistemas aquosos e emulsões em sistemas oleosos. Os géis formados com esta matéria-prima apresentam carga aniônica, estabilidade na faixa de pH de 4,0 a 9,0 e transparência (ATTWOOD, 2005; PHARMASPECIAL, 2014). Esta base foi escolhida por apresentar estabilidade físico-química, possibilitando a incorporação de fármacos e princípios ativos diversos a este veículo, pelo fato de não ser irritante e ser um bom agente de adesividade de caráter não pegajoso (PHARMASPECIAL, 2014).

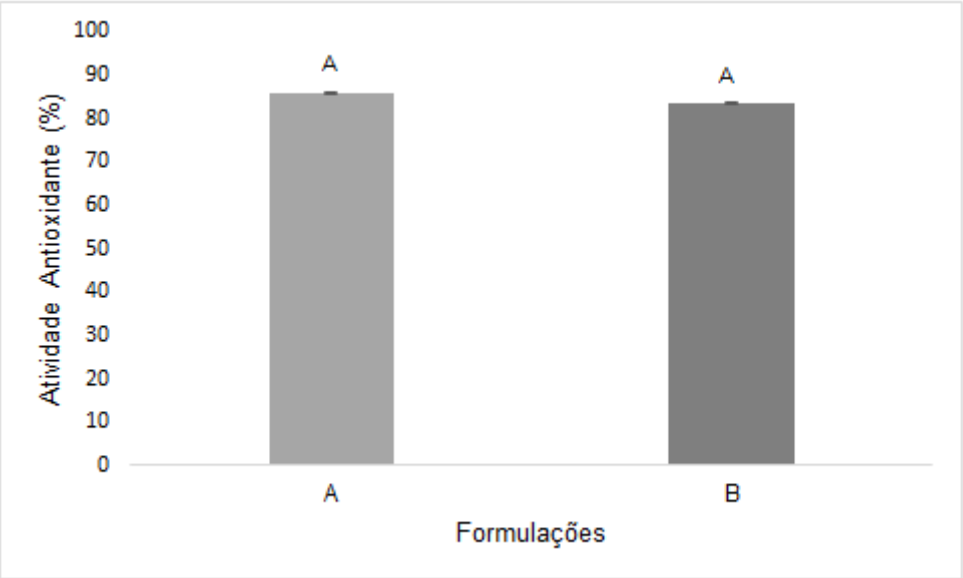
Quanto aos valores de pH apresentados pelas diferentes formulações, observou-se que, as formulações A e B exibiram valor de pH sem diferença

estatisticamente significativa entre elas e compatível com a aplicação na pele dos voluntários (RAWLINGS & HARDING, 2004; NOTMAN & ANWAR, 2013).

4.8. Atividade antioxidante das formulações

O comportamento antioxidante das formulações A (etossomas com rutina) e B (rutina livre) está retratado graficamente conforme observado na **Figura 18**.

Figura 18: Atividade antioxidante das formulações A e B



Legenda: Resultados de atividade antioxidante expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes acima das barras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste *t* de Student para duas médias (nível de significância = 0,05).

Não foi constatada diferenças entre a atividade antioxidante apresentadas pelas formulações A (86%) e B (83,5%). Desta maneira, podemos concluir que o desempenho antioxidante da rutina na formulação de escolha, a base de Aristoflex®, não foi influenciado pela sua associação aos etossomas, na concentração empregada do flavonoide neste estudo.

4.9. Ensaios *in vivo* de segurança

Os ensaios de irritação cutânea são capazes de comprovar a ausência de reações de irritação na população estudada e consistem em aplicação única (irritação cutânea primária) e repetida (irritação cutânea acumulada), do produto (formulações) em teste dos participantes, de forma oclusiva. O ensaio de sensibilização dérmica tem o propósito de corroborar a ausência de reações alérgicas por sensibilização (reações imunes de hipersensibilidade tardia) na população estudada. Tal ensaio é constituído por três fases: indução, repouso e desafio (COSMETICS EUROPE, 1997).

Para a realização dos ensaios de segurança *in vivo* foram recrutados 55 voluntários, com fototipos de pele entre II e IV, segundo escala Fitzpatrick. Os resultados obtidos para os ensaios de segurança de Irritação Dérmica e Sensibilização estão apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13: Ensaios de Segurança in vivo das formulações A e B

Ensaio Clínico	Participantes avaliados	Escala de Draize (edemas e eritemas)	
		Formulação A	Formulação B
Irritação cutânea primária e acumulada	55	Escala 0	Escala 0
Sensibilização dérmica	55	Escala 0	Escala 0

Foi possível observar que não houve qualquer tipo de reação que caracterizasse eventos de irritação cutânea primária e acumulada ou de sensibilização dérmica, assim, as amostras demonstraram-se seguras nas condições do ensaio.

4.10. Ensaios *ex vivo* de eficácia

O protocolo experimental *ex vivo* para as formulações A e B foi realizado com 10 voluntários saudáveis (todos do sexo feminino), com fototipos de pele entre II e V, segundo escala de Fitzpatrick. A média de idade dos voluntários foi 26,8 ± 6,46 anos (variação de 19-39 anos), conforme **Tabela 14**.

Tabela 14: Idade e fototipo dos voluntários selecionados para os ensaios *ex vivo*

Voluntário	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média ± desvio
Idade	28	21	39	27	34	19	30	21	28	21	26,8 ±6,46
Fototipo	V	IV	I	III	V	III	II	III	I	II	N.A.

Legenda: N.A.: não aplicável

4.10.1. Atividade antirradicalar *ex vivo* pelo método *tape stripping*

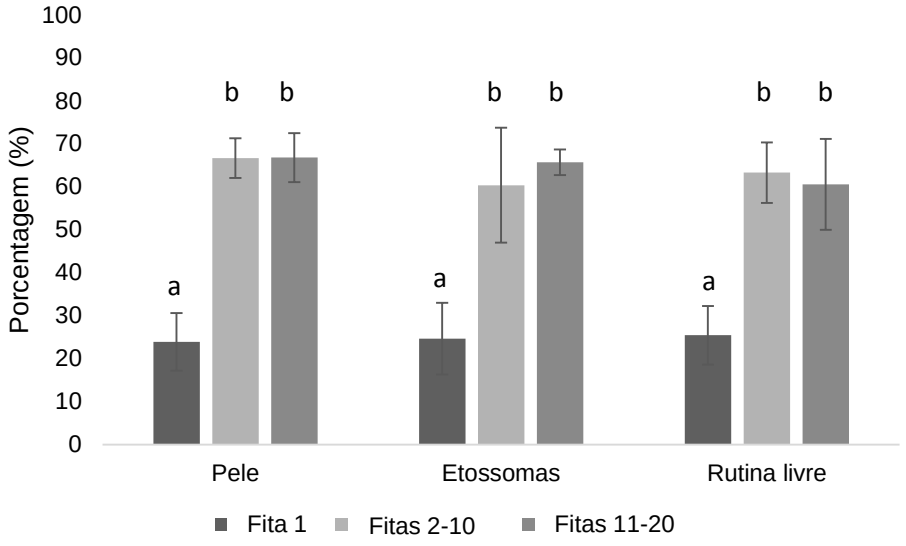
Com o intuito de avaliar a atividade antioxidante das formulações e a distribuição da rutina das formulações no estrato córneo, as 20 fitas removidas de cada área foram organizadas em três grupos distintos: fita 1; fitas de 2 a 10; e fitas 11 a 20. A atividade antirradicalar apresentada pela pele tratada com as formulações A e B, assim como pela pele não tratada, encontra-se disposta na **Tabela 15** e na **Figura 19**.

Tabela 15: Atividade antioxidante da epiderme, de acordo com ensaio *ex vivo,* em porcentagem (%) de inibição do DPPH

Amostras	Fita 1	Fitas 2 a 10	Fitas 11 a 20
Pele não tratada (controle)	23,89 ± 6,71^{A} %	66,66 ± 4,61^{B} %	66,78 ± 5,68^{B} %
A (etossomas com rutina)	24,61 ± 8,35^{A} %	60,34 ± 13,36^{B} %	65,71 ± 2,97^{B} %
B (rutina livre)	25,45 ± 6,81^{A}	63,27 ± 7,04^{B} %	60,53 ± 10,57^{B} %

Legenda: Atividade antioxidante da epiderme expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos (nível de significância = 0,05).

Figura 19: Atividade antioxidante da rutina em voluntários



Legenda: Atividade antioxidante expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes acima das barras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos (nível de significância = 0,05).

Os valores de atividade antioxidante foram expressos em porcentagem de inibição do radical livre DPPH. A partir da avaliação dos resultados, independente da formulação aplicada (A ou B) ou da ausência de aplicação da formulação (controle), a resposta antioxidante da pele não sofreu alteração.

A atividade antirradicalar das amostras de estrato córneo, presente na “Fita 1”, não foi diferente das amostras de pele não tratada, tratada com a formulação A e tratada com a formulação B. O mesmo ocorreu para os demais grupos: “Fitas 2 a 10” e “Fitas 11 a 20”. Pode-se justificar tal perfil de resultado em função da concentração de rutina nas formulações A e B, considerada reduzida, logo, não suficiente para a interferir positivamente na atividade antioxidante da pele. Assim, a atividade antioxidante observada neste ensaio pode ser relacionada ao sistema antioxidante cutâneo, formado por substâncias enzimáticas e não-enzimáticas. Dentre os antioxidantes enzimáticos, pode-se citar a glutationa peroxidase, a superóxido dismutase e a catalase. Os antioxidantes não-enzimáticos presentes na pele são representados pelos mais diversos compostos, obtidos endógena ou exogenamente, dentre estes, pode-se citar os hormônios estradiol, estrógeno, melatonina, ácido lipóico e melanina, entre outros (GUARATINI, 2007).

Alonso e colaboradores, 2009, determinaram a eficácia de duas formulações antioxidantes, uma contendo as vitaminas A, C e E, e outra contendo extrato de peixe. No referido estudo, os pesquisadores avaliaram o impedimento da peroxidação lipídica na camada córnea após exposição da radiação UV. Ambas as amostras foram aplicadas nos antebraços de voluntários e, depois do período de 7 dias, a técnica de *tape stripping* foi aplicada. A peroxidação lipídica foi avaliada *ex vivo* após irradiação de UV das amostras de estrato córneo. Alonso e colaboradores, 2009, demonstraram a eficácia antioxidante das formulações, visto que a inibição da peroxidação lipídica foi entre 40 e 58% (Alonso *et al*. 2009). Em comparação com o presente estudo, pode-se sugerir que o aumento do número e da frequência das aplicações das formulações, bem como ajuste da forma de aplicação, realizando-na de forma oclusiva, por exemplo, seriam estratégias para averiguação da capacidade antioxidante das formulações testadas (Alonso *et al*. 2009; Lademann *et al*. 2009).

4.10.2. Estudo *ex vivo* da permeação da rutina livre e em etossomas pelo método de *tape stripping*

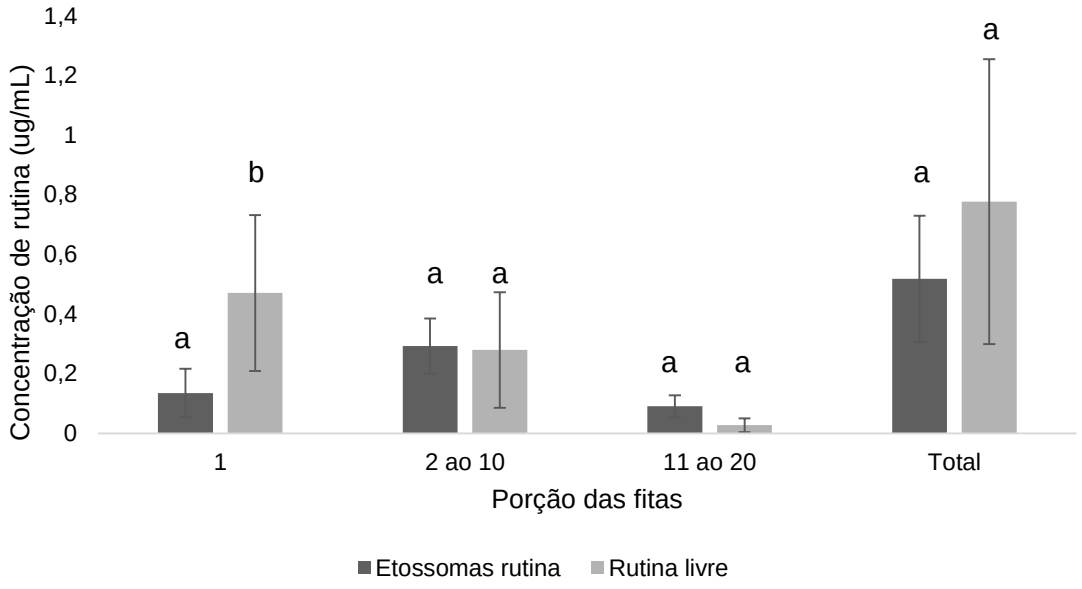
A avaliação da permeação cutânea da rutina livre e em etossomas foi realizada com pretensão comparativa, para avaliar se a rutina em etossomas permearia de forma mais eficiente. Avaliando a distribuição das formulações no estrato córneo, por meio da quantificação da rutina em cada conjunto de fitas (fita 1, fitas 2 a 10 e fitas 11 a 20), obseravam-se diferenças entre as profundidades de retenção na pele, conforme dados da **Tabela 16** e da **Figura 20**.

Tabela 16: Concentração de rutina quantificada por tape stripping nos voluntários, em ug/mL

Amostras	Fita 1	Fitas 2 a 10	Fitas 11 a 20	Total
A (etossomas com rutina)	0,135 ± 0,081[A]	0,292 ± 0,092[A]	0,090 ± 0,037[A]	0,518 ± 0,211[A]
B (rutina livre)	0,471 ± 0,261[B]	0,279 ± 0,194[A]	0,027 ± 0,023[A]	0,777 ± 0,478[A]

Legenda: Resultados de permeação cutânea da rutina, em etossomas (A) e livre (B) na epiderme expressos como média percentual ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos (nível de significância = 0,05).

Figura 20: Concentração de rutina quantificada por *tape stripping* nos voluntários



De acordo com as concentrações de rutina quantificada por meio da técnica de *tape stripping*, pode-se perceber diferenças estatisticamente significativas entre as amostras A e B em relação às porções de fita 1 e fitas de 11 a 20. Constatou-se que a rutina livre (Formulação B), permaneceu retida nas camadas superiores do estrato córneo enquanto que a rutina em etossomas apresentou tendência à permeação cutânea, fato comprovado por meio da compararação entre as concentrações de rutina das porções citadas. Assim,

constatou-se que a incorporação da rutina nos etossomas propiciou aumento da taxa de permeação cutânea. Tal perfil deve-se ao fato de que os etossomas são vesículas maleáveis capazes de permear entre os corneócitos, facilitando a passagem de moléculas de interesse, conforme demonstrado em literatura (PARK *et al.,* 2014; TOUITOU *et al*., 2000). Para se comprovar tal hipótese, pode-se sugerir a realização de ensaio de permeação cutânea *in vitro* (BENFELT, 2007).

Ademais, a partir do ensaio de permeação cutânea no qual se determinou o total de rutina que penetrou/permeou através/na pele, observou-se que não houve a recuperação total do princípio ativo. Recuperou-se 0,518 ± 0,211 ug/mL da rutina em etossomas presente na formulação A e 0,777 ± 0,478 ug/mL da rutina livre presente na formulação B, concentrações estas não diferentes. Esperava-se encontrar a concentração total de 1,5 ug/mL, correspondente à massa total de rutina aplicada na pele dos voluntários. Este fato pode ser atribuído à remoção mecânica das formulações aplicadas, pelo próprio voluntário, por exemplo. Assim, poderia-se sugerir que, em estudos futuros, a aplicação das formulações ocorresse de forma oclusiva, ou até mesmo aumento das aplicações das formulações.

Paolino e colaboradores, 2005, compararam a permeação do nicotinato de metila em etossomas à substância em solução etanólica e aquosa. A permeação cutânea foi avaliada por meio do estrato córneo da epiderme humana proveniente de cirurgia de redução de abdômen, utilizando células de difusão vertical. Os pesquisadores observaram que os etossomas foram capazes de otimizar a permeação do nicotinato de metila em até 40%, após 24h da aplicação da formualção (Paolino *et al.* 2005).

Ascenso e colaboradores, 2015, avaliaram a permeação cutânea da cafeína em etossomas, transetossomas e transferossomas por meio do uso de células de difusão e pele de orelha de porco. Estes observaram que as diferentes vesículas apresentaram perfis de permeação distintos (cafeína nos transetossomas permeou mais, seguida dos etossomas e transferossomas), porém, todas foram adequadas para penetração mais profunda do alcalóide (Ascenso *et al*. 2015).

Li e colaboradores, 2012, associaram o fármaco tacrolimo à etossomas e compararam a permeação cutânea das vesículas etossomais com pomada

disponível no mercado com o mesmo fármaco. O estudo envolveu a utilização de células de difusão vertical e pele de rato Wistar. Os pesquisadores observaram que a quantidade restante do tacrolimo na epiderme, no final de 24h do experimento, foi superior no sistema etossomal em relação à pomada comercial, sugerindo que os etossomas desenvolveram maior capacidade de penetração nas camadas mais profundas da pele (Li *et al*. 2012).

Park e colaboradores, 2014, avaliaram a permeação da rutina em solução etanólica, solução aquosa e em vesículas lipossomais e etossomais, por meio de ensaio com células de difusão e pele de rato albino. Constataram que 61,30% da rutina presente em etossomas foi capaz de permear a pele, contra 44,16% da rutina em solução etanólica, 37,8% da rutina em lipossomas, e 18,31% do flavonoide em solução aquosa (Park, Lee, and Gu 2014). Os estudos registraram elevação da permeação cutânea de diversos tipos de substâncias incoporadas em etossomas, quando em comparação com suas soluções aquosas ou etanólicas. Assim, os etossomas apresentam-se como tecnologia relevante na otimização da eficácia de formulações de uso tópico, seja com finalidade cosmética ou farmacêutica.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- Obtenção dos etossomas

Por meio da técnica de hidratação de filme, foram obtidos etossomas contendo ou não rutina, com partícula em dimensão nanométrica (369,5 e 247 nm, respectivamente). A rutina associada ao sistema etossomal foi quantificada por meio de Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência, e a taxa de associação obtida foi de 80,1%.

- Caracterização física e físico-química das nanopartículas

Os etossomas com e sem rutina foram caracterizados quanto ao tamanho de patícula, potencial zeta e valor de pH. O potencial zeta, para os etossomas sem rutina correspondeu à -39,3, enquanto que os etossomas com rutina apresentaram potencial zeta de -19,6. O valor de pH dos etossomas com e sem rutina, correspondeu à 4,11 e 3,90, respectivamente.

- Avaliação da segurança dos etossomas, em ensaios *in vitro* e *in vivo*

Por meio dos ensaios *in vitro* (Het-cam) e *in vivo*, foi possível constatar a segurança das vesículas etossomais e verificar sua aplicabilidade em ensaios *ex vivo* de permeação e atividade antioxidante em voluntários.

- Formulações dermocosméticas

Formulações à base do co-polímero do ácido sulfônico acriloil-dimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado foram desenvolvidas e apresentaram compatibilidade com os compostos ativos.

- Ensaios *ex vivo*

Os etossomas foram capazes de auxiliar na permeação cutânea da rutina, quando comparado com formulação contendo a rutina em sua forma livre. Porém, devido, provavelmente, à concentração reduzida da rutina empregada nas amostras, não foi observada atividade antioxidante superior à da própria pele.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.S.; LIMA, F.; ROS, S.D.; BULHÕES, L.O.S.; CARVALHO, L.M.; BECK, R.C.R. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale Research Letters*, v.5, p.1603-1610, 2010.

ALONSO, C.; BARBA, C.; RUBIO, L.; SCOTT, S; KILIMNIK, A.; CODERCH, L; NOTARIO, J.; PARRA, J. L. An ex vivo methodology to assess the lipid peroxidation in stratum corneum. *Jounal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 97, p. 71-76, 2009.

ALVES, C.Q.; BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; LIMA, L. da S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides*. Diálogos e Ciência.* Ano V, n. 12, 2007.

ARAÚJO, T. S. de; SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. *Scientia Plena*. v.4, p.1-7, 2008;

ASCENSO, A.; RAPOSO, S.; BATISTA, C.; CARDOSO, P.; MENDES, T.; PRACA, G. F. BENTLEY, M. V. L. B.; SIMOES, S. Development , characterization , and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes and transethosomes. *International Journal of Nanomedicine*, v.10, p. 5837–5851, 2015.

ATTWOOD, David. Sistemas dispersos. In: AULTON, Michael E.. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 6, p. 84-99.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE-JÚNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,* v.44, p. 233-248, 2008.

BABY, A.R.; MACIEL, C. P. M.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; VELASCO, M. V. R. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents,

from Trichilia catigua Adr. Juss (Meliaceae) (and) Ptychopetalum olacoides Bentham (Olacaceae) commercial extract. *Journal of AOAC International. Gaithersburg*, v. 88, p. 1015-1019, 2005.

BABY, A.R.; MACIEL, C. P. M.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. UV spectrophotometric determination of bioflavonoids from a semisolid pharmaceutical dosage form containing Trichilia catigua Adr. Juss (and) Ptychopetalum olacoides Bentham standardized extract: analytical method validation and statistical procedures. *Journal of AOAC International, Gaithersburg*, v. 89, p. 1532-1537, 2006.

BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M..; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta : recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v. 86. p. 732 – 742, 2011.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p. 113–123, 2006.

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

BARRY, B.W. Dermatological formulations. *Percutaneous Absorption*. New York; Basel: Marcel Dekker, 1983. 480p.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da Arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 167–179, 2007.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição*. v.15, p. 285-292, 2004.

BISSONETE, R. Update on sunscreens. *Skin Therapy Letter*. v. 13. p. 5 -7, 2008.

BOBIN, M.F.; RAYMOND, M; MARTINI, M.C.Propriedades de absorção UVA/UVB de produtos naturais.. *Cosmetics & Toiletries*, v. 7, p. 44-50, 1995.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH* free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, London, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 30, de 1º de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre protetores solares em cosméticos e dá outras providências. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 2 set 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução Normativa nº 196, de 10 de outubro de 1996. Aprovaras seguintes diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br>. Acesso em: 18 nov. 2014.

BRASIL. Resolução R.E. nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "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 jul. 2014.

CAO, J.; SUN, J.; WANG, J.; LI, X.; DENG, Y. N-trimethyl chitosan-coated multivesicular liposomes for oxymatrine oral delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 35. P. 1339 – 1347, 2009.

CEVC, G. 2004. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced drug delivery reviews*, v. 56, p. 675–711, 2004.

CHOQUENET, B.; COUTEAU, C.;, PAPARIS, E.; COIFFARD, L. J. M. 2008. Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. *Journal of natural products*, v. 71, p. 1117–1118, 2008.

COLIPA. Product test guidelines for the assessment of human skin compatibility. Brussels, 1997, 26 p.

DAYAN, L.; TOUITOU, E. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs. liposomes. *Biomaterials*. v.21, p.1879-1885, 2000.

DONGARE, S. U.; RAUT, S.; BONDE, S.; TAYSHETE, S.; GURAV, K. Ethosomes as novel vesicular carriers for enhanced drug delivery. *Citeseer*, v. 4, p. 2100–2118, 2012.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*. v.28, p.241-249, 2008.

DRAIZE, J. H. WOODWARD, D. G.; CALVERY, H.O. Methods for study of irritation and toxicity substances applied to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*, v. 82, p. 377-390, 1944.

DUKHIN, A.S.; GOETZ, P.J. Characterization of aggregation phenomena by means of acoustic and electroacoustic spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.144, p.49-58, 1998.

ELSAYED, M.M.A.; ABDALLAH, O.Y.; NAGGAR, V.R.; KHALAFALLAH, N.M. Deformable lipossomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery. *International journal of pharmaceutics*. v.322, p. 60-66, 2006

ESPOSITO, E.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R. Ethosomes and liposomes as topical vehicles for azelaic acid: a preformulation study. *Journal of Cosmetic Sciences*, v. 55, p. 253–264, 2004.

FONSECA, Y. M.; VICENTINI, F. T. M. C.; CATINI, C. D.; FONSECA, M. J. V. Determination of rutin and narcissin in marigold extract and topical formulations by liquid chromatography: applicability in skin penetratio studies. *Química Nova*. v. 33. p. 1320 – 1324, 2010.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, v. 28, p. 511–518, 2005.

GASPARRO, F. P. Sunscreens, Skin Photobiology, and Skin Cancer: The Need for UVA Protection and Evaluation of Efficacy. *Environmental Health Perspectives*. v.108, p. 71-78, 2000.

GŁADKOWSKI, W.; CHOJNACKA, A.; KIEŁBOWICZ, G.; TRZISZKA, T.; WAWRZEŃCZYK, C. Isolation of pure phospholipid fraction from egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 89, p. 179–182, 2012.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Ethosomes: new prospects in transdermal delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 20, p. 63–102, 2003.

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

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids: effects of rutin, quercetin and hesperedin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco*, v.56, p.683-687, 2001.

HAN, R. M.; ZHANG, J. P.; SKIBSTED, L. H. Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids as Antioxidants. *Molecules*, v. 17, p. 2140–2160, 2012.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v.55, p.481-504, 2000.

HOWARD, W., WENDER, S. Acid Dissociation Exponents of Rutin and Xanthorhamninl. *Journal of American chemical society*, v. 159, p. 143–144, 1952.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 53, n. 6, p.1841-1856, 2005.

INCA, Instituto Nacional Do Câncer José Alencar Gomes Da Silva. Tipos de Câncer. Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_nao_melanoma>. Acesso em: 5 jan. 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION GUIDELINE. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. United States of America, 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 jul. 2014.

JOVANOVIC, S. V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; MARJANOVIC, B.; SIMIC, M. G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. v. 116. p. 4846 – 4851, 1994.

KALWEIT, S.; BESOKE, R.; GERNER, I.; SPIELMANN, H. A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test. *Toxicology in vitro*, v.4, p. 702-706, 1990.

KERDUDO, A.; DINGAS, A.; FERNANDEZ, X.; FAURE, C. 2014. Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food chemistry*, v. 159, p. 12–19, 2014.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress--new approaches for their evaluation. *Biomedicine & pharmacotherapy*, v. 53, p. 181–192, 1999.

KÜLKAMP, I. C.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. *Química Nova*, v. 32, n. 2078, 2009.

LADEMANN, J.; JACOBI, U.; SURBER, C. WEIGMANN, H. J.; FLUHR, J. W. 2009. The Tape Stripping Procedure - Evaluation of Some Critical Parameters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 72, p. 317–323, 2009.

LI, G. 2012. Tacrolimus-loaded ethosomes: physicochemical characterization and in vivo evaluation. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 82, p. 49–57, 2012.

LI, G.L.; van der GEEST, R.; CHANET, L.; van ZANTEN, E.; DANHOF, M.; BOUWSTRA, J.A. In vitro iontophoresis of R-apomorphine across human stratum

corneum. Structure-transport relationship of penetration enhancement. *Journal of controlled release*, Amsterdam, v. 84, n. 1-2, p. 49-57, 2002.

LIANG, R. 2012. Antioxidants and physical integrity of lipid bilayers under oxidative stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 60, p. 10331–10336, 2012.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. Flavonoides: farmacologia dos flavonoides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Ano 3, n.17, 2000.

LUE, B. M. Antioxidant properties of modified rutin esters by dpph, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein Assays*. Food Chemistry*, v. 123, p. 221–230, 2010.

MACHADO, H. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, v. 27, p.33-39, 2008.

MAHESHWARI, R.G.S.; TEKADE, R.K.; SHARMA, P.A.; DARWHEKAR, G.; ABHISHEK, T.; PATEL, R.P.; JAIN, D.K. Ethosomes and ultradeformable liposomes for trandermal delivery of clotrimazole: a comparative assessment. *Saudi Pharmaceutical Journal*. v.20, p.161-170, 2011.

MANELA-AZULAY, M.; BAGATIN, E. Cosmeceuticals Vitamins. *Clinics in dermatology*, v. 27, p. 469–474, 2009.

MARIANECCI, C.; DI MARZIO, L.; RINALDI, F.; CELIA, C.; PAOLINO, D.; ALHAIQUE, F.; ESPOSITO, S.; CARAFA, M. Niosomes from 80s to present: the state of the art. *Advances in colloid and interface science*, v. 205, p. 187–206, 2014.

MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *Journal of dermatological science,* v. 58, p. 85–90, 2010.

Mertins, O. Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de H e de P. *Quimica Nova*, v. 31, p. 1856–1859, 2008.

MIELCZAREK, C. 2005. Acid-Base Properties of Selected Flavonoid Glycosides. *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 25, p. 273–279, 2005.

MOHAMED-MUSTHABA, S.; ATHAR, M.T; KAMAL, Y.T.; SANJULA, B.; JAVED, A.; SAYEED, A. Fast analysis and validation of rutin in anti-psoriatic ayurvedic formulation by hplc. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 34, p.446–455, 2011.

MUDUMBA, S.; ADEMOLA, J.; MAIBACH, H. I. Colorimetric Method for Quantifying Human Stratum Corneum Removed by Adhesive-Tape-Stripping. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 7, p. 186–89, 1998.

NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 3, p. 318–326, 2000.

NOTMAN, R.; ANWAR, J. Breaching the skin barrier - insights from molecular simulation of model membranes. *Advanced drug delivery reviews*. v. 65. p. 237 – 250, 2013.

OLIVEIRA, C. A. et al. Cutaneous biocompatible rutin-loaded gelatin-based nanoparticles increase the SPF of the association of UVA and UVB filters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 1, p. 1-9, 2016.

OLIVEIRA, C. A. et al. Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 148, p. 154–159, 2015.

OLIVEIRA, C. A.; SILVA, A. L. F.; PERES, D. D.; FLORIDO, A.; CHACRA, N. B.; SARAIVA, N.; MOTA, J.; ROSADO, C.; VELASCO, M. V.; LUÍS, M. RODRIGUES; FERNANDES, A. S.; BABY, A. R.. Rutin-loaded protein based nanotechnology: a platform for innovative sunscreens. In: 27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2014, São Paulo. Rutin-loaded protein based nanotechnology: a platform for innovative sunscreens, 2014. v. 26. p. 102 - 102.

PALM, M.; O'DONOGHUE, M. Update on photoprotection. *Dermatology therapy*. v. 20, p. 360-376, 2007.

Paolino, D.; LUCANIA, G.; MARDENTE, L.; ALHAIQUE, F.; FRESTA, M. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: in vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society,* v. 106, p. 99–110, 2005.

PARK, S. N.; LEE, H. J.; GU, H. A. Enhanced skin delivery and characterization of rutin-loaded ethosomes. *Korean Journal of Chemical Engineering*. v. 31. p. 485 – 489, 2014.

PARK, S. N.; LEE, H.J.; KIM, H.S.; PARK, M.A.; GU, H. A. Enhanced transdermal deposition and characterization of quercetin-loaded ethosomes. *Korean Journal of Chemical Engineering*. v. 30, p. 688-692, 2013.

PEDRIALI, C. A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. 127 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

POPIM, R. C.; CORRENTE, J. E.; MARINO, J. A. G.; SOUZA, C. A. de. Câncer de pele: uso de medidas preventivas e perfil demográfico de um grupo de risco na cidade de Botucatu. *Temas Livres*. p.1331-1336, 2008.

RAKESH, R.; ANOOP, K. R. Ethosomes for transdermal and topical drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical Science*, v. 4, p. 17-24, 2012.

RAWLINGS, A. V.; HARDING, C. R.; Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic Therapy*. v. 17. p. 43 – 48, 2004.

REICHLING, J.; LANDVATTER, U.; WAGNER, H.; KOSTKA, K.H.; SCHAEFER, U.F. In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy*. v. 64, p. 222-228, 2006.

SANDER, C. S.; CHANG, H.; HAMM, F.; ELSNER, P.; THIELE, J. J. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *International Journal of Dermatology*, v. 43, p.326-335, 2004.

SBD, Portal da Sociedade Brasileira de Dermatologia. Tipos de Câncer da Pele. Disponível em: < http://www. sbd.org.br/informacoes/sobre-o-cancer-da-pele/tipos-de-cancer-da-pele/>. Acesso em: 5 jan. 2015.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization Effect of Quercetin on the UV Filter Combination, Butyl Methoxydibenzoylmethane – Octyl Methoxycinnamate. *Photochemistry and Photobiology*. v. 86. p. 273 – 278, 2010.

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

SHAH, J. Analysis of permeation data: evaluation of lag time method. *International Journal of Pharmacy*, v. 90, p. 161-169, 1993.

SHEN, L. N.; ZHANG Y.T.; WANG, Q.; XU, L.; FENG, N. P.; Enhanced in vitro and in vivo skin deposition of apigenin delivered using ethosomes. *International Jounal of Pharmacy*, v. 460, p. 280-288, 2014.

SILVA W. J. M.; FERRARI C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v. 14, p. 441-451, 2011.

SOUZA, T.M.; SANTOS, L.E.; MOREIRA, R.R.D.; RANGEL, V.L.B.I. Avaliação da atividade fotoprotetora de Achillea millefolium L.(Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.15, p.36-38, 2005.

SPRINGSTEEN, A.; YUREK, R.; FRAZIER, M.; CARR, K. F. In vitro measurement of sunprotection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Analytica Chimica Acta*, v.380, p. 155-164, 1999.

TAVARES, G.D. Nanopartículas de poli (n-butil-cianoacrilato) revestidas com N,N,N-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade in vitro. 2013. 191 p. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

TOUITOU, E.; DAYAN, L.; BERGELSON, L.; GODIN, B.; ELIAZ, M. Ethosomes – novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of controlled release*. v.65, p.403-418, 1999.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. 21 CRF parts 201 and 310. Labeling and effectiveness testing; sunscreen drug products for over-the-counter human use; Final Rule. Silver Spring, 2011, v. 76, n. 117, 46 p.

VALENTA, C.; NOWACK, E.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Deoxycholate-hydrogels: novel drug carrier systems for topical use. *International Journal of Pharmaceutics*, v.185, p.103-111, 1999.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.;BABY, A.R. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.27, p.23-27, 2008.

VENKATESWARLU, I.; JAYASHANKAR-REDDY, V.; RAMESH, Y.; VISWANATHA-REDDY, M.; PRAVALLIKA, C.H.; SUNEETHA, K.C. A review on liposomes. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences,* v. 2, p. 739-751, 2011.

VERMA, D. D.; FAHR, A. Synergistic penetration enhancement effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporin A. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, v. 97, p. 55–66, 2004.

VIERL, U., LOBBERCKE, N.; NAGEL, N.; CEVC, G. Solute effects on the colloidal and phase-behavior of lipid bilayer-membranes – ethanol dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures. *Biophysical Journal*, v. 67, p. 1067-1079, 1994.

VIOLANTE, I. M. P.; DOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F. S.; SANTOS, R.A. N.; FERRARI, M. Estudo preliminar da atividade fotoprotetora in vitro de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 89, p.175-179, 2008.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine*, v. 36, p. 838-849, 2004.

WU, T.-H., YEN, F.-L., LIN, L.-T., TSAI, T.-R., LIN, C.-C., CHAM, T.-M. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v.346, p. 160-168, 2008.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. LWT - *Food Science and Technology*, v. 41, p. 1060–1066, 2008.

YOON, T. H.; KIM, I. H. Phosphatidylcholine isolation from egg yolk phospholipids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 949, p. 209–216, 2002.

ZILLICH, O. V.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; HASENKOPF, K.; EISNER, P.; KERSCHER, M. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *International journal of cosmetic Science*. v. 35. p. 491 – 501, 2013.

ZWIOREK, K. 2006. Gelatin nanoparticles as delivery system for nucleotide-based drugs. Tese de Doutorado - Faculdade de Química e Farmácia de Munique - Ludwig Maximilians-University, 226 p., 2006.

Anexos

ANEXOS

Anexo A: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

Anexo B: Currículo Lattes – Thalita Marcílio Cândido

Thalita Marcilio Candido

- **Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/8228296283534091**

Resumo informado pelo autor

Mestranda na área de Produção e Controle Farmacêuticos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Farmacêutica formada em julho de 2013 pela Faculdade de Farmácia da Universidade Presbiteriana Mackenzie - Campus Higienópolis. **(Texto informado pelo autor)**

Dados pessoais

Nome Thalita Marcilio Candido

Filiação Gercino Marcilio Candido e Maria Salete Candido

Nascimento 22/04/1988 - São Paulo/SP - Brasil

Carteira de Identidade 438878632 SSP - SP - 02/07/2005

CPF 370.304.928-62

Endereço residencial Rua Bernardo Correia Leitão
Parque Regina - Sao Paulo
05773-020, SP - Brasil
Telefone: 11 95321146

Endereço eletrônico
E-mail para contato : thalitamcandido@usp.br
e-mail alternativo : thalitamcandido@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2014 Mestrado em Farmácia.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF, Brasil
Título: Desenvolvimento e caracterização físico-química e funcional in vitro de etossomas contendo rutina de orientação de uso cosmético
Orientador: André Rolim Baby

2009 - 2013 Graduação em Farmácia.
Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Sao Paulo, Brasil
Título: Desenvolvimento de gel com nanopartículas de zidovudina constituídas de iso-butilcianoacrilato e revestidas por ácido hialurônico
Orientador: Marcelo Guimarães

Formação complementar

2012 - 2012 Extensão universitária em Análise Forense de DNA.
Renova Cursos, RENOVA CURSOS, Brasil

2011 - 2011 Extensão universitária em Francês - nível 2 Curso de Férias.
Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, FFLCH, Brasil

2010 - 2010 Extensão universitária em Francês - nível 1.
Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, FFLCH, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - FCF

Vínculo institucional

2012 - 2013

2. Universidade Presbiteriana Mackenzie - MACKENZIE

Vínculo institucional

2011 - 2011 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estudante Pesquisador , Carga horária: 6, Regime: Dedicação exclusiva

Projetos

Projetos de pesquisa

2012 - 2013 Desenvolvimento de gel com nanopartículas de zidovudina constituídas de iso-butilcianoacrilato e revestidas por ácido hialurônico

Descrição: A presente pesquisa teve por finalidade estudar a estabilidade de um gel base de Carbopol®, acrescido de nanopartículas de zidovudina, para ser empregado em estudos de permeação cutânea.
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1);
Integrantes: Thalita Marcilio Candido; Vladi Olga Consiglieri (Responsável)

2011 - 2011 Conyza bonariensis: Aspectos botânicos, avaliação de perfil químico, atividade antifúngica e toxicidade.

Descrição: O objetivo do projeto era averiguar qualitativamente e quantitativamente a capacidade antifúngica do óleo essencial extraído da espécie Conyza bonariensis.
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Thalita Marcilio Candido; Jan Carlo Morais Oliveira Bertassoni Delorenzi (Responsável)

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Espanhol Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Francês Compreende Razoavelmente , Lê Razoavelmente

Português Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2013 Melhor aluna do Curso de Bacharelado em Fármacia da Universidade Presbiteriana Mackenzie, Universidade Presbiteriana Mackenzie

Producão

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **CANDIDO, T. M.**, CONSIGLIERI, V. O.
Desenvolvimento de gel com nanopartículas de zidovudina constituídas de iso-butilcianoacrilato e revestidas por ácido hialurônico, 2013. (Relatório de pesquisa)

2. **CANDIDO, T. M.**, DELORENZI, J. C
Conyza bonariensis: aspectos botânicos, avaliação de perfil químico, atividade antifúngica e toxidade, 2011. (Relatório de pesquisa)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **9o Semana Acadêmica do Curso de Farmácia**, 2014. (Encontro)
Farmacêuticos mackenzistas no mercado de trabalho.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Mostra de trabalhos do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie**, 2013. (Encontro)
Desenvolvimento de gel com nanopartículas de zidomidina constituída de iso-butilcianoacrilato e revestidas por ácido hialurônico.

3. **XXI Semana de Recrutamento - Estagiários e Trainees**, 2013. (Outra)
.

4. **Curso de Análise Forense de DNA**, 2012. (Outra)
.

5. **Jornada da Educação - Anhanguera**, 2012. (Outra)
.

6. **Dia do Ensino Responsável**, 2012. (Outra)
.

7. **7a Semana Acadêmica de Fármacia**, 2012. (Outra)
.

8. **3o Roteiro Universitário**, 2012. (Outra)
.

9. **Visita técnica à divisão de Farmácia do Hospital das Clínicas**, 2012. (Outra)
.

10. **Visita técnica à Natura**, 2012. (Outra)
.

11. **Suplementos Alimentares**, 2011. (Outra)
.

12. **Nutricosméticos**, 2011. (Outra)
.

13. **Visita técnica à Fármacia Pharmactiva**, 2011. (Outra)
.

14. **Mackpesquisa**, 2011. (Simpósio)
.

15. **International Standing Conference for the History of Education**, 2011. (Congresso)
.

16. **Biotecnologia**, 2011. (Outra)
.

17. **V Semana de Farmácia da Universidade Presbiteriana Mackenzie**, 2010. (Outra)
.

18. **IV MOSTRA DE TGI DO CURSO DE FARMÁCIA**, 2009. (Outra)
.

19. **Palestra Farmácia Homeopática**, 2009. (Outra)
.

20. **Semana Nacional de Ciência e Tecnologia/Semana Científica do CCBS**, 2009. (Simpósio)
.

Totais de produção

Produção técnica	
Relatório de pesquisa	**2**

Eventos	
Participações em eventos (congresso)	**1**
Participações em eventos (simpósio)	**2**
Participações em eventos (encontro)	**2**
Participações em eventos (outra)	**15**

Anexo C: Ficha do Aluno – Thalita Marcílio Cândido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 7227958/1 - Thalita Marcilio Candido

Email:	thalitamcandido@usp.br
Data de Nascimento:	22/04/1988
Cédula de Identidade:	RG - 438878632 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmácia - Universidade Presbiteriana Mackenzie - São Paulo - Brasil - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	11/02/2014
Início da Contagem de Prazo:	11/02/2014
Data Limite para o Depósito:	11/08/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). André Rolim Baby - 11/02/2014 até o presente. Email: andrerb@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Catarina Batista Fialho Rosado - 03/12/2014 até o presente. Email: catarina.rosado@ulusofona.pt
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 11/02/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 27/03/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 11/02/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 03/02/2016

Impresso em: 05/07/2016 18:16:22

9139 - 7227958/1 - Thalita Marcilio Candido

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5777-3/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	13/02/2014	28/05/2014	45	3	93	A	N	Concluída
FBF5811-1/1	Utilização de Sistemas Biológicos In Vitro, Ex Vivo e In Vivo na Avaliação de Eficácia e Segurança de Fármacos, Medicamentos e Cosméticos	17/02/2014	30/03/2014	30	2	80	A	N	Concluída
FBF5779-2/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	03/04/2014	04/06/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5702-6/1	Formulação de Produtos Cosméticos e Cosmecêuticos	04/08/2014	07/09/2014	75	5	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBF5805-1/3	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	24/09/2014	28/10/2014	45	3	100	A	N	Concluída
EDM5791-7/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	10/03/2015	20/04/2015	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
PSA5866-4/6	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	10/03/2015	20/04/2015	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
NEC5719-3/1	Preparação Pedagógica	11/03/2015	29/04/2015	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	(Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)								
EDM5804-7/2	Tópicos de Epistemologia e Didática (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/03/2015	04/06/2015	120	8	95	A	N	Concluída
FBA5728-3/11	Aprimoramento Didático	14/04/2015	11/05/2015	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
QFL5714-7/1	Introdução à Análise Térmica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/08/2015	04/10/2015	90	6	97	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	33
Estágios:			
Total:	0	25	33

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 03/02/2016

Impresso em: 05/07/2016 18:16:22

Anexo D: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e caracterização físico-química e funcional in vitro e ex vivo de etossomas contendo rutina de uso dermocosmético

Pesquisador: André Rolim Baby

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44750715.5.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.141.850

Data da Relatoria: 29/06/2015

Apresentação do Projeto:

A proposta do projeto é o desenvolvimento e a caracterização físico-química e funcional in vitro e ex vivo de etossomas contendo rutina que é um flavonoide para aplicação dermocosmética. Os flavonoides são encontrados em abundância na natureza, em variedade de espécies vegetais, e apresentam capacidade antioxidante, assim, se tornam alternativa interessante como matéria-prima no desenvolvimento de novos cosméticos antioxidantes. A rutina, flavonoide escolhido como molécula bioativa para o desenvolvimento do presente projeto, apresenta baixa taxa de permeação cutânea. Para que os benefícios da atividade antioxidante da rutina possam ser aplicados à pele, se faz necessário que possibilitemos o aumento da taxa de permeação cutânea do flavonoide. Assim, a rutina será nanoestruturada e associada à uma formulação simples (gel) e, desta forma, espera-se observar a elevação significativa da taxa de penetração do flavonoide resultando em resposta antioxidante superior na pele. A rutina será nanoencapsulada na forma de etossomas de fostatidilcolina de gema de ovo por meio da técnica de dispersão mecânica seguida de nova hidratação de filme lipídico. As nanopartículas serão analisadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, taxa de encapsulação da rutina e atividade antirradicalar. As formulações serão desenvolvidas e avaliadas quanto ao valor de pH, viscosidade aparente e características organolépticas, assim como os testes

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

de eficácia antioxidante ex vivo e permeação cutânea ex vivo serão realizados no Laboratório do Departamento de Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos da pesquisa são:

(I) desenvolvimento de etossomas contendo rutina a partir da fosfatidilcolina de gema de ovo; (II) caracterização física, físico-química e funcional das nanopartículas; (III) avaliação da segurança das formulações in vivo, por meio dos ensaios de irritação cutânea primária, irritação cutânea acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação e fotossensibilização (IV) estudo in vivo da liberação da rutina livre e nanoestruturada (etossomas) e da atividade antioxidante pela técnica de tape stripping na pele de voluntários.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores declaram:

Riscos: todas as substâncias que compõem o produto são de uso habitual e consideradas seguras para a finalidade que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, ressaltamos que reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica do(s) produto(s) em teste, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.

Quanto à possível necessidade de tratamento de manchas após os testes em que será feita a irradiação da pele, a Dra. Leila David Bloch do Instituto IPClin, realizará e acompanhará esse tratamento após a finalização da pesquisa, caso seja necessário.

Benefícios: não haverá nenhum benefício financeiro e à saúde dos participantes, pois este é um produto cosmético. No entanto, a pesquisa pode ampliar o conhecimento sobre a segurança e eficácia de produtos cosméticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os ensaios in vivo serão realizados no IPClin – Instituto de Pesquisas Clínicas Integradas, localizado à Rua Evandro César Gnaccarini, 235 - Vila das Hortências - Jundiaí –SP, sob a responsabilidade da médica dermatologista e diretora do IPClin, Dra. Leila David Bloch. O IPClin presta serviço em pesquisa clínica, com realização de testes de segurança e eficácia de produtos

cosméticos. O Instituto de Pesquisas Clínicas Integradas tem à sua disposição dois laboratórios para atendimento dos voluntários das pesquisas, local adequado para armazenamento dos produtos em estudo conforme necessidade de cada formulação e recepção para primeiro atendimento aos voluntários, além de possuir todos os equipamentos específicos para a realização dos testes propostos in vivo por este projeto.Tais testes compreendem: irritação cutânea primária, irritação cutânea acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação e fotossensibilização.

Os ensaios ex vivo (permeação e atividade anti-oxidante) serão realizados no Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, localizada na Avenida Professor Lineu Prestes, n°580. O Laboratório de Cosmetologia encontra-se situado no bloco 15 da referida faculdade e apresenta todos os equipamentos necessários para execução dos testes previstos neste projeto, bem como um local adequado para receber cada um dos voluntários deste estudo.

Para a realização dos testes in vivo no Instituto IPclin, os participantes do estudo são selecionados por recrutadores profissionais quanto aos quesitos: residir, trabalhar ou estudar nas proximidades do local de realização da pesquisa.

Todas as informações contidas no TCLE serão lidas em voz alta para os voluntários e possíveis questionamentos serão esclarecidos pelos Pesquisadores, individualmente ou em grupos de até cinco voluntários, no primeiro dia de cada estudo. Haverá acompanhamento médico constante durante o estudo, pela pesquisadora responsável pelo mesmo, a Dra. Leila Bloch. Na ocorrência de reações adversas, o Instituto se responsabilizará por prestar e arcar com as despesas envolvendo atendimento, acompanhamento médico e fornecimento de medicamentos. Para o atendimento médico, os participantes serão levados ao Hospital conveniado ao estudo, com despesas cobertas pelo instituto. Para os ensaios ex vivo, a metodologia de recrutamento e execução, bem como o acompanhamento dos voluntários e todos os procedimentos descritos acima, serão seguidos da mesma forma. A única diferença

será o local de execução do teste, que também modificará o endereço dos participantes voluntários recrutados, visto que estes deverão residir, trabalhar ou estudar nas proximidades do local.

O pesquisador responsável, Prof. Dr. André Rolim Baby e a pesquisadora associada Thalita Marcillo Cândido serão responsáveis por prestar atendimento em casos de intercorrências, encaminhando e acompanhando os voluntários ao Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Os pesquisadores estarão disponíveis durante 24 horas, todos os dias, inclusive feriados e fins de semana. Tais informações estão presentes nas "versões 2" de todos os TCLEs corrigidos, assim

como os telefones de contato dos pesquisadores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos foram apresentados.

Recomendações:

Não há novas recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As inadequações foram corrigidas e as pendências foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser aprovado.

SAO PAULO, 07 de Julho de 2015

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

Anexo E: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os ensaios de Irritação Cutânea Primária, Irritação Cutânea Acumulada e Sensibilização Dérmica

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

1. Informações do Participante da Pesquisa (para preenchimento)

Nome: _____

Documento de Identidade (número): _____ Sexo: ( ) M ( ) F

Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: ___/ ___/ _____

Endereço: _____

Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone (residencial): _____ Telefone (celular): _____

2. Dados sobre a Pesquisa

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e caracterização físico-química e funcional in vitro e ex vivo de etossomas contendo rutina de uso dermocosmético

Pesquisador Responsável: Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033 - Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Associado: Thalita Marcílio Cândido / fone: (11) 5513-9647 e (11) 94882-8865 - Pesquisadora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Médico Dermatologista: Dra. Leila David Bloch / fone: (11) 4583-4444 e (11) 97030-2777 - Diretora Médica do IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Duração da Pesquisa: 5 semanas Risco da Pesquisa: Mínimo

Faixa etária dos participantes da pesquisa: de 18 a 60 anos

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o potencial irritante e/ou alergênico de produtos cosméticos antioxidantes. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

Para a realização deste estudo, você comparecerá ao Instituto de Pesquisa em dias pré-estabelecidos, durante cinco semanas. No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele por um médico dermatologista, com posterior aplicação de um adesivo, contendo o(s) produto(s) em teste, em suas costas.

Após dois dias de contato do(s) produto(s) com a pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e leitura das áreas de suas costas expostas ao(s) produto(s), com avaliação de possíveis reações de irritação primária.

Durante as três semanas seguintes, a etapa de aplicação (descrita acima) será repetida em dias pré-estabelecidos, com reaplicação do(s) produto(s) sempre no mesmo local de suas costas, por meio da troca do adesivo. A sua pele será avaliada a cada etapa de aplicação, para avaliação de possíveis reações de irritação acumulada.

Após o período de aplicação de três semanas, haverá um período de repouso de, no mínimo, 10 dias, onde nenhum adesivo será aplicado ou ficará em suas costas. Neste período, você não precisará comparecer ao Instituto em nenhum dia.

Após o período de repouso de 10 dias, você retornará ao Instituto para aplicação de um novo adesivo contendo o(s) mesmo(s) produto(s) em teste, em local virgem de suas costas (não utilizado anteriormente para aplicação de adesivos).

Finalmente, após dois dias de contato do produto com a sua pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e leitura das áreas de suas costas expostas ao produto, com avaliação de possíveis reações de sensibilização e/ou alergia.

Solicitamos que durante o período de estudo (incluindo três dias antes do início do ensaio e três dias após a sua finalização) você não altere seus hábitos de higiene, dieta, medicamentos, cosméticos e exercícios; não se exponha excessivamente ao sol; e não aplique qualquer produto no local de realização do teste.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

Todas as substâncias que compõem o produto são de uso habitual e consideradas seguras para a finalidade que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, ressaltamos que reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica do(s) produto(s) em teste, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.
Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista durante todas as etapas do estudo. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Evandro César Gnaccarini, 235, Vila das Hortências, Jundiaí / SP, CEP: 13209-410, telefone: (11) 4087-0092 (horário comercial) ou (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o **Hospital Santa Elisa** (Rua Sócrates Fernandes de Oliveira, 70, Chácara Urbana, Jundiaí / SP, CEP: 13201-838, telefone: (11) 4583-4444), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.

Você não obterá nenhum benefício financeiro e à sua saúde, pois este é um produto cosmético. No entanto, você estará ajudando, como participante desta pesquisa, a ampliar o conhecimento sobre a segurança e eficácia de produtos cosméticos. Garantimos que as suas despesas, decorrentes exclusivamente da participação nesta pesquisa, serão completamente ressarcidas.

Todas as informações obtidas e declaradas por você serão tratadas de maneira confidencial, sendo que apenas as pessoas diretamente ligadas a este estudo e autoridades legais poderão ter acesso, sem com isso, violar a confidencialidade. Se os resultados do estudo forem publicados, sua identidade continuará sendo preservada.

Você pode retirar sua participação a qualquer momento do estudo, comunicando sua desistência ao pesquisador responsável pelo seu acompanhamento, sem que isso acarrete qualquer consequência negativa a você.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____ _____

Assinatura do Participante de Pesquisa Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** da **Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP: 05508-000, telefones (11) 3091-3622 e (11) 3091-3677, e-mail: **cepfcf@usp.br**.

Anexo F: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os ensaios de Avaliação Antioxidante da Pele

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PELE

1. Informações do Participante da Pesquisa (para preenchimento)

Nome: _____

Documento de Identidade (número): _____ Sexo: ( ) M ( ) F

Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: ___ / ___ / _____

Endereço: _____

Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone (residencial): _____ Telefone (celular): _____

2. Dados sobre a Pesquisa

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e caracterização físico-química e funcional in vitro e ex vivo de etossomas contendo rutina de uso dermocosmético

Pesquisador Responsável: Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033 - Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Associado: Thalita Marcilio Cândido / fone: (11) 5513-9647 e (11) 94882-8865 - Pesquisadora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Médico Dermatologista: Dra. Leila David Bloch / fone: (11) 4583-4444 e (11) 97030-2777 - Diretora Médica do IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Duração da Pesquisa: 1 dia Risco da Pesquisa: Mínimo

Faixa etária dos participantes da pesquisa: de 18 a 60 anos

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante da pele (responsável pela prevenção de danos cutâneos causados pelos radicais livres) após a aplicação de produtos cosméticos antioxidantes. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PELE

Para a realização deste estudo, você comparecerá ao local da pesquisa em apenas um dia, permanecendo no local por um período de seis horas. Nesse dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele, com posterior aplicação do(s) produto(s) em teste em seu antebraço. Serão realizadas duas aplicações do(s) produto(s), sempre no mesmo local, com intervalos de duas horas entre cada aplicação.

Após duas horas da última aplicação, serão realizadas aplicações sucessivas de fitas adesivas, com o objetivo de remover a camada superficial da pele nas áreas de aplicação do(s) produto(s) em teste, com desconforto mínimo.

Adicionalmente, uma área virgem do antebraço (não utilizada para a aplicação do(s) produto(s) em teste) será utilizada como controle do estudo, e também receberá aplicações sucessivas de fitas adesivas, com o objetivo de remover a camada superficial da pele.

Após esta etapa, você poderá deixar as dependências do local da pesquisa. Os adesivos removidos serão posteriormente avaliados, por pesquisadores treinados, para determinação da atividade antioxidante natural da pele (área controle) e também da atividade antioxidante da pele após tratamento com o(s) cosmético(o) antioxidante(s) (áreas de aplicação).

Solicitamos que durante o período de estudo (incluindo três dias antes do início do ensaio e três dias após a sua finalização) você não altere seus hábitos de higiene, dieta, medicamentos, cosméticos e exercícios; não se exponha excessivamente ao sol; e não aplique qualquer produto no local de realização do teste.

Todas as substâncias que compõem o produto são de uso habitual e consideradas seguras para a finalidade que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, ressaltamos que reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica do(s) produto(s) em teste, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.
Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista durante todas as etapas do estudo. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Evandro César Gnaccarini, 235, Vila das Hortências, Jundiaí / SP, CEP: 13209-410, telefone: (11) 4087-0092 (horário comercial) ou (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PELE

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o **Hospital Santa Elisa** (Rua Sócrates Fernandes de Oliveira, 70, Chácara Urbana, Jundiaí / SP, CEP: 13201-838, telefone: (11) 4583-4444), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.

Você não obterá nenhum benefício financeiro e à sua saúde, pois este é um produto cosmético. No entanto, você estará ajudando, como participante desta pesquisa, a ampliar o conhecimento sobre a segurança e eficácia de produtos cosméticos. Garantimos que as suas despesas, decorrentes exclusivamente da participação nesta pesquisa, serão completamente ressarcidas.

Todas as informações obtidas e declaradas por você serão tratadas de maneira confidencial, sendo que apenas as pessoas diretamente ligadas a este estudo e autoridades legais poderão ter acesso, sem com isso, violar a confidencialidade. Se os resultados do estudo forem publicados, sua identidade continuará sendo preservada.

Você pode retirar sua participação a qualquer momento do estudo, comunicando sua desistência ao pesquisador responsável pelo seu acompanhamento, sem que isso acarrete qualquer consequência negativa a você.

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____ _____

Assinatura do Participante de Pesquisa Assinatura do Pesquisador Responsável

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PELE

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP: 05508-000, telefones (11) 3091-3622 e (11) 3091-3677, e-mail: **cepfcf@usp.br**.

Anexo G: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os ensaios de Avaliação da Permeação Cutânea

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA

1. Informações do Participante da Pesquisa (para preenchimento)

Nome: _____

Documento de Identidade (número): _____ Sexo: ( ) M ( ) F

Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: ___ / ___ / _____

Endereço: _____

Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone (residencial): _____ Telefone (celular): _____

2. Dados sobre a Pesquisa

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e caracterização físico-química e funcional in vitro e ex vivo de etossomas contendo rutina de uso dermocosmético

Pesquisador Responsável: Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033 - Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Associado: Thalita Marcílio Cândido / fone: (11) 5513-9647 e (11) 94882-8865 - Pesquisadora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Médico Dermatologista: Dra. Leila David Bloch / fone: (11) 4583-4444 e (11) 97030-2777 - Diretora Médica do IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Duração da Pesquisa: 1 dia Risco da Pesquisa: Mínimo

Faixa etária dos participantes da pesquisa: de 18 a 60 anos

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar a permeação cutânea após a aplicação de produtos cosméticos antioxidantes. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Para a realização deste estudo, você comparecerá ao local da pesquisa em apenas um dia, permanecendo no local por um periodo de seis horas. Nesse dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele, com posterior aplicação do(s) produto(s) em teste em seu antebraço. Serão realizadas duas aplicações do(s) produto(s), sempre no mesmo local, com intervalos de duas horas entre cada aplicação.

Após duas horas da última aplicação, serão realizadas aplicações sucessivas de fitas adesivas, com o objetivo de remover a camada superficial da pele nas áreas de aplicação do(s) produto(s) em teste, com desconforto mínimo.

Adicionalmente, uma área virgem do antebraço (não utilizada para a aplicação do(s) produto(s) em teste) será utilizada como controle do estudo, e também receberá aplicações sucessivas de fitas adesivas, com o objetivo de remover a camada superficial da pele.

Após esta etapa, você poderá deixar as dependências do local da pesquisa. Os adesivos removidos serão posteriormente avaliados, por pesquisadores treinados, para determinação da permeação cutânea do(s) componente(s) ativo(s) contido(s) no(s) cosmético(o) antioxidante(s) aplicado (s) (áreas de aplicação).

Solicitamos que durante o periodo de estudo (incluindo três dias antes do início do ensaio e três dias após a sua finalização) você não altere seus hábitos de higiene, dieta, medicamentos, cosméticos e exercícios; não se exponha excessivamente ao sol; e não aplique qualquer produto no local de realização do teste.

Todas as substâncias que compõem o produto são de uso habitual e consideradas seguras para a finalidade que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, ressaltamos que reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica do(s) produto(s) em teste, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.
Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista durante todas as etapas do estudo. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Evandro César Gnaccarini, 235, Vila das Hortências, Jundiaí / SP, CEP: 13209-410, telefone: (11) 4087-0092 (horário comercial) ou (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o **Hospital Santa Elisa** (Rua Sócrates Fernandes de Oliveira, 70, Chácara Urbana, Jundiaí / SP, CEP: 13201-838, telefone: (11) 4583-4444), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

IPclin
PESQUISA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Você não obterá nenhum benefício financeiro e à sua saúde, pois este é um produto cosmético. No entanto, você estará ajudando, como participante desta pesquisa, a ampliar o conhecimento sobre a segurança e eficácia de produtos cosméticos. Garantimos que as suas despesas, decorrentes exclusivamente da participação nesta pesquisa, serão completamente ressarcidas.

Todas as informações obtidas e declaradas por você serão tratadas de maneira confidencial, sendo que apenas as pessoas diretamente ligadas a este estudo e autoridades legais poderão ter acesso, sem com isso, violar a confidencialidade. Se os resultados do estudo forem publicados, sua identidade continuará sendo preservada.

Você pode retirar sua participação a qualquer momento do estudo, comunicando sua desistência ao pesquisador responsável pelo seu acompanhamento, sem que isso acarrete qualquer consequência negativa a você.

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____ _____

Assinatura do Participante de Pesquisa Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP: 05508-000, telefones (11) 3091-3622 e (11) 3091-3677, e-mail: **cepfcf@usp.br**.

Anexo H: Artigos Científicos submetidos para publicação, em avaliação

05/07/2016 Gmail - Receipt - Trab002-16 - BJPS

Gmail

Thalita Candido <thalitamcandido@gmail.com>

Receipt - Trab002-16 - BJPS

BJPS <bjps@usp.br> 5 de janeiro de 2016 16:17
Para: Thalita Candido <thalitamcandido@gmail.com>

Dear author,

We are sending you enclosed the receipt of the article received for analysis by Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.
When you need informations about it, please send us a message with the register number found in the the document.
We ask you to send us the name of **four specialists as suggestions of reviewers, with the eletronic address** to be included in our Reviewer's Data Basis.
We are very proud in receiving the article.
Sincerely yours.

Leila R. de Carvalho Aranha
Executive Editor

BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

RECEIPT

Register number: 002/16

The **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences received the article's submission:**

Authors: Fabiana Graziola, Thalita Marcílio Candido, Camila Areias de Oliveira, Daniela D'Almeida Peres, Michele Georges Issa, Joana Mota, Catarina Rosado, Vladi Olga Consiglieri, Telma Mary Kaneko, Maria Valéria Robles Velasco, André Rolim Baby

Title: "**Gelatin-based microspheres crosslinked with glutaraldehyde or rutin oriented to dermocosmetic application**"

São Paulo, 04th. January 2016.

Profa. Elizabeth Igne Ferreira

Scientific Editor

Gmail Thalita Candido <thalitamcandido@gmail.com

Fwd: Drug Development and Industrial Pharmacy - Manuscript ID LDDI-2016-016

André Rolim Baby <andrerb@usp.br> 16 de março de 2016 18:
Para: Daniela Peres Peres <dani_aperes@hotmail.com>, Maíra Bueno Ariede <maariede@gmail.com>, Thalita USP <thalitamcandido@gmail.com>, tania.almeida@ulusofona.pt, Felipe Rebello Lourenço <feliperl@usp.br>, Vladi Olga Consiglieri <siglieri@usp.br>, Telma <tsakuda@usp.br>, Maria Valéria Valéria <mvrobles@usp.br>

Meus caríssimos amigos,
Com satisfação, envio a notificação de que nosso artigo foi submetido para análise da DDIP.
Torcida mil!
Forte abraço!

Begin forwarded message:

From: kristin.fathe@austin.utexas.edu
Subject: Drug Development and Industrial Pharmacy - Manuscript ID LDDI-2016-0162
Date: March 16, 2016 at 18:06:02 GMT-3
To: andrerb@usp.br

16-Mar-2016

Dear Dr Baby:

Your manuscript entitled "Quality by Design (QbD), Process Analytical Technology (PAT) and Design of Experiment Applied to the Development of Multifunctional Sunscreens" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Drug Development and Industrial Pharmacy.

Your manuscript ID is LDDI-2016-0162.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at https://mc.manuscriptcentral.com/lddi and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to https://mc.manuscriptcentral.com/lddi.

Drug Development and Industrial Pharmacy offers an optional FastTrack publication service, with a submission to online publication timeline of 5–7 weeks (subject to 1–2 week author revision following initial peer review and prompt turnaround of proofs). The fee for this service is £5,500/$8,525/€7,700. If you would like to opt for the FastTrack publication service or would like to know more about it, please contact the Managing Editor, Charles Whalley (Charles.Whalley@tandf.co.uk), as soon as possible.

If you have already chosen the FastTrack service, you will receive further details regarding this shortly.

Please also note that all manuscripts (whether or not they are prioritised) are subject to strict and rigorous peer review. Acceptance for publication is solely dependent on the peer-review outcome.

Please be aware that your paper may be sent to CrossCheck for a plagiarism check. For more information please visit: http://informahealthcare.com/page/CrossCheck

Thank you for submitting your manuscript to Drug Development and Industrial Pharmacy.

Sincerely,
Drug Development and Industrial Pharmacy Editorial Office