



ANÁLISE DE PROCESSOS DE NANOENCAPSULAMENTO DE FILTROS SOLARES

Thamiris Franckini Paiva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(es): José Carlos Costa da Silva Pinto
Príamo Albuquerque Melo Jr.

Rio de Janeiro
Março de 2015

ANÁLISE DE PROCESSOS DE NANOENCAPSULAMENTO DE FILTROS
SOLARES

Thamiris Franckini Paiva

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

Prof. Príamo Albuquerque Melo Jr., D.Sc.

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Prof. Carlos Rangel Rodrigues, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO DE 2015

Paiva, Thamiris Franckini

Análise de Processos de Nanoencapsulamento de Filtros Solares/ Thamiris Franckini Paiva. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

XX, 102 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Príamo Albuquerque Melo Jr.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 86-98.

1. Fotoproteção. 2. Sistemas de Nanoencapsulamento. 3. Miniemulsão. 4. Lipossomas. 5. Nanoemulsão. I. Pinto, José Carlos Costa da Silva *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos professores José Carlos Pinto e Príamo Albuquerque pela oportunidade, orientação, confiança e incentivo durante todo o trabalho da tese.

Aos meus pais, irmão, primos e primas pela força e apoio em mais esta conquista, pelo carinho e compreensão pelas horas dedicadas ao mestrado e que faltaram no nosso convívio familiar.

Às minhas lindas crianças (Enzo, Duda, Manu e Kiara) que me proporcionaram momentos de fofuras e alegrias.

À minha grande amiga Evelyn por estar sempre presente, muitas vezes acreditando em mim em momentos em que eu mesma duvidava. Juntas aprendemos que família vai muito além de laços de sangue.

Aos novos amigos conquistados no LMSCP: Maíra, Rayany, Luciana, Gustavo, Izabela, Débora Way, Martina, Fred, Mariele e Débora Vaz por compartilhar o conhecimento, pela ajuda, pelas inúmeras conversas e principalmente pelas incontáveis risadas. Sou imensamente grata a todos!

Às técnicas Rhana, Larissa e Nathalie pela colaboração e ajuda nas análises, além de garantir bons momentos de alegria.

À Natasha e Paulinha pela ajuda nas compras dos materiais.

Aos amigos conquistados ao longo do mestrado, em especial a Gobério, Dorival, Jimes, Rafael e Mari por não medirem esforços em me ajudar nos momentos de desespero, pelos momentos de alegria e por fazerem esses dois últimos anos serem imensamente especiais!

À Raquel Braga por me ensinar a trabalhar com lipossomas.

Ao INMETRO, em especial à Ana Gadelha, pela realização das análises de criofratura.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (PEMM/COPPE) pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Grupo de Fenômenos Interfaciais (GRIFIT) por permitir o uso do espectrofotômetro UV/VIS.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação de mestrado.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ANÁLISE DE PROCESSOS DE NANOENCAPSULAMENTO DE FILTROS SOLARES

Thamiris Franckini Paiva

Março/2015

Orientador(es): José Carlos Costa da Silva Pinto

Príamo Albuquerque Melo Jr.

Programa: Engenharia Química

O uso de protetores solares é fundamental, dado que a exposição excessiva à radiação solar pode causar danos irreparáveis à pele (levando ao câncer). Técnicas de nanotecnologia, quando aplicadas nas formulações fotoprotetoras, garantem maior tempo de permanência dos filtros solares nas camadas mais externas da pele, aumentando a eficácia e segurança. Dessa forma, os sistemas de inclusão (lipossomas, nanoemulsões e miniemulsões) foram estudados de forma a comparar os desempenhos em relação a várias das propriedades das nanopartículas usadas para o encapsulamento dos filtros solares (avobenzona e benzofenona-3). Os resultados indicaram que foi possível obter, de forma satisfatória, via polimerização em miniemulsão, nanopartículas poliméricas com tamanho adequado para a aplicação desejada. Além disso, esses sistemas apresentaram eficiências de encapsulamento próximas a 100 %. Por outro lado, os lipossomas multilamelares, obtidos via hidratação do filme lipídico, apresentaram comportamento instável, apresentando tamanhos médios superiores a 1 μm e eficiências de encapsulamento abaixo de 50 %. Por fim, as nanoemulsões não foram obtidas de forma aceitável, resultando em separação de fases em no máximo uma hora depois de seu preparo.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

ANALYSIS OF NANOENCAPSULATION PROCESSES OF SUNSCREENS

Thamiris Franckini Paiva

March/2015

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Príamo Albuquerque Melo Jr.

Department: Chemical Engineering

The use of sunscreen is essential, given that excessive exposure to solar radiation can cause irreparable damage to the skin (inducing cancer). Nanotechnology techniques, when applied in photoprotective formulations, can ensure longer permanence of sunscreens in the external layers of the skin, increasing efficiency and safety of the application. Therefore, the inclusion systems (liposomes, nanoemulsions and miniemulsions) were studied and compared in terms of the properties of the nanoparticles used for encapsulation of sunscreens (avobenzene and benzophenone-3). The results indicated that it was possible to obtain polymer nanoparticles with a suitable size for the desired application through miniemulsion polymerization. Moreover, these systems showed encapsulation efficiencies close to 100 %. On the other hand, multilamellar liposomes, obtained through hydration of the lipid film, showed unstable behavior, with average particle sizes greater than 1 μm and encapsulation efficiencies below 50 %. Finally, nanoemulsions were not obtained with the acceptable stability, since phase separation was observed at most one hour after preparation.

Índice

<i>Capítulo I</i>	1
Introdução	1
1.1 Motivação.....	1
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivos específicos	4
1.3 Estrutura da dissertação.....	5
<i>Capítulo II</i>	6
Revisão Teórica e Bibliográfica.....	6
2.1 Radiação Solar.....	6
2.1 Sistemas Naturais de Proteção	7
2.2 Fotoproteção.....	8
2.3.1 Fator de Proteção Solar	10
2.3.2 Filtros Solares em Estudo	11
2.3.3 Absorção Sistêmica dos Filtros Solares	13
2.3 Nanotecnologia.....	14
2.4.1 Lipossomas.....	16
2.4.2 Nanoemulsão.....	22
2.4.2.1 Obtenção de nanopartículas poliméricas via polimerização em miniemulsão	27
2.4.2.2 Uso de biopolímeros nas nanoemulsões.....	31
2.4 Comentários Finais.....	33
<i>Capítulo III</i>	34
Materiais e Métodos.....	34
3.1 Materiais.....	34
3.1.1 Lipossomas Multilamelares	34
3.1.2 Nanoemulsão de Quitosana.....	36
3.1.3 Nanopartículas Poliméricas de PMMA.....	37
3.2 Métodos.....	39

3.2.1	Reações	39
3.2.1.1	Lipossomas Multilamelares	39
3.2.1.2	Nanoemulsão de Quitosana	42
3.2.1.3	Nanopartículas poliméricas de PMMA	43
3.2.2	Caracterização	45
3.2.2.1	Análise Termogravimétrica (TGA)	45
3.2.2.2	Eficiência de Encapsulamento.....	45
3.2.2.3	Distribuição de Tamanhos de Partículas	46
3.2.2.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	47
3.2.2.5	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	47
3.2.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
3.2.2.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão - Criofratura.....	48
<i>Capítulo IV</i>		50
Resultados e Discussão		50
4.1	Caracterização dos Filtros Solares	50
4.1.1	Estabilidade Térmica.....	50
4.1.2	Curvas de Calibração	51
4.2	Lipossomas Multilamelares	53
4.2.1	Eficiência de Encapsulamento	54
4.2.2	Distribuição de Tamanhos de Partícula.....	56
4.2.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (Criofratura).....	61
4.3	Nanoemulsão de Quitosana.....	63
4.4	Nanopartículas Poliméricas de PMMA.....	72
4.4.1	Distribuição de Tamanhos de Partículas	73
4.4.2	Eficiência de Encapsulamento	74
4.4.3	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	75
4.4.4	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	77
4.4.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	79
4.5	Estudo Comparativo	80
<i>Capítulo V</i>		83
Conclusões		83
5.1	Conclusões	83

5.2 Sugestões para trabalhos futuros	84
<i>Capítulo VI</i>	86
Referências Bibliográficas	86
<i>Apêndice A</i>	99
<i>Apêndice B</i>	100

Lista de Figuras

Figura 1.1: Representação esquemática da incidência da radiação ultravioleta na Terra.	1
Figura 2.1: Estrutura química do ácido urocânico.....	8
Figura 2.2: Estrutura química da avobenzona.	12
Figura 2.3: Estrutura química da benzofenona-3.....	13
Figura 2.4: Estrutura dos lipossomas.....	17
Figura 2.5: Estrutura química do fosfolipídio.	18
Figura 2.6: Estrutura química do colesterol.....	18
Figura 2.7: Formação dos lipossomas multilamelares pelo método de hidratação do filme lipídico (LASIC <i>et al.</i> , 1988).....	20
Figura 2.8: Estrutura das emulsões óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2004).....	22
Figura 2.9: Diagrama de energia livre das nanoemulsões (adaptado de MCCLEMENTS <i>et al.</i> (2012)).	24
Figura 2.10: Representação das nanocápsulas e nanoesferas poliméricas, em que o fármaco em: (a) está dissolvido no núcleo oleoso; (b) está adsorvido à parede polimérica; (c) está retido na matriz polimérica; e em (d) adsorvido à superfície da matriz polimérica (SCHAFFAZICK <i>et al.</i> , 2003).....	28
Figura 2.11: Representação esquemática da reação de polimerização do MMA.....	29
Figura 2.12: Esquema da polimerização em miniemulsão (adaptado de LANDFESTER <i>et al.</i> (2010)).	30
Figura 2.13: Estrutura química da quitosana.	32

Figura 3.1: Roteiro esquemático do procedimento experimental de preparo dos lipossomas.	41
Figura 3.2: Roteiro esquemático do procedimento experimental usado para preparação das nanoemulsões.	43
Figura 3.3: Roteiro esquemático do procedimento experimental usado para preparação das nanopartículas poliméricas.	44
Figura 4.1: Análise termogravimétrica da avobenzona.	51
Figura 4.2: Análise termogravimétrica da benzofenona-3.	51
Figura 4.3: Curva de calibração do filtro solar avobenzona, usando etanol como solvente. ...	52
Figura 4.4: Curva de calibração do filtro solar benzofenona-3, usando etanol como solvente.	52
Figura 4.5: Efeito do tempo de hidratação na análise das distribuições de tamanho de partículas dos lipossomas.	57
Figura 4.6: Efeito do tempo de hidratação na análise das distribuições de tamanho de partículas dos lipossomas carregados com AVO.	58
Figura 4.7: Efeito do tempo de hidratação na análise das distribuições de tamanho de partículas dos lipossomas carregados com BZ.	59
Figura 4.8: Imagens obtidas a partir de análises de microscopia eletrônica de transmissão com criofatura do lipossoma antes da etapa de filtração, sendo (A) uma visão geral da amostra e (B e C) a visão de uma única vesícula.	62
Figura 4.9: Imagens obtidas a partir de análises de microscopia eletrônica de transmissão com criofatura do lipossoma uma semana depois de realizada a etapa de filtração.	63
Figura 4.10: Análise visual da amostra NE-AVO 1° teste: (A) imediatamente após o preparo; (B) após 15 minutos em repouso.	64

Figura 4.11: Análise de distribuição de tamanhos de partícula para a amostra NE-AVO 1° teste imediatamente após o preparo.	65
Figura 4.12: Análise visual da amostra NE-AVO 2° teste: (A) imediatamente após o preparo; (B) após 60 minutos em repouso.	66
Figura 4.13: Análise de distribuição de tamanhos de partícula para amostra NE-AVO 2° teste, imediatamente após o preparo.	66
Figura 4.14: Análise de distribuição de tamanhos de partícula para amostra NE-AVO 3° teste, imediatamente após o preparo.	68
Figura 4.15: Análise visual da amostra NE-AVO 3° teste: (A) imediatamente após o preparo; (B) após 3 horas em repouso.	68
Figura 4.16: Análise visual comparativa entre as amostras NE-AVO 2° teste (imagens superiores) e NE-AVO 3° teste (imagens inferiores) ao longo do tempo.	69
Figura 4.17: Análise comparativa da evolução das distribuições de tamanho de partícula das amostras NE-AVO 2° teste e 3° teste, após agitação.	70
Figura 4.18: Curva de aquecimento das nanoemulsões durante a etapa de dispersão sem o uso do banho de gelo.	71
Figura 4.19: Distribuição de tamanhos de partícula para a nanopartícula NP-AVO ao longo do tempo.	74
Figura 4.20: Distribuição de tamanhos de partícula para a nanopartícula NP-BZ ao longo do tempo.	74
Figura 4.21: Termogramas de DSC dos filtros solares avobenzona e benzofenona-3.	76
Figura 4.22: Termogramas de DSC das amostras PMMA, NP-AVO e NP-BZ.	77
Figura 4.23: Distribuições de massas molares das amostras PMMA, NP-AVO e NP-BZ.	78
Figura 4.24: Micrografia da amostra NP-AVO.	79

Figura 4.25: Micrografia da amostra NP-BZ.....	80
Figura A.1: Espectro de absorção do filtro solar avobenzona.....	99
Figura A.2: Espectro de absorção do filtro solar benzofenona-3.....	99
Figura B.1: Espectro de absorção da amostra LIPO 01.....	100
Figura B.2: Espectro de absorção da amostra LIPO 02.....	100
Figura B.3: Espectro de absorção da amostra LIPO 03.....	101
Figura B.4: Espectro de absorção da amostra LIPO 04.....	101
Figura B.5: Espectro de absorção das nanopartículas poliméricas puras (PMMA).....	102

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Exemplos de filtros solares e suas respectivas concentrações máximas (adaptado de ANVISA, 2006).....	9
Tabela 2.2: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda (MANSUR <i>et al.</i> , 1986).....	11
Tabela 2.3: Exemplos de formulações lipossomais no mercado farmacêutico (adaptado de FAN <i>et al.</i> , 2013).....	16
Tabela 2.4: Relação entre a faixa de EHL e a aplicação dos tensoativos (MYERS, 2006; FLORENCE, 2003).....	23
Tabela 3.1: Receita experimental usada para o preparo dos lipossomas multilamelares pelo método de hidratação do filme lipídico.	40
Tabela 3.2: Receita experimental usada para o preparo da nanoemulsão.	42
Tabela 3.3: Receita experimental usada para o preparo das nanopartículas de PMMA via polimerização em miniemulsão.	43
Tabela 4.1: Relação dos lipossomas multilamelares preparados.....	53
Tabela 4.2: Eficiência de encapsulamento dos filtros solares no processo de preparação dos lipossomas multilamelares.....	54
Tabela 4.3: Tamanhos médios dos lipossomas.....	60
Tabela 4.4: Tamanhos médios dos lipossomas carregados com avobenzona e benzofenona-3.	60
Tabela 4.5: Relação das nanoemulsões preparadas.....	64
Tabela 4.6: Relação das nanopartículas poliméricas preparadas.....	72

Tabela 4.7: Eficiência de encapsulamento dos ativos nas nanopartículas poliméricas.	75
Tabela 4.8: Massas molares médias e índices de polidispersão das nanopartículas.....	78
Tabela 4.9: Estimativa de custo dos reagentes para os sistemas de nanoencapsulamento.	82
Tabela 4.10: Estimativa de custo das formulações preparadas.....	83

Índice de Siglas

Sigla	Nome
A/O	Água em óleo
Abs _λ	Absorbância no comprimento de onda (λ)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVO	Avobenzona
BZ	Benzofenona-3
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> (Espalhamento dinâmico de luz)
DME	Dose mínima eritematosa
DMP	Dose mínima pigmentária
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EE _λ	Efeito eritematogênico da radiação
EPI	<i>Emulsion phase inversion</i> (Emulsificação por inversão de fases)
FC	Fator de correção
FPS	Fator de proteção solar
FP-UVA	Fator de proteção UVA
GPC	Cromatografia de permeação em gel
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade
IP	Índice de polidispersão
I _λ	Intensidade da radiação no comprimento de onda λ
LIPO	Lipossoma
LSS	Lauril sulfato de sódio
LUV	<i>Large unilamellar vesicles</i> (Vesículas unilamelares grandes)

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MLV	<i>Multilamellar vesicles</i> (Vesículas multilamelares)
MMA	Metacrilato de metila
Mn	Massa molar numérica média
Mw	Massa molar ponderal média
NE	Nanoemulsão
nm	Nanômetro
NP	Nanopartícula polimérica
O/A	Óleo em água
PIT	<i>Phase inversion temperature</i> (Inversão de fases pela temperatura)
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
SUV	<i>Small unilamellar vesicles</i> (Vesículas unilamelares pequenas)
TGA	Análise termogravimétrica
THF	Tetrahidrofurano
TRIS	Tris (hidroximetil amino metano)
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
λ	Comprimento de onda

Capítulo I

Introdução

1.1 Motivação

A radiação solar que chega à superfície terrestre é formada basicamente por três tipos de radiações eletromagnéticas: radiação infravermelho (> 780 nm), visível (400-780 nm) e ultravioleta (100-400 nm) (BALOGH *et al.*, 2011). A radiação ultravioleta é usualmente dividida em radiação UVA (320 a 400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (100-290 nm) (ANTONIOU *et al.*, 2008; FLOR *et al.*, 2007). Apesar da radiação ultravioleta (UV) ser a menos incidente na superfície terrestre na faixa considerada, é a que exerce maior impacto na saúde humana, por apresentar ondas eletromagnéticas de menor comprimento de onda, capazes de provocar alterações químicas nas moléculas (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

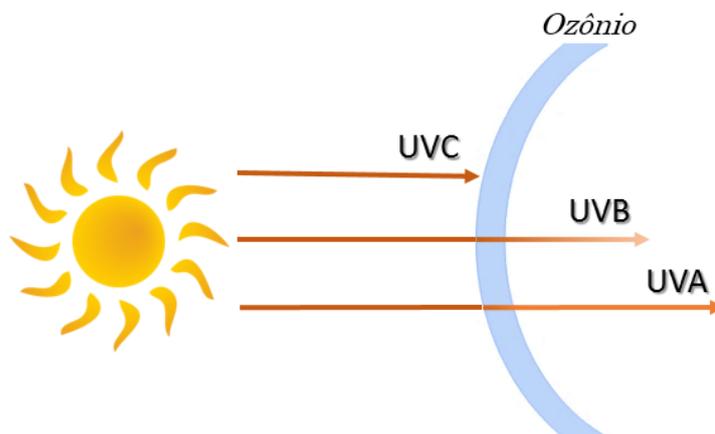


Figura 1.1: Representação esquemática da incidência da radiação ultravioleta na Terra.

A exposição moderada à radiação ultravioleta (UV) apresenta efeitos benéficos para a saúde. É sabido que, entre esses efeitos benéficos, pode-se citar a sensação de bem-estar físico

e mental, o estímulo à produção de melanina e a produção da vitamina D3. Além disso, a exposição regular à radiação UV, quando em conjunto com alguns medicamentos, pode ser usada para o tratamento de determinadas doenças dermatológicas (BALOGH *et al.*, 2011; FLOR *et al.*, 2007).

Por outro lado, sem os devidos cuidados, a radiação UV pode ser responsável por sérios danos ao organismo. Ao atingir a pele desprotegida, a radiação UV pode ser absorvida por diversas moléculas na pele, resultando em alterações químicas. Tais alterações podem levar desde a simples inflamações até graves queimaduras. Há ainda a possibilidade de ocorrerem mutações genéticas e comportamentos anormais das células (FLOR *et al.*, 2007).

Diante disso, os protetores solares são amplamente recomendados como uma medida preventiva contra os raios ultravioletas. A conscientização da população frente a estes problemas vem resultando no aumento do uso dessas formulações cosméticas (GONZÁLEZ *et al.*, 2008). Nesse sentido, tem havido uma busca permanente por formulações de melhor eficiência de proteção, maior estabilidade química e mais acessíveis à população.

De um filtro solar é normalmente desejável que ele cubra e proteja a pele, permanecendo nas camadas superiores do tecido cutâneo (estrato córneo), não ocorrendo a absorção sistêmica (HENRIQUES, 2008; LORCA, 2012). Contudo, estudos *in vitro* e *in vivo* publicados já mostraram que certos filtros são absorvidos através da pele humana após aplicação tópica (HAYDEN *et al.*, 1997; JANJUA *et al.*, 2004; SCHLUMPF *et al.*, 2004).

Desse modo, técnicas de nanotecnologia, compreendidas como as técnicas que envolvem ao menos uma dimensão na faixa de 1 a 300 nm, para justificar a aplicação pretendida, mostra-se como uma ferramenta promissora para o segmento dos cosméticos dermatológicos (BAILO *et al.*, 2012; DAUDT *et al.*, 2013). A nanoencapsulação permite o aumento da estabilidade, garantindo a proteção dos ativos quanto à degradação física, química ou biológica, e ainda, permite a liberação controlada dos ativos. No que diz respeito aos filtros solares, essa técnica ainda atua retendo os compostos ativos nas camadas mais externas da pele, local preferencial de atuação (DAUDT *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Nesse contexto, os sistemas nanoestruturados mais utilizados para encapsulamento e liberação controlada de filtros solares são as nanoemulsões, nanoesferas, nanocápsulas,

lipossomas e nanopartículas lipídicas (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; DAUDT *et al.*, 2013). Dentre estes, os lipossomas são vesículas esféricas formadas por bicamadas lipídicas em torno de um núcleo aquoso. Essas estruturas merecem destaque por serem capazes de carregar substâncias hidrofílicas ou lipofílicas, não sendo tóxicas e nem invasivas. Lipossomas são formados espontaneamente quando os lipídios entram em contato com a fase aquosa, podendo gerar pequenas e grandes vesículas unilamelares (uma bicamada lipídica concêntrica) e multilamelares (várias bicamadas concêntricas) (BHAI *et al.*, 2012). Diversos produtos baseados nos lipossomas já podem ser encontrados no mercado como por exemplo o Doxil e Ambisome, como mostrado por TORCHILIN *et al.* (2005).

Outro sistema que tem bastante notoriedade na área cosmética são as nanoemulsões, que usualmente mostram-se mais estáveis que os lipossomas (TADROS *et al.*, 2005) e também permitem o aumento da hidratação da pele e de sua elasticidade (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; DAUDT *et al.*, 2013). Estas estruturas são compostas por uma fase aquosa, uma fase oleosa e pelo surfactante, podendo ser formadas nanoemulsões de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). Ao contrário dos lipossomas, as nanoemulsões não são termodinamicamente estáveis, requerendo energia para que ocorra a formação. Os métodos que utilizam dispositivos mecânicos para gerar alta tensão de cisalhamento são os chamados métodos de alta energia de emulsificação e são conhecidos por resultar em um melhor controle de granulometria das nanoemulsões (SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004).

Por outro lado, diversos grupos de pesquisa têm utilizado nanopartículas poliméricas como sistemas de liberação de ativos para aplicações na pele (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; LORCA *et al.*, 2012; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Estes sistemas podem ser formados como nanoesferas ou nanocápsulas, diferindo entre si quanto à organização estrutural. As nanocápsulas poliméricas consistem de um núcleo interno fluido envolvido por uma parede polimérica rígida, de maneira que o ativo pode estar dissolvido no fluido ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas, por sua vez, são formadas por uma matriz polimérica compacta, em que o ativo pode estar adsorvido à superfície ou dissolvido na matriz (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001). Quando obtidas via polimerização em miniemulsão, cada gota de monômero funciona como um nano-reator, constituindo como os locais das reações de polimerização (FONSECA *et al.*, 2013; LORCA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A despeito dos muitos estudos existentes nessa área, é curioso observar que não existem estudos comparativos entre os diferentes processos usados para encapsulamento de compostos bioativos (e, por exemplo, de filtros solares). Contudo, parece claro que a escolha tecnicamente embasada do processo de encapsulamento requer a análise comparativa de diferentes aspectos dos diferentes processos disponíveis para uso.

1.2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é fazer uma análise comparativa dos processos de nanoencapsulamento mais utilizados na literatura para os filtros solares, avaliando a estabilidade das formulações, o desempenho do processo, e outros fatores que devem ser considerados para aplicações comerciais, como o custo dos produtos.

1.2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos perseguidos no presente trabalho são:

- Desenvolver lipossomas multilamelares, via hidratação do filme lipídico, capazes de encapsular os filtros solares (avobenzona e benzofenona-3);
- Avaliar o efeito do tempo de hidratação sobre a qualidade dos lipossomas multilamelares obtidos;
- Desenvolver nanoemulsões à base do polímero natural quitosana e contendo os filtros solares (avobenzona e benzofenona-3);
- Desenvolver nanopartículas poliméricas à base de PMMA, via polimerização em miniemulsão, para o encapsulamento dos filtros solares (avobenzona e benzofenona-3);
- Avaliar de forma comparativa os sistemas de nanoencapsulamento obtidos, quanto à estabilidade, à eficiência de encapsulamento e ao custo do processo.

1.3 Estrutura da dissertação

Essa dissertação de mestrado está estruturada em seis capítulos descritos brevemente a seguir. O Capítulo I apresentou uma pequena introdução, além de discutir os principais objetivos a serem alcançados neste estudo. O Capítulo II consiste de uma revisão bibliográfica, destacando os principais trabalhos relacionados ao nanoencapsulamento de filtros solares, dando ênfase aos lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas poliméricas. No Capítulo III é mostrada a metodologia experimental adotada para cada um dos sistemas de nanoencapsulamento abordados. São descritas também o estudo experimental de técnicas de caracterização empregadas para análise da distribuição de tamanhos das partículas (por espalhamento de luz), eficiência de encapsulamento (por análises químicas), distribuição de massas molares (por cromatografia de permeação em gel, GPC), morfologia (por microscopia eletrônica de varredura, MEV) e propriedades térmicas (por calorimetria exploratória diferencial, DSC). No Capítulo IV são mostrados os resultados obtidos para cada um dos sistemas de nanoencapsulamento abordados, assim como todas as caracterizações realizadas. Ao longo da discussão são feitas análises comparativas. No Capítulo V, as principais conclusões e algumas sugestões para trabalhos futuros são apresentadas. Finalmente, no Capítulo VI são apresentadas as referências bibliográficas consultadas nesta dissertação. A dissertação finaliza após os apêndices A e B, em que são apresentados os espectros de absorção dos filtros solares, dos lipossomas puros e das nanopartículas poliméricas puras.

Capítulo II

Revisão Teórica e Bibliográfica

2.1 Radiação Solar

O Sol é responsável pela emissão de um amplo espectro de radiação eletromagnética, abrangendo desde raios gama até ondas de rádio. Entretanto, grande parte desta radiação é retida pela camada de ozônio. Somente as radiações com comprimentos de ondas entre 290 e 3.000 nm atingem a superfície terrestre, sendo estas formadas predominantemente por radiações ultravioleta (100–400 nm), visíveis (400–800 nm) e infravermelhas (acima de 800 nm) (ANTONIOU *et al.*, 2008; FLOR *et al.*, 2007; LATHA *et al.*, 2013).

Por ser a mais energética, a radiação ultravioleta (UV) é a que apresenta maior tendência para causar reações fotoquímicas, que podem estimular a produção de melanina ou até mesmo a ocorrência de graves queimaduras. Além disso, pode desencadear mutações genéticas, tendo como possível consequência o câncer de pele (FLOR *et al.*, 2007).

A radiação UV é dividida usualmente em bandas de acordo com o comprimento de onda, na forma: UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (100-290 nm) (ANTONIOU *et al.*, 2008). A radiação UVC é a de maior energia e, portanto, potencialmente mais lesiva aos seres vivos (FLOR *et al.*, 2007). Porém, a camada de ozônio é capaz de absorver toda esta radiação. Por outro lado, as radiações UVA e UVB não são completamente absorvidas, sendo a radiação UVA mais predominante na superfície terrestre.

A radiação UVB apresenta efeitos lesivos mais evidentes e imediatos, que incluem desde eritemas até queimaduras solares, imunossupressão e câncer de pele. A radiação UVA é a principal responsável pelo bronzeamento da pele, devido ao escurecimento da melanina, e pelo fotoenvelhecimento. Além disso, pode potencializar a ação da radiação UVB (LATHA *et al.*, 2013; FLOR *et al.*, 2007; NASCIMENTO, 2011).

2.1 Sistemas Naturais de Proteção

A molécula de ozônio (O_3) é caracterizada pela capacidade de fotoabsorção, sendo o maior agente fotoprotetivo localizado na estratosfera. A camada de ozônio funciona como uma barreira para radiações solares com comprimentos de ondas menores que 285 nm. Dessa forma, é capaz de absorver 100 % da radiação UVC e 90 % da radiação UVB; no entanto, quase não absorve a radiação UVA (BALOGH *et al.*, 2011; KULLAVANIJAYA *et al.*, 2005).

Vale ressaltar que, a partir da década de 1970, houve uma redução crítica da barreira de ozônio, como consequência do uso de substâncias capazes de danificar esta proteção, em especial os clorofluorcarbonos. Por isso, nos últimos anos, diversas medidas têm sido adotadas por alguns países para estabilizar o nível de ozônio na estratosfera (BALOGH *et al.*, 2011; BJORN *et al.*, 2007).

Por outro lado, a pele consta com mecanismos próprios de proteção à radiação ultravioleta, incluindo: a melanina, o estrato córneo e a secreção sudorípara. A melanina é o pigmento natural dos seres humanos, sendo produzido na epiderme. Apresenta uma ampla faixa de absorção de comprimentos de onda, incluindo desde o ultravioleta até a radiação próxima ao infravermelho. Este pigmento é capaz de proteger a pele, bloqueando e refletindo a radiação UV, convertendo-a em calor (KULLAVANIJAYA *et al.*, 2005).

O estrato córneo ou camada córnea é a camada mais externa da pele, sendo formada por células mortas, anucleadas e queratinizadas. Quando em contato com a radiação UV, a pele estimula o espessamento desta barreira, a fim de aumentar a distância a ser percorrida pela radiação, evitando assim maiores danos (GONÇALVES, 2010).

Também situada na epiderme, a secreção sudorípara é composta pelo ácido urocânico (Figura 2.1), que apresenta máxima absorção em 277 nm. Este ácido absorve radiação na faixa do UVB, impedindo queimaduras solares à pele (GONÇALVES, 2010).

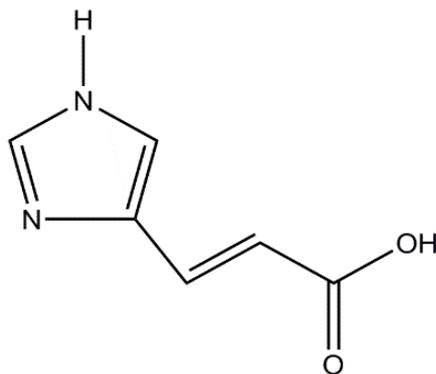


Figura 2.1: Estrutura química do ácido urocânico.

2.2 Fotoproteção

Segundo a resolução da ANVISA RDC nº 47 (2006), os filtros solares, ou filtros ultravioletas, são substâncias utilizadas nas formulações fotoprotetoras, com o intuito de reterem os raios ultravioletas, impedindo os danos à pele. Nesse contexto, os protetores solares são preparações cosméticas que contêm filtros solares capazes de absorver, dispersar ou refletir a radiação ao longo da faixa do UV (ANVISA, 2012). Essas formulações devem apresentar termoestabilidade, fotoestabilidade, resistência à água, não toxidez e facilidade na incorporação (MORABITO *et al.*, 2011; HENRIQUES, 2008). Além disso, devem garantir características sensoriais e táteis de forma a melhorar a sua aplicabilidade (JANSEN *et al.*, 2013).

Dependendo do mecanismo de ação e da composição química, os filtros solares podem ser classificados em inorgânicos ou orgânicos (MANCEBO *et al.*, 2014). Os filtros inorgânicos são considerados mais efetivos, por garantirem absorção, reflexão e dispersão da radiação UV. Ademais, por serem utilizados em uma ampla faixa de comprimentos de onda, evitam o uso de múltiplos filtros solares, o que reduz a chance de irritabilidade à pele (MORABITO *et al.*, 2011). Os filtros inorgânicos mais utilizados são o óxido de zinco e o dióxido de titânio. Por questões estéticas, as formulações têm trabalhado com micro e nanopartículas desses filtros, com o objetivo de reduzir a dispersão de luz visível e proporcionar um filme transparente sobre a pele, melhorando a aceitabilidade cosmética (MANCEBO *et al.*, 2014; SAMBANDAN *et al.*, 2011).

Por outro lado, os filtros orgânicos atuam por absorção da radiação UV, convertendo-a em energias menos nocivas aos seres humanos. Em geral, esses filtros são compostos aromáticos com grupos carboxílicos e com um grupo doador de elétrons, na posição orto ou para do anel aromático. O mecanismo de atuação consiste basicamente na absorção da radiação UV, levando os elétrons a um estado de energia mais elevada. Ao retornarem ao estado inicial, o excesso de energia é liberado na forma de calor (BALOGH *et al.*, 2011; FLOR *et al.*, 2007). Esses filtros são classificados em filtros UVA (benzofenonas, antranilatos e dibenzoilmetanos) ou filtros UVB (derivados do ácido para-aminobenzóico [PABA], salicilatos, cinamatos e derivados de benzilideno cânfora). A fim de atingir um fator de proteção solar (FPS) adequado ou uma maior faixa de absorção do espectro, as formulações fotoprotetoras tendem a utilizar combinações entre os filtros químicos UVA e UVB (SERPONE *et al.*, 2007).

A resolução da ANVISA RDC nº 47 (2006) também define as concentrações máximas de cada filtro solar que pode ser utilizado nas formulações fotoprotetoras, como mostrado parcialmente na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Exemplos de filtros solares e suas respectivas concentrações máximas (adaptado de ANVISA, 2006).

Substância	Concentração máxima autorizada na formulação fotoprotetora (% m/m)
Butil Metoxi-DibenzoilMetano	5 %
Cinoxato	3 %
Benzofenona-3	10 %
PABA	15 %
Dióxido de Titânio	25 %
4-Metil Benzilideno Cânfora	4 %
3-Benzilideno Cânfora	2 %
Óxido de Zinco	25 %

2.3.1 Fator de Proteção Solar

A eficácia de um protetor solar está relacionada à capacidade de proteger a pele de queimaduras causadas pela radiação UV, sendo expressa pelo Fator de Proteção Solar (FPS). O FPS é definido como a razão entre o tempo necessário para a que a radiação UVB cause um eritema perceptível (*Dose mínima eritematosa: DME*) com a pele protegida pelo filtro solar e sem a proteção do mesmo (WOLF *et al.*, 2001). Em outras palavras, o FPS representa o tempo adicional que uma pessoa pode ficar exposta à radiação solar com a proteção do filtro solar sem se queimar, em relação ao tempo de queima, caso estivesse sem filtro solar. De acordo com a resolução da ANVISA RDC nº 30 (2012), a DME é o primeiro eritema perceptível com bordas definidas observado entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação.

Para a avaliação da eficácia de um filtro solar na região do UVA (fator de proteção UVA: FP-UVA), calcula-se a razão entre o tempo de exposição à radiação UVA demandado para o escurecimento (*dose mínima pigmentária: DMP*) da pele com a proteção do filtro solar e sem a proteção do mesmo. A DMP é definida como o escurecimento pigmentário persistente da pele com bordas definidas após 2 a 4 horas de exposição à radiação UVA (ANVISA, 2012).

As análises *in vivo* para a determinação do FPS e FP-UVA são complexas e possuem custo elevado, sendo dependentes de uma tecnologia custosa, de técnicos especializados e de voluntários humanos. Perante esses problemas, as metodologias *in vitro* são comumente utilizadas para a caracterização inicial das formulações, já que apresentam rapidez e facilidade na execução, custo acessível e reprodutibilidade (VELASCO *et al.*, 2011).

Para avaliar o FPS das formulações fotoprotetoras, é usualmente utilizado o método *in vitro* desenvolvido por MANSUR *et al.* (1986). Mansur e colaboradores desenvolveram uma equação matemática que utiliza como base para a medição do FPS a espectrofotometria. Dessa forma, o método correlaciona valores de absorvância das formulações com concentração conhecida (0,2 µL/mL ou 0,2 mg/mL), na faixa de comprimentos de onda de 290 a 320 nm, com valores empíricos de correção para obter o valor do FPS.

$$\text{FPS}_{\text{espectrofotométrico}} = \text{FC} \cdot \sum_{\lambda=320}^{290} (\text{EE}_{\lambda} \cdot I_{\lambda}) \cdot \text{Abs}_{\lambda} \quad (1)$$

em que o FC é um fator de correção (igual a 10), EE_{λ} é o efeito eritematogênico da radiação no comprimento de onda (λ) e I_{λ} é a intensidade da radiação no comprimento de onda (λ). O termo $EE_{\lambda} \cdot I_{\lambda}$ é definido na Tabela 2.2. Abs_{λ} é o valor medido da absorvância no comprimento de onda (λ).

Tabela 2.2: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda (MANSUR *et al.*, 1986).

λ (nm)	$EE_{\lambda} \cdot I_{\lambda}$
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

Vale ressaltar que a eficácia do filtro solar não é resultado apenas do desenvolvimento do produto, mas também depende da utilização correta pelo consumidor. É de suma importância que seja feita uma reaplicação do produto na pele a cada 2 a 3 horas. Além disso, nos testes realizados para a determinação do FPS, é utilizada uma camada de aproximadamente 2,0 mg/cm². No entanto, de acordo com DIFFEY *et al.* (2001), os consumidores costumam utilizar uma quantidade bem menor durante a aplicação real, o que resulta numa perda de 20 a 50 % do FPS esperado.

2.3.2 Filtros Solares em Estudo

A escolha dos filtros solares deste trabalho seguiu a estratégia utilizada no trabalho desenvolvido por LORCA (2012), que consiste em obter proteção na faixa das radiações UVA e UVB. Para a proteção na faixa da radiação UVA foi utilizado o filtro solar avobenzona e por

dificuldades em encontrar filtros apenas na faixa do UVB, utilizou-se o filtro solar benzofenona-3 que apresenta absorção na faixa do UVA e UVB.

- Avobenzona:

A avobenzona (AVO) (Figura 2.2) é o principal representante do grupo dos dibenzoilmetanos, apresentando absorção no intervalo de comprimentos de onda entre 310 a 400 nm, sendo portanto um filtro com proteção à radiação UVA (BALOGH *et al.*, 2011).

Também conhecido como butil metóxi-dibenzoilmetano, pode ser encontrado com os seguintes nomes comerciais: Parsol 1789[®] e Eusolex 9020[®]. Este filtro solar foi o primeiro a ser reconhecido como um efetivo filtro orgânico UVA. A avobenzona, entretanto apresenta instabilidade, resultado da degradação após uma hora de exposição à radiação, resultando em perdas de 50 a 60 % do efeito de fotoproteção (MANCEBO *et al.*, 2014; SAMBANDAN *et al.*, 2011). A fim de aumentar a estabilidade, a AVO é usualmente utilizada em combinação com outros filtros solares, em especial filtros UVB. Este filtro solar apresenta alta lipofilicidade, tendo coeficiente de partição igual a 4,51 (BROOKE *et al.*, 2008).

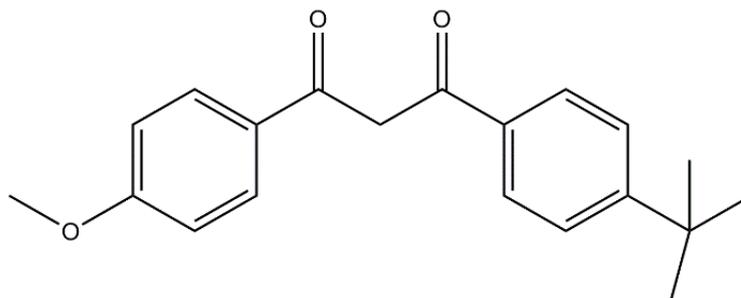


Figura 2.2: Estrutura química da avobenzona.

- Benzofenona-3:

O grupo das benzofenonas é formado por cetonas aromáticas. As benzofenonas se caracterizam pela facilidade de gerar formas de ressonância, por isso necessitando de menor energia quântica para absorver a luz. Como o comprimento de onda é inversamente

proporcional à energia da radiação, esses compostos absorvem a energia em comprimentos de onda acima de 320 nm (SHAATH *et al.*, 1997).

A benzofenona-3 (BZ) (Figura 2.3) é um composto lipofílico, com coeficiente de partição igual a 3,79 (BROOKE *et al.*, 2008), também conhecido como oxibenzona, metanona ou 2-hidroxi-4-metoxifenil. Comercialmente, pode ser encontrado com os seguintes nomes: Neo Heliopan BB[®], Eusolex 4360[®] e Tinosorb B3[®] (NASCIMENTO, 2011). Este filtro solar ainda apresenta absorção da radiação no intervalo de comprimentos de onda entre 270 a 350 nm, garantindo proteção à radiação UVB e UVA. No entanto, apresenta maior absorção na faixa do UVA (BALOGH *et al.*, 2011). Embora seja amplamente utilizada, a BZ-3 pode causar reações alérgicas, resultando em dermatite de contato, justificando plenamente o uso de técnicas de encapsulamento desse ativo.

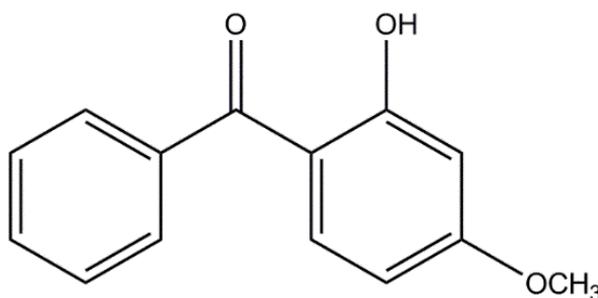


Figura 2.3: Estrutura química da benzofenona-3.

2.3.3 Absorção Sistêmica dos Filtros Solares

Apesar da luz solar proporcionar diversos benefícios para o ser humano, existem algumas controvérsias relacionadas à segurança do uso dos protetores solares. Um tópico bastante debatido na literatura é a possibilidade da absorção sistêmica, justificando a preocupação com a toxicidade inerente aos filtros solares (ANTONIOU *et al.*, 2008; BALOGH *et al.*, 2011; FLOR *et al.*, 2007; GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

HAYDEN *et al.* (1997) realizaram um estudo com uma formulação fotoprotetora comercialmente disponível, contendo oxibenzona, metoxicinamato de octila, salicilato de octila

e octocrileno. Após 10 horas da única aplicação, o grupo detectou de 1 a 2 % de oxibenzona na urina dos voluntários, confirmando a absorção do ativo. Além disso, a análise indicou a presença de alguns metabólitos deste filtro solar no corpo humano, revelando a conjugação sistêmica do composto.

A absorção sistêmica de alguns filtros solares também foi reportada por JANJUA *et al.* (2004). Os autores ainda avaliaram a atividade estrogênica de três filtros solares combinados (benzofenona-3, metoxicinamato de octila e 3,4-metilbenzilideno cânfora) em uma formulação contendo 10 % (p/p) de cada um. Diferentemente de HAYDEN e colaboradores, o grupo de JANJUA evidenciou a ocorrência da penetração dos três compostos da formulação no teste. No entanto, nenhuma influência sobre os níveis dos hormônios reprodutores foi observada.

Em contrapartida, o estudo de SCHLUMPF *et al.* (2004) mostrou que diversos filtros solares, como benzofenona-3 e 3,4-metilbenzilideno cânfora, apresentaram atividade estrogênica *in vitro* em células de câncer de mama humanas. Quanto ao ensaio *in vivo*, realizado em ratos, o grupo destacou os dois derivados da cânfora (3-benzilideno cânfora e 3,4-metilbenzilideno cânfora) como tendo maior atividade estrogênica.

De acordo com esses trabalhos, ratifica-se o desenvolvimento de sistemas de inclusão que garantam a permanência dos filtros solares na superfície da pele, proporcionando maior proteção e redução dos possíveis efeitos tóxicos. Esse cenário é ainda mais preocupante em crianças, as quais apresentam maior área de aplicação por massa corporal, em comparação com os adultos.

2.3 Nanotecnologia

Idealmente, qualquer produto cosmético deve assegurar que a substância ativa da formulação seja usada apenas no local de ação, com a concentração correta e pelo período de tempo determinado. Assim, para os filtros solares, é esperado que permaneçam no estrato córneo, criando uma barreira contra a radiação ultravioleta, sem que ocorra a absorção.

Nesse contexto, técnicas de nanotecnologia constituem uma alternativa promissora para o encapsulamento dos filtros solares, garantindo a redução da permeação cutânea e, assim, a presença destes apenas nas últimas camadas da pele. Os sistemas nanoestruturados (como lipossomas, ciclodextrinas, nanopartículas, nanoemulsões e nanopartículas sólidas lipídicas) proporcionam alternativas para o encapsulamento e a liberação controlada mais efetiva dos ativos, levando ao aumento do tempo de permanência no estrato córneo, resultando em formulações mais eficazes e seguras (MOTA *et al.*, 2008). Além disso, tais sistemas se destacam pela capacidade de proteção aos compostos lábeis contra degradação química.

Nesse contexto, ALVAREZ-ROMÁN *et al.* (2001) desenvolveram formulações em gel contendo o filtro solar metoxicinamato de octila (OMC) encapsulado em nanocápsulas, avaliando o perfil de liberação em comparação com as formulações com o filtro solar livre. As formulações preparadas com o sistema de inclusão mostraram perfis de liberação mais controlados, indicando que o ativo estava totalmente encapsulado e não adsorvido na superfície externa. Além disso, essas formulações reduziram a formação dos eritemas causados pela exposição à radiação UV, o que os autores atribuíram à formação do filme de nanocápsulas na superfície da pele.

NICULAE *et al.* (2012) utilizaram nanopartículas lipídicas para avaliar a eficácia de tais sistemas no encapsulamento da avobenzona para as formulações fotoprotetoras. Os sistemas obtidos apresentaram tamanhos compatíveis com a utilização pretendida (entre 163 e 259 nm) e com índice de polidispersão (IP) abaixo de 0,248, indicando estruturas com tamanhos relativamente homogêneos. Além disso, resultaram em alta eficiência de encapsulamento (entre 80 e 86,5 %). Essas nanoestruturas também foram estudadas por CARLOTTI *et al.* (2005), que concluíram que as nanopartículas lipídicas proporcionaram a redução pela metade da taxa de fotodegradação do metoxicinamato de octila.

YENER *et al.* (2003) estudaram o preparo de microesferas sólidas lipídicas para encapsular também o filtro solar OMC. Este grupo percebeu que a taxa de penetração é significativamente dependente da formulação. Dessa forma, a penetração pôde ser reduzida em até 77 % utilizando as formulações à base das microesferas sólidas lipídicas. Ademais, a utilização deste sistema de encapsulamento proporcionou a melhoria na fotoestabilidade do filtro solar em questão.

É importante observar que as correntes intersticiais que carregam os fluidos orgânicos entre as células fluem em estruturas porosas que têm cerca de 100 nm de diâmetro (BALOGH *et al.*, 2011). Portanto, esse parece constituir um limite físico importante para as aplicações de filtros solares encapsulados. Se as partículas forem menores que cerca de 100 nm, elas podem ser absorvidas e circulam pelas correntes intersticiais, resultando em redução de eficiência da função protetora de absorção (BAILLO *et al.*, 2012). No entanto, se apresentarem dimensões da ordem de 1 µm, o usuário pode sentir a sensação de esfoliação, prejudicando os aspectos de comercialização do produto. Logo, a faixa característica de tamanhos que deve ser produzido para as partículas está entre 100 nm e 300 nm (NASCIMENTO, 2011).

2.4.1 Lipossomas

O estudo dos lipossomas foi iniciado na década de 1960, quando Alec Bagham observou que fosfolipídios em soluções aquosas formavam estruturas fechadas com bicamadas. Desde então, essas estruturas foram muito estudadas, resultando aplicações em inúmeras áreas farmacêuticas, como indicado na Tabela 2.3 (TORCHILIN *et al.*, 2005).

Tabela 2.3: Exemplos de formulações lipossomais no mercado farmacêutico (adaptado de FAN *et al.*, 2013).

Nome do Produto	Ativo	Tratamento
Ambisome	Amphotericina B	Infecção fúngica
Myocet	Doxorubicina	Câncer de mama
Doxil	Doxorubicina	Sarcoma de Kaposi, câncer de mama e de ovário
Lipo-Dox	Doxorubicina	Sarcoma de Kaposi, câncer de mama e de ovário
DaunoXome	Daunorubicina	Leucemia
Visudyne	Verteporfina	Degeneração molecular
Depocyt	Citarabina	Meningite
DepoDur	Sulfato de morfina	Dor
Marqibo	Sulfato de vincristina	Leucemia

Lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, que encapsulam um volume aquoso. Esses lipídios são moléculas anfifílicas (ou anfipáticas); ou seja, constituídas por cadeias apolares ligadas a uma extremidade polar (Figura 2.4). A estruturação dos lipossomas em bicamadas é a configuração de menor energia livre, sendo resultado do efeito hidrofóbico provocado nas cadeias apolares em contato com a água ou outro meio polar. Então, enquanto as cadeias apolares interagem entre si, as extremidades polares fazem interface com o meio polar do sistema (MERTINS, 2004).

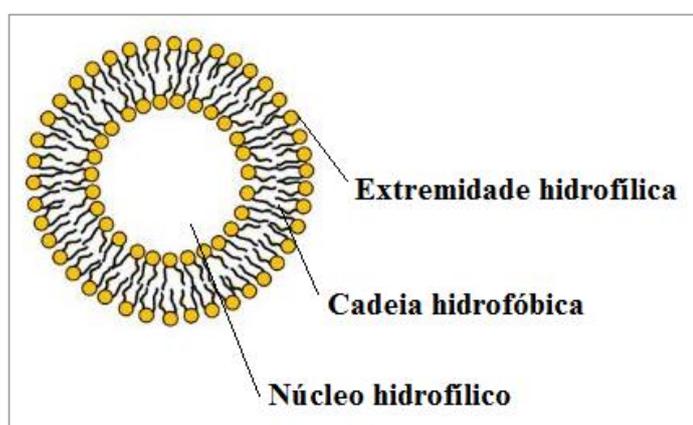


Figura 2.4: Estrutura dos lipossomas.

O grande diferencial destas estruturas lipossômicas é a capacidade de encapsular tanto fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos. Enquanto os fármacos lipofílicos localizam-se nas bicamadas fosfolipídicas, os fármacos hidrofílicos são armazenados no volume aquoso. Além disso, a semelhança dessas vesículas com as membranas naturais é outro ponto a ser considerado, já que pode ajudar a regeneração da pele. Mesmo estando sem ativo encapsulado, os lipossomas garantem o fornecimento de lipídios e água para o estrato córneo (SHARMA *et al.*, 2012). Ademais, os lipossomas são biodegradáveis e biocompatíveis e ainda apresentam baixa toxicidade. Por essas vantagens, esses sistemas ganharam lugar de destaque na ciência dos sistemas de liberação de fármacos.

Os lipossomas podem ser preparados a partir de uma grande variedade de fosfolípidos. O fosfolípido mais frequentemente utilizado é a fosfatidilcolina (Figura 2.5), que é uma

(MLV – do inglês *Multilamellar Vesicles*) e lipossomas unilamelares. Essas últimas podem ainda ser desmembradas em lipossomas unilamelares grandes (LUV – do inglês *Large Unilamellar Vesicles*) e lipossomas unilamelares pequenas (SUV – do inglês *Small Unilamellar Vesicles*) (BHAI *et al.*, 2012).

Para a obtenção de lipossomas, vários métodos de preparo para essas estruturas já foram descritos na literatura, sendo as MLV's mais comumente obtidas pelo método da hidratação do filme lipídico (MOTA *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2013; GARCIA, 1998). Por outro lado, as LUV's podem ser obtidas pelo método de injeção de solvente (etanol ou éter) e pela técnica de evaporação em fase reversa, dentre outros métodos. Por último, as SUV's podem ser preparadas com auxílio da técnica de sonicação ou extrusão das MLV's (BHAI *et al.*, 2012).

De forma geral, os diferentes métodos se baseiam nas mesmas etapas fundamentais da hidratação do filme lipídico, que consiste na dissolução dos lipídios da membrana em um solvente orgânico, seguido pela evaporação desse solvente em um evaporador rotatório, tendo como consequência a formação de um filme fino. Em seguida, deve ser feita a hidratação deste filme com água ou solução tampão, sob agitação vigorosa. A partir desse momento, as vesículas incham e se desprendem em camadas, formando os lipossomas multilamelares (Figura 2.7). A partir deste ponto do processo, as técnicas de obtenção de SUV's ou LUV's podem ser utilizadas, se for este o objetivo final do processo. No entanto, deve ficar claro que o uso de solvente orgânico (clorofórmio, metanol, mistura de clorofórmio e metanol, dentre outros) na etapa de dissolução representa um inconveniente importante em relação à produção dessas vesículas, devido aos riscos à saúde e à segurança ambiental provenientes do uso desses materiais.

Algumas limitações têm sido relatadas em relação ao desenvolvimento de lipossomas, como a falta de reprodutibilidade, a baixa eficiência de encapsulamento e o alto custo do processo. A baixa estabilidade dessas estruturas pode ser consequência de um processo físico ou químico (MERTINS, 2004).

A instabilidade química está relacionada à composição dos lipossomas, sendo causada pela oxidação da insaturação localizada na cadeia lipídica e pela hidrólise do éster. Como resultado da hidrólise, ocorre a formação do composto liso-fosfatidilcolina, responsável pelo

aumento da permeabilidade da membrana (BATISTA *et al.*, 2007). Para minimizar este problema, os lipossomas devem ser armazenados sob temperaturas baixas (em torno de 4 °C) e conservados em atmosfera de nitrogênio ou argônio (MERTINS, 2004), o que constitui grave problema para o processamento e o armazenamento, por conta dos custos associados a essas operações em sistemas comerciais reais.

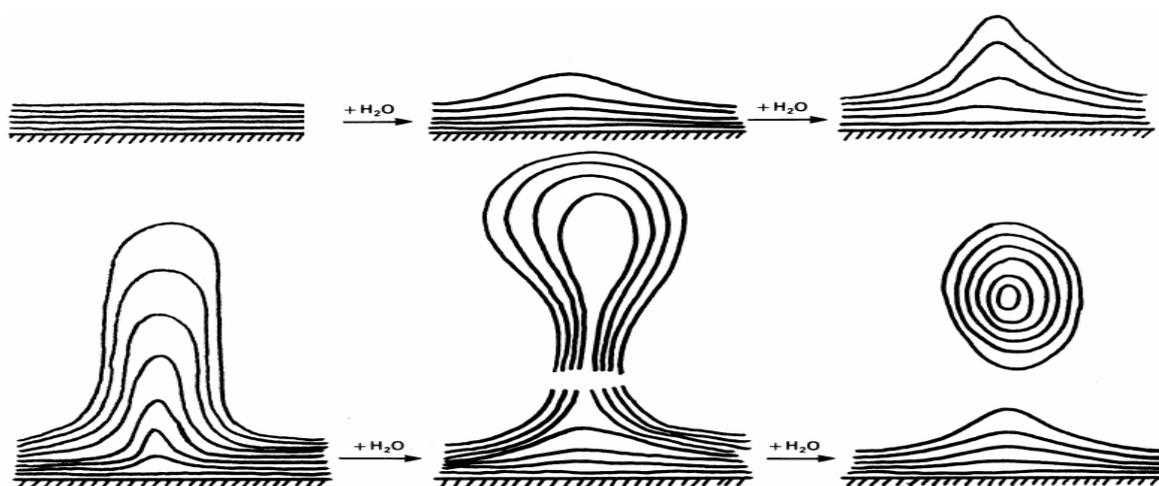


Figura 2.7: Formação dos lipossomas multilamelares pelo método de hidratação do filme lipídico (LASIC *et al.*, 1988).

A agregação e a fusão das vesículas são responsáveis pela instabilidade física dos lipossomas, que podem causar aumento expressivo das dimensões das partículas e perda do material encapsulado. O uso de lipídios carregados é uma forma de reduzir este problema, devido à ocorrência de repulsão eletrostática entre as vesículas (BATISTA *et al.*, 2007). A variação dos tamanhos e a perda do ativo encapsulado constituem problemas para muitas aplicações que requerem rigor das condições de uso.

O uso da técnica de liofilização tem sido defendido como meio de reverter os problemas de instabilidade e, conseqüentemente, aumentar o tempo de prateleira (AKBARZADEH *et al.*, 2013; VERMURI *et al.*, 1995). Esse método consiste em remover a água sob pressões extremamente baixas, por sublimação. O uso de crioprotetores, como sucrose, trealose e

glicose, é recomendado para garantir a proteção das estruturas frente ao estágio de congelamento.

Os lipossomas constituem sistemas de liberação já utilizados em diversas áreas para encapsulamento de fármacos. PUGLIA *et al.* (2004) utilizaram os lipossomas do tipo LUV para encapsular o anti-inflamatório indometacina, obtendo uma alta eficiência de encapsulamento (aproximadamente 84 %). Além disso, realizaram testes de liberação *in vivo*, comparando as formulações em gel com o fármaco retido nos lipossomas e o mesmo gel com o fármaco livre. Com os resultados, concluíram que o gel com lipossomas promoveu um efeito anti-inflamatório mais prolongado, possivelmente devido às interações das vesículas com os lipídios do estrato córneo.

MIRANDA (2005) obteve o mesmo efeito prolongado quando encapsulou o repelente DEET (N,N-dietil-m-toluamida) em lipossomas. Os lipossomas contendo o repelente mostraram maior atividade repelente durante um período de 12 horas, quando comparado às formulações com repelente livre.

Quanto à encapsulação de filtros solares, MOTA *et al.* (2013) desenvolveram formulações em gel contendo lipossomas com OMC (metoxicinamato de octila) encapsulado, a fim de avaliar a estabilidade e a capacidade de retenção do filtro solar no estrato córneo. Os autores obtiveram estruturas com diâmetro de 982 ± 68 nm, com índice de polidispersão de $0,464 \pm 0,050$, com população relativamente homogênea de vesículas. Além disso, o grupo obteve uma alta eficiência de encapsulamento (85 ± 2 %). Pela análise de biodistribuição com o uso do tecnécio-99, foi possível observar que as formulações com o OMC livre resultaram em altos níveis do filtro solar no pulmão, indicando a rápida absorção após a aplicação. Por outro lado, as formulações com lipossomas garantiram maior quantidade de filtro solar na pele, estando presente em menor quantidade no pulmão, mostrando a redução da absorção sistêmica pelo uso dos lipossomas.

Esses resultados foram confirmados por MONTEIRO *et al.* (2012), que promoveram a comparação entre dois sistemas de encapsulamento: os lipossomas e as ciclodextrinas. Além disso, esses autores fizeram análises para avaliar o fator de proteção solar (FPS) das formulações finais. Os resultados indicaram que a inclusão nos lipossomas proporcionou

melhor proteção à pele ($FPS_{lipossomas} = 11,0$) do que as ciclodextrinas ($FPS_{ciclodextrinas} = 8,5$); no entanto, vale ressaltar que nessas formulações continha 4 % de filtro solar livre, em função dos problemas de estabilidade dos lipossomas.

2.4.2 Nanoemulsão

Também conhecidos na literatura como miniemulsões e submicroemulsões, dentre outros nomes, esses sistemas são caracterizados fundamentalmente por constituírem uma emulsão em que o tamanho das gotas da fase dispersa se enquadra na escala nanométrica. Conforme apresentado na Figura 2.8, as emulsões podem ser do tipo óleo em água (O/A), em que a fase oleosa está dispersa na forma de gotas na fase contínua aquosa, ou água em óleo (A/O), em que a fase aquosa está dispersa na forma de gotas na fase contínua oleosa (MCCLEMENTS *et al.*, 2012).

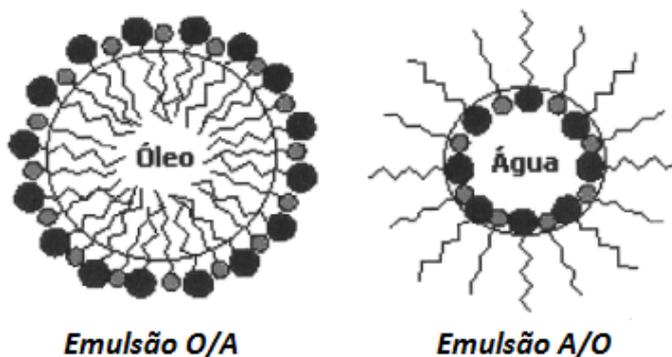


Figura 2.8: Estrutura das emulsões óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Há diversas vantagens no uso das nanoemulsões na indústria farmacêutica, tais como a distribuição mais uniforme do produto final sobre a pele, devido ao tamanho reduzido das gotas, garantindo a melhora na hidratação da pele; o aspecto sensorial, valorizado em produtos cosméticos, devido à fluidez natural destes sistemas (em baixas concentrações de óleo); substituição dos lipossomas, que são sistemas menos estáveis (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004). O pequeno tamanho das partículas garante uma grande também a

redução da importância da força da gravidade, em relação ao movimento browniano, sendo evitados os processos que resultam na instabilidade e na sedimentação (KOROLEVA *et al.*, 2012; TADROS *et al.*, 2004).

As nanoemulsões são formadas basicamente por três componentes: a fase aquosa, a fase oleosa e os tensoativos (MORAIS *et al.*, 2006). Os tensoativos apresentam com frequência caráter anfifílico e assim reduzem a tensão superficial entre as fases, uma vez que as cadeias apolares se dispersam na fase oleosa, enquanto as extremidades polares se mantêm em contato com a fase aquosa (MCCLEMENTS *et al.*, 2012).

O tipo da nanoemulsão a ser produzida influencia a escolha do tensoativo. Dessa forma, existe um sistema de classificação, chamado de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL), que avalia a solubilidade dos tensoativos nas fases aquosas e oleosas (MASON *et al.*, 2006). A faixa do EHL pode ser considerada um método fácil para definir a aplicabilidade dos tensoativos (Tabela 2.4). No caso das emulsões, os tensoativos com EHL elevado (entre 8 e 18) caracterizam-se pela hidrofiliicidade e, portanto, são utilizados nas emulsões O/A. Em contrapartida, os tensoativos com EHL baixo (entre 3 e 6) caracterizam-se pela lipofiliicidade e são utilizados nas emulsões A/O (MYERS, 2006). Vale ressaltar que originalmente, o sistema EHL foi criado para tensoativos não-iônicos; no entanto, após contribuições matemáticas, o sistema pôde ser estendido aos tensoativos iônicos (FLORENCE, 2003).

Tabela 2.4: Relação entre a faixa de EHL e a aplicação dos tensoativos (MYERS, 2006; FLORENCE, 2003).

Faixa de EHL	Aplicação	Exemplos
3-6	Emulsionante A/O	Span [®] 80 (monoleato de sorbitano)
7-9	Umectante	Span [®] 20 (monolaurato de sorbitano)
8-18	Emulsionante O/A	Tween [®] 80 (monoleato de polioxietileno sorbitano)
3-15	Detergente	Triton [®] X-100 (éster octilfenólico de decaetilenglico)
15-18	Solubilizante	Cremophor EL (óleo de rícino polioxietilado)

As nanoemulsões apresentam como característica principal a metaestabilidade, sendo estáveis apenas cineticamente. A estabilidade termodinâmica não é atingida porque a energia livre de Gibbs para manter a emulsão é maior que a necessária para manter o sistema composto pelas duas fases separadas (Figura 2.9). No entanto, esses sistemas podem se manter estáveis por um longo período de tempo, devido à presença dos tensoativos, que garante a existência de uma barreira de energia suficiente para prevenir a coalescência das gotas (MCCLEMENTS *et al.*, 2012).

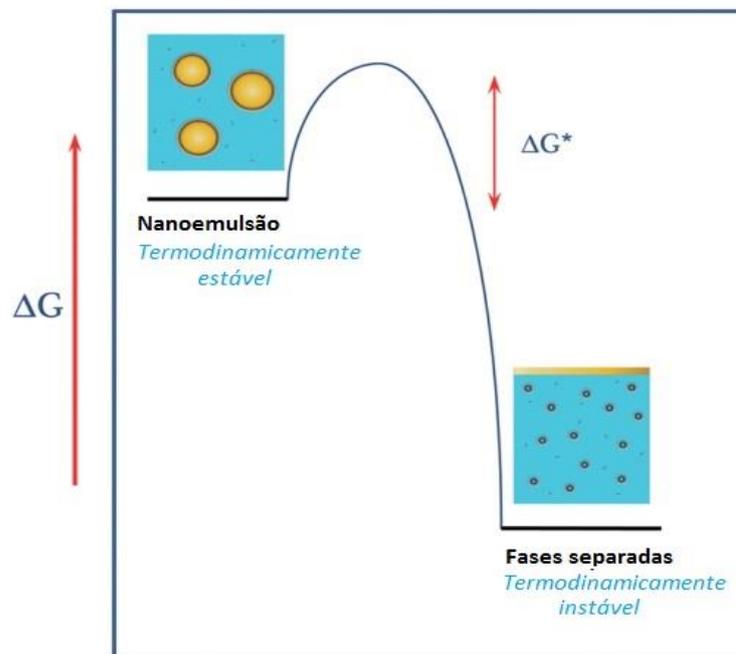


Figura 2.9: Diagrama de energia livre das nanoemulsões (adaptado de MCCLEMENTS *et al.* (2012)).

Dois fenômenos são os principais responsáveis pela desestabilização da emulsão, causando alteração no tamanho das partículas: a coalescência entre as gotas e a degradação difusional (*Ostwald ripening*). A coalescência se caracteriza pela união de duas ou mais gotas, ocorrendo a ruptura da interface e resultando em uma gota maior. Dessa forma, é de suma importância a escolha de um surfactante que provoque a repulsão entre as gotículas (MASON *et al.*, 2006), além de promover a formação de um filme mecanicamente resistente nas gotas conferindo maior estabilidade ao sistema. A degradação difusional é resultado da diferença de atividade entre as gotas menores e as gotas maiores. As gotas menores, por apresentarem maior

área específica, apresentam maior atividade (por causa da energia acumulada na interface). Dessa forma, existe uma transferência de massa contínua das gotas menores (de maior atividade) para as maiores (de menor atividade). Para evitar este processo, é sugerida a adição de um co-estabilizante insolúvel na fase contínua, de forma a reduzir o potencial químico das pequenas gotas e, assim, diminuir a taxa de transferência de massa das gotas menores para as maiores (KOROLEVA *et al.*, 2012; TADROS *et al.*, 2004).

Como as nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, não se formam espontaneamente, sendo necessária a aplicação de energia ao sistema, geralmente proveniente de dispositivos mecânicos. Nestes casos, as nanoemulsões são obtidas pelos métodos de alta energia de emulsificação, sendo utilizados homogeneizadores de alta eficiência (sonicador, Ultraturrax® ou homogeneizador de alta pressão) com o intuito de gerar forças destrutivas capazes de perturbar o sistema e formar gotas menores da fase dispersa (MASON *et al.*, 2006; SOLANS *et al.*, 2005).

Essas técnicas mecânicas garantem melhor controle sobre o tamanho das gotas e o uso de uma ampla variedade de componentes para as nanoemulsões (SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004). Contudo, por conta do alto investimento inicial necessário, tais equipamentos só se tornaram disponíveis comercialmente para uso industrial nos últimos anos (TADROS *et al.*, 2004). Abaixo, estas técnicas de dispersão são brevemente esclarecidas.

- O Ultraturrax (ou rotor-stator) promove a redução do tamanho das gotas por meio da turbulência gerada por rotação em alta velocidade do rotor presente no equipamento. Portanto, o tamanho da gota final depende da velocidade de rotação, assim como da geometria do sistema (ASUA *et al.*, 2002). No entanto, de acordo com ANTONIETTI *et al.* (2002), esses dispositivos não são capazes de alcançar energia suficiente para produzir uma distribuição homogênea de tamanhos de gota reduzidos, o que também foi confirmado por LÓPEZ *et al.* (2008).
- Por meio da propagação das ondas de ultrassom, o sonicador provoca oscilações do meio fluido, resultando na ruptura da fase dispersa em gotas. Contudo, um problema intrínseco ao uso do sonicador é o fato de que nem todo o fluido é submetido simultaneamente à região de propagação das ondas (ASUA *et al.*, 2002) por conta de detalhes de construção e alto custo do equipamento. Por isso, um outro problema

associado a essa técnica é a dificuldade em escalonar, para trabalhar em escalas industriais (ASUA et al., 2014).

- Os homogeneizadores de alta pressão são os equipamentos mais recomendados para a etapa de dispersão. Por meio de forças de impacto, esses equipamentos promovem a redução do tamanho das gotas. No dispositivo mais comum, as dispersões ‘grosseiras’, produzidas por agitação mecânica convencional, são pressurizadas por uma bomba de deslocamento positivo forçadas a fluir através de uma abertura estreita a uma alta velocidade. A combinação deste ‘fluxo de alongamento’ e da turbulência presente após esta abertura promove a quebra das gotas na faixa nanométrica (ASUA et al., 2002; ASUA et al., 2014).

Por outro lado, a energia necessária para a obtenção das nanoemulsões também pode ser fornecida pela alteração das propriedades físico-químicas do sistema. O princípio destes métodos de baixas energias de emulsificação é baseado na inversão espontânea de solubilidade do meio, podendo ocorrer pelo método de inversão de fases pela temperatura (*Phase Inversion Temperature - PIT*) ou pela emulsificação por inversão de fases pela alteração da fração volumétrica (*Emulsion Phase Inversion – EPI*) (SOLANS *et al.*, 2005; TADROS *et al.*, 2004). Nesse caso, a mudança contínua de uma propriedade (temperatura, por exemplo) pode causar a formação de uma fase dispersa finamente dividida e estabilizada por tensoativos.

Como mostrado até agora, as nanoemulsões apresentam características singulares, tais como tamanho de gotas reduzido e estabilidade cinética. Por isso, nanoemulsões apresentam grande potencial para uso como sistema de encapsulamento e liberação controlada de ativos.

JIMÉNEZ *et al.* (2004) confirmaram esse potencial ao comparar a permeação cutânea do filtro solar metoxicinamato de octila livre e encapsulado em nanoemulsões de óleo em água e água em óleo. Os resultados mostraram que a incorporação do filtro solar em fluido disperso reduziu a penetração do ativo, assim como a taxa de difusão. Dessa forma, esse sistema de inclusão garantiu que o filtro solar se mantivesse na superfície da pele, local desejado para a atuação do mesmo.

As nanoemulsões foram comparadas com as macroemulsões no processo de encapsulação dos filtros solares benzofenona-3 e metoxicinamato de octila por SILVA *et al.*

(2013). Ambos os sistemas apresentaram fator de proteção similares; no entanto, enquanto as nanoemulsões, preparadas pelo método de inversão de fases, apresentaram estabilidade superior a 90 dias e tamanho na faixa de 10 nm, as macroemulsões não tiveram estabilidade por mais de 48 horas, apresentando tamanho na ordem de 10,4 μm .

MANSUR *et al.* (2004) depositaram uma patente (número *WO117236-A1*) na qual nanoemulsões O/A, contendo óleos essenciais na fase oleosa, foram produzidas para a encapsulação de compostos hidrofóbicos, como fármacos, cosméticos ou vitaminas. O grupo desenvolveu diversas formulações para ratificar a eficácia da invenção, utilizando como exemplo, o fármaco praziquantel. A análise de distribuição de tamanhos das gotas, realizada durante trinta dias, mostrou que as nanoemulsões se mantiveram estáveis durante todo o tempo de análise com tamanho abaixo de 100 nm. No entanto, não foi realizada nenhuma análise de eficiência de encapsulamento, o que poderia dar melhores esclarecimentos sobre a vantagem de utilização deste sistema.

2.4.2.1 Obtenção de nanopartículas poliméricas via polimerização em miniemulsão

Frente às limitações inerentes ao uso dos lipossomas nos sistemas de encapsulamento e liberação de ativos, as nanopartículas poliméricas têm ganhado a atenção dos pesquisadores, por aumentarem a estabilidade do ativo em meios biológicos e durante o armazenamento e por reduzirem os efeitos colaterais (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

A depender da estrutura, as nanopartículas poliméricas podem ser subdivididas em nanoesferas e nanocápsulas (Figura 2.10). As nanoesferas são constituídas por uma matriz polimérica na qual o ativo pode estar adsorvido na superfície ou dissolvido nesta matriz. Por outro lado, as nanocápsulas são formadas por um núcleo oleoso recoberto por uma parede polimérica rígida. Neste caso, o ativo pode estar adsorvido na parede polimérica ou dissolvido no núcleo (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

No que diz respeito à aplicação biomédica, a escolha do polímero a ser utilizado é de suma importância para a preparação das nanopartículas poliméricas. Dependendo do objetivo

final pretendido com a formulação, o polímero pode ser biodegradável ou biocompatível. O polímero afeta não apenas na cinética de liberação do agente ativo, mas também a estabilidade do fármaco, a toxicidade e a compatibilidade com o organismo.

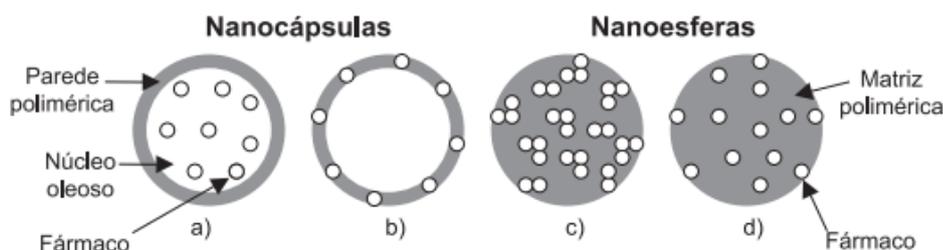


Figura 2.10: Representação das nanocápsulas e nanoesferas poliméricas, em que o fármaco em: (a) está dissolvido no núcleo oleoso; (b) está adsorvido à parede polimérica; (c) está retido na matriz polimérica; ou (d) adsorvido à superfície da matriz polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Nesse contexto, o poli(metacrilato de metila) (PMMA) encontra ampla utilização biomédica, por apresentar excelente biocompatibilidade, sendo utilizado como cimento dental, em próteses ósseas e no revestimento de fármacos para administração oral (FONSECA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012), além de encontrar amplo uso em cirurgias plásticas (KIM *et al.*, 2012).

O PMMA é obtido pela polimerização do monômero metacrilato de metila (MMA) e caracteriza-se pela baixa toxicidade (MENDES *et al.*, 2012; FEUSER *et al.*, 2014). Tradicionalmente, a reação acontece com auxílio de um iniciador que rompe a ligação dupla e provoca o crescimento da cadeia (polimerização por poliadição) (Figura 2.11). Estes processos são caracterizados por atingirem conversões próximas a 100 %, resultando em polímeros de alta massa molar (ODIAN, 2004).

As nanopartículas poliméricas podem ser obtidas a partir das nanoemulsões por meio da polimerização em miniemulsão ou por meio da técnica de evaporação do solvente, a partir do polímero pré-formado (KOROLEVA *et al.*, 2012). A técnica de evaporação do solvente consiste na emulsificação de uma mistura composta pelo solvente orgânico, pelo polímero e pelo ativo. Após a formação da emulsão, a mesma é submetida à agitação constante e o solvente

é evaporado pelo aumento da temperatura ou por vácuo, levando à formação das partículas de polímero (MAHAPATRO *et al.*, 2011; SPERNARTH *et al.*, 2007). Apesar desta técnica ser bastante popular na área farmacêutica, o uso de solvente orgânico introduz riscos por causa da potencial toxicidade, além de requerer uma etapa extra de processamento para a retirada do solvente residual do produto e reciclagem do solvente, aumentando o custo do processo.

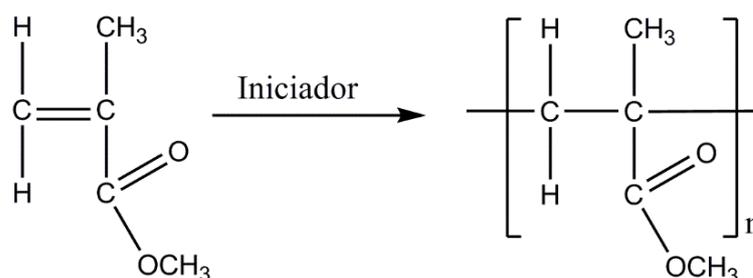


Figura 2.11: Representação esquemática da reação de polimerização do MMA.

Na técnica de polimerização em miniemulsão, o monômero constitui a fase dispersa das nanoemulsões. O iniciador pode ser adicionado à fase contínua, dispersa ou à interface do sistema (tensoativos iniciadores). Neste processo, a reação de polimerização ocorre após a etapa de dispersão da nanoemulsão, ocorrendo em cada uma das gotas do monômero (Figura 2.12). Assim, cada gota funciona como um nano-reator (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essas gotas polimerizadas apresentam características morfológicas idênticas às das gotas emulsificadas. O tamanho das gotas é influenciado principalmente pelo surfactante e pelo mecanismo original de dispersão (ANTONIETTI *et al.*, 2002).

A polimerização via radicais livres em miniemulsões ocorre predominantemente pelo mecanismo de nucleação das gotas, em que as gotas geradas na etapa de emulsificação são nucleadas pela entrada dos radicais produzidos na fase aquosa (ou na própria fase dispersa). De forma geral, acredita-se que todas as gotas são nucleadas e que, desconsiderando-se os efeitos de coalescência e degradação difusional, o número de gotas é aproximadamente constante até o final da reação de polimerização (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

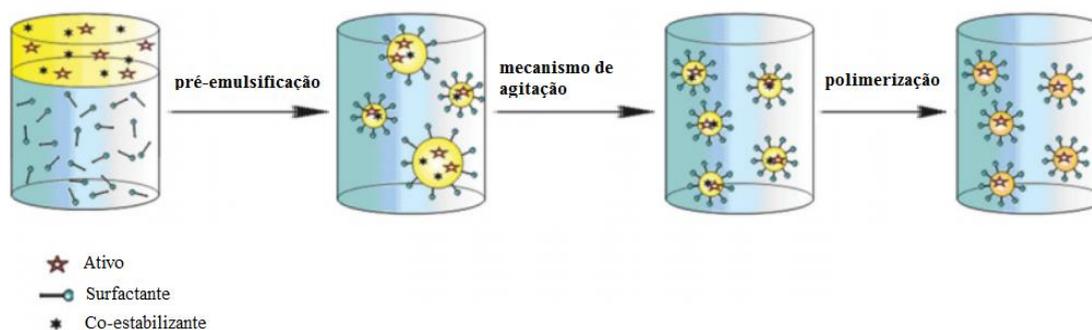


Figura 2.12: Esquema da polimerização em miniemulsão (adaptado de LANDFESTER *et al.* (2010)).

Os processos de polimerização em miniemulsão contam ainda com a possibilidade dos ativos serem incorporados diretamente às gotas de monômero. Tal técnica é chamada de incorporação *in situ* e permite trabalhar com grandes quantidades de ativo. No entanto, são poucos os trabalhos que relatam o uso dessa prática. O Laboratório de Modelagem e Simulação de Processos (LMSCP) já apresenta trabalhos em polimerização em miniemulsão fazendo uso da técnica de incorporação *in situ*, tais como FONSECA *et al.* (2013) e LORCA *et al.* (2012).

A incorporação *in situ* do ativo foi testada por FONSECA *et al.* (2013) para a produção de nanopartículas de PMMA carregadas com o fármaco praziquantel, via polimerização em miniemulsão. O grupo ainda avaliou a influência do mecanismo de agitação, comparando o uso do Ultraturrax e do homogeneizador de alta pressão para realizar as dispersões. Frente a variadas condições experimentais, foi observado que a incorporação do fármaco não afetou as taxas de reações; no entanto, os autores sugerem que o mesmo atue como um agente de transferência de cadeia, modificando a distribuição de massas molares do polímero final. Além disso, o melhor desempenho das nanopartículas foi obtido com o uso do homogeneizador de alta pressão, que proporcionou maior estabilidade e elevadas eficiências de encapsulação.

LORCA *et al.* (2012) também utilizaram o mesmo processo para formar nanopartículas de PMMA contendo o filtro solar benzofenona-3. No entanto, os autores observaram um aumento da massa molar do polímero final com a incorporação do ativo, indicando a influência do ativo cosmético na reação de polimerização. Apesar disso, as formulações mostraram-se

estáveis e com diâmetros compatíveis com o objetivo pretendido, ao redor de 200 nm. Dando continuidade ao trabalho, testes de liberação conduzidos por LORCA (2012) mostraram que estas formulações são mais seguras do que as formulações convencionais feitas com o ativo livre.

Baseando-se no trabalho de LORCA *et al.* (2012), WU *et al.* (2014) utilizou a incorporação *in situ* para desenvolver nanopartículas de PMMA contendo diversos filtros solares. No entanto, as nanopartículas não foram produzidas por intermédio da polimerização em miniemulsão, mas por evaporação de solvente.

2.4.2.2 Uso de biopolímeros nas nanoemulsões

Os biopolímeros são polímeros naturais, sintetizados por organismos vivos, incluindo por exemplo as proteínas, os polissacarídeos, e os ácidos nucleicos (DNA e RNA). Estes materiais são em sua grande maioria biocompatíveis, de forma que, assim como os polímeros sintéticos, são bastante utilizados nos sistemas de encapsulamento e liberação de fármacos. De acordo com ORÉFICE (2011), estes materiais são amplamente utilizados para a regeneração da pele, por apresentarem melhor interação com as células e fluidos do organismo do que os materiais sintéticos.

Da classe dos polissacarídeos, a quitosana é um polímero obtido da desacetilação parcial da quitina e está presente em conchas de crustáceos. Caracteriza-se por apresentar uma estrutura cristalina altamente organizada e, como consequência, é insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos. Devido à presença dos grupos amino (Figura 2.13), dissolve em soluções aquosas de ácidos orgânicos e inorgânicos (LARANJEIRA *et al.*, 2009). As propriedades desse biopolímero podem variar com o grau de desacetilação, o conteúdo de impurezas e a massa molar (ANCHISI *et al.*, 2004).

Nas aplicações de liberação controlada de ativos, a quitosana tem sido amplamente utilizada para a produção de nanopartículas, devido à baixa toxicidade, boa estabilidade, além do método de preparo simples (DASH *et al.*, 2011; LARANJEIRA *et al.*, 2009). Assim como

os demais polissacarídeos, a quitosana apresenta excelente biodegradabilidade e biocompatibilidade.

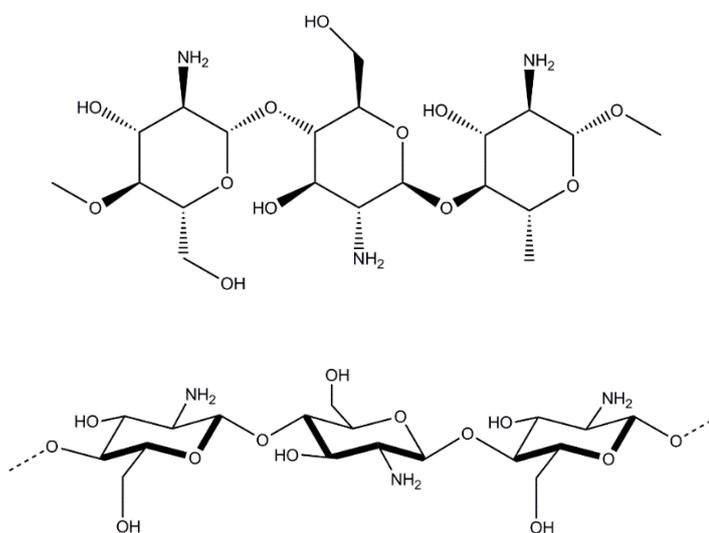


Figura 2.13: Estrutura química da quitosana.

O uso da quitosana em formulações fotoprotetoras é justificado pelo caráter catiônico desse material, que facilita a interação das nanopartículas com o estrato córneo, superfície carregada negativamente. Dessa forma, pode haver aumento no tempo de permanência do ativo na pele, reforçando a propriedade de bioadesividade deste biopolímero (LARANJEIRA *et al.*, 2009). Tal característica foi confirmada por SIQUEIRA (2008), com auxílio de ensaios de permeação cutânea realizados em nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona), contendo o filtro solar benzofenona-3, revestidas com quitosana.

Para produzir sistemas de liberação ocular de fármacos, CALVO *et al.* (1997) estudaram o uso de polímeros com propriedades catiônicas (quitosana e poli-L-lisina (PLL)) para revestimento de nanocápsulas de policaprolactona. Apesar de ambos os polímeros apresentarem carga de superfície positiva, apenas as nanocápsulas revestidas com quitosana apresentam melhora na penetração ocular do fármaco indometacina. GENTA *et al.* (1997) indicaram que, além das boas propriedades adesivas, a quitosana foi eficaz em retardar a liberação dos ativos na aplicação oftalmológica.

COUTINHO (2014) desenvolveu nanoemulsões fotoprotetoras O/A à base de quitosana, que se mantiveram estáveis por pelo menos seis meses. Tal sistema foi formado por 15 % de uma mistura de diversos filtros solares UVA e UVB, combinados com extratos antioxidantes, e por 15 % de uma mistura dos tensoativos Tween[®] 80 e Span[®] 80. Ao comparar os resultados do ensaio de permeação cutânea das formulações contendo e não contendo quitosana, foi claramente perceptível que a presença deste polímero proporcionou um aumento significativo da retenção dos filtros solares sobre a pele.

2.4 Comentários Finais

O uso de protetores solares é de fundamental importância, dado que a exposição excessiva à radiação solar pode causar danos irreparáveis à pele, podendo causar até mesmo o câncer. Técnicas de nanotecnologia, quando aplicadas às formulações fotoprotetoras, garantem maior tempo de permanência dos filtros solares nas camadas mais externas da pele, aumentando a eficácia e a segurança destes produtos.

Diversos sistemas nanoestruturados já foram utilizados para produção de sistemas de liberação de fármacos. Como mostrado por LORCA (2012), as nanopartículas poliméricas de poli(metacrilato de metila) apresentaram características singulares e de extrema valia para o encapsulamento de filtros solares, porém são poucos utilizados neste ramo. Por outro lado, outros sistemas (tais como lipossomas e nanoemulsões) mostram-se mais presentes e mais utilizados na área farmacêutica. As nanopartículas poliméricas, nanoemulsões e lipossomas apresentaram melhora da eficácia e segurança quando utilizados como sistemas de encapsulamento, como mostrado por COUTINHO (2014), LORCA (2012) e MONTEIRO *et al.* (2012).

De forma a esclarecer as vantagens e desvantagens relativas ao uso de nanopartículas poliméricas para a formulação de produtos nanoencapsulados, este trabalho tem como objetivo avaliar os processos de nanoencapsulamento de filtros solares, averiguando aspectos relacionados à estabilidade dos produtos e eficiência dos processos.

Capítulo III

Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os filtros solares utilizados ao longo do trabalho foram:

1. Avobenzona (AVO), fornecido pela Comércio e Indústria Farmos com 99 % de pureza, apresentado na forma de pó;
2. Benzofenona-3 (BZ), fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 98 %, apresentado na forma de pó.

Os materiais utilizados ao longo do processo de preparação e caracterização dos materiais nanoestruturados são listados a seguir para cada sistema estudado.

3.1.1 Lipossomas Multilamelares

- Reagentes

Os reagentes foram utilizados como recebido, sem nenhuma etapa extra de purificação.

1. Acetona P.A., fornecido pela Vetec Química Fina com 99,5 % de pureza, usada para limpeza das vidrarias;
2. Ácido clorídrico P.A., fornecido pela Vetec Química Fina estando em uma solução de 37 % em massa, usado para correção de pH;
3. Água destilada, usada no preparo da solução tampão TRIS e na análise de distribuição de tamanho de partículas;
4. Colesterol, fornecido pela Sigma Aldrich com 99 % de pureza, usado como componente da fase oleosa;

5. Clorofórmio P.A., fornecido pela Vetec Química Fina com 99,8 % de pureza, usado para solubilizar a fase oleosa;
6. Etanol P.A., fornecido pela Vetec Química Fina com 99,8 % de pureza, usado no preparo das soluções de leitura no espectrofotômetro UV-Vis;
7. Fosfatidilcolina de soja – Phospholipon[®] G, fornecido pela Lipoid, com 96,9 % de fosfatidilcolina, usado como componente da fase oleosa;
8. Nitrogênio líquido, usado na etapa de congelamento da criofratura;
9. Sephadex[®] G-50, fornecido pela Sigma Aldrich, usado na coluna de separação dos lipossomas;
10. Tris(hidroximetil amino metano) P.A., fornecido pela Synth com teor mínimo de 99,8 %, usado como componente da fase aquosa.

- Equipamentos e acessórios

A seguir são listados os equipamentos e acessórios usados para a preparação e caracterização dos lipossomas multilamelares.

1. Agitador de tubos (IKA Labortechnik, modelo VF2), utilizado para fornecer agitação vigorosa e facilitar o desprendimento do filme lipídico;
2. Analisador de tamanho de partícula (Malvern Instruments ZetaSizer, modelo Nano-ZS), usado para a determinação da distribuição de tamanhos de partícula por espalhamento dinâmico de luz;
3. Balança analítica com capacidade para pesar materiais de 100 mg até 210 g (BEL Equipamentos Analíticos LTDA, modelo U210A), utilizada na pesagem de reagentes e produtos reacionais;
4. Balões de fundo redondo com volumes na faixa de 50 a 125 mL, para serem utilizados no rota-evaporador.
5. Balões volumétricos com volumes na faixa de 10 a 50 mL, usados para o preparo das soluções a serem analisadas no espectrofotômetro;
6. Colunas PD-10 vazias (GE Healthcare), utilizadas para na etapa de separação dos lipossomas por cromatografia;

7. Equipamento de preparação de amostras (LEICA, modelo EM BAF060), utilizado para análise de criofratura;
8. Espectrofotômetro UV-VIS (Perkin-Elmer, modelo Lambda 35), utilizado para as análises de eficiência de encapsulação;
9. Membranas para filtração (ISOPORE™) de policarbonato com 25 mm de diâmetro e 0,40 µm de diâmetro de poro utilizadas para a filtração das amostras no suporte para filtração SWINEX®;
10. PHmetro de bancada (GEHAKA, modelo PG 1800), para avaliação do pH da solução tampão TRIS;
11. Rota-evaporador (BÜCHI, modelo R-215), utilizado para a evaporação do solvente orgânico;
12. Seringas descartáveis de 10,0 mL sem agulha (SR – Saldanha Rodrigues LTDA.), usadas para a filtração;
13. Suporte de filtração (SWINEX®) em polipropileno com 25 mm de diâmetro.

3.1.2 Nanoemulsão de Quitosana

- Reagentes

Os reagentes foram utilizados como recebido, sem nenhuma etapa de purificação.

1. Acetona P.A., fornecido pela Vetec Química Fina com 99,5% de pureza, usada para limpeza das vidrarias;
2. Ácido glicólico, fornecido pela Vetec Química Fina sendo solução aquosa a 70 %. Usada para o preparo da solução de Quitosana;
3. Água destilada, usada como fase aquosa da nanoemulsão e na análise de distribuição de tamanho de partículas;
4. Monooleato de sorbitano (Span® 80), fornecido pela Sigma Aldrich, com EHL $4,3 \pm 1,0$, usado como tensoativo;
5. Polissorbato 80 (Tween® 80), fornecido pela Sigma Aldrich, com EHL $15,0 \pm 1,0$, usado como tensoativo;

6. Quitosana de peso molecular médio, fornecido pela Sigma-Aldrich, usada como componente da fase aquosa.

- Equipamentos e acessórios

A seguir são listados os equipamentos e acessórios usados para a preparação e caracterização da nanoemulsão à base de quitosana.

1. Analisador de tamanho de partícula (Malvern Instruments ZetaSizer, modelo Nano-ZS), usado para a determinação da distribuição de tamanhos de partícula por espalhamento dinâmico de luz;
2. Balança analítica com capacidade para pesar materiais de 100 mg até 210 g (BEL Equipamentos Analíticos LTDA, modelo U210A), utilizada na pesagem de reagentes e produtos reacionais;
3. Bécheres com capacidades variando entre 50 a 100 mL, utilizados para preparo de soluções, e pesagem de reagentes;
4. Placa de agitação (IKA, modelo C-MAG HS7), utilizada para homogeneização das soluções;
5. Sonicador (Branson Digital Sonifier[®], modelo 450) equipado com câmara acústica, utilizado para dispersão das nanoemulsões, com potência máxima de 400 W.

3.1.3 Nanopartículas Poliméricas de PMMA

- Reagentes

Os reagentes foram utilizados como recebido, sem nenhuma etapa de purificação.

1. Acetona P.A., fornecido pela Vetec Química Fina com 99,5% de pureza, usada para limpeza das vidrarias;
2. Água destilada, usada no preparo das soluções persulfato de potássio, lauril sulfato de sódio e bicarbonato de sódio e na análise de distribuição de tamanho de partículas;
3. Bicarbonato de sódio (NaHCO₃), fornecido pela Proquimios com pureza mínima de 99,7 %, utilizado como tampão na polimerização em miniemulsão;

4. Etanol P.A., fornecido pela Vetec Química Fina com 99,8 % de pureza, usado no preparo das soluções de leitura no espectrofotômetro UV-Vis;
5. Lauril sulfato de sódio (LSS), fornecido pela Vetec Química Fina, com teor mínimo de 90 %. Usado como emulsificante na polimerização em miniemulsão;
6. Metacrilato de metila (MMA), fornecido pela Sigma Aldrich com pureza mínima de 99,5 %, utilizado como monômero na polimerização em miniemulsão;
7. Persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99 %, utilizado como iniciador das reações de polimerização em miniemulsão;
8. Tetrahidrofurano (THF) grau HPLC/Spectro, fornecido pela Tedia Company Inc, utilizado nas análises de GPC, como fase móvel e na solubilização das amostras.

- Equipamentos e acessórios

A seguir são listados os equipamentos e acessórios para a obtenção e caracterização dos nanopartículas poliméricas.

1. Analisador de tamanho de partícula (Malvern Instruments ZetaSizer, modelo Nano-ZS), usado para a determinação da distribuição de tamanhos de partícula por espalhamento dinâmico de luz;
2. Analisador térmico (Perkin Elmer, modelo DSC 8500), utilizado para avaliar a interação entre o ativo e o polímero;
3. Balança analítica com capacidade para pesar materiais de 100 mg até 210 g (BEL Equipamentos Analíticos LTDA, modelo U210A), utilizada na pesagem de reagentes e produtos reacionais;
4. Balões volumétricos com volumes variando entre 25 e 100 mL, usados para o preparo das soluções a serem analisadas no espectrofotômetro;
5. Banho de Ultrassom (Branson, modelo DHA-1000), usado para acelerar a solubilização das amostras das nanopartículas poliméricas;
6. Bécheres com capacidades variando entre 50-100 mL, utilizados para preparo de soluções e pesagem de reagentes;

7. Cromatógrafo (Viscotek, modelo GPC Max VE 2001). Utilizado para determinação das massas molares dos polímeros;
8. Espectrofotômetro UV-VIS (Perkin-Elmer, modelo Lambda 35), utilizado nas análises de eficiência de encapsulação;
9. Estufa de circulação (Quimis), usada para a secagem das amostras;
10. Funil de vidro para a alimentação dos componentes das reações no reator;
11. Homogeneizador de alta pressão (Artepeças, modelo APLAB-10 - 1.000 Bar), usado para o preparo da miniemulsão;
12. Microscópio eletrônico de varredura (JEOL Milestones, modelo 6460LV), usado para as análises de morfologia das nanopartículas;
13. Mini-reator de vidro com capacidade de 100 mL (EasyMax™ 102 - Mettler Toledo) encamisado, equipado com termopar, agitador e condensador, utilizado para a realização das reações de polimerização;
14. Placa de agitação (IKA, modelo C-MAG HS7), utilizada para homogeneização das soluções.

3.2 Métodos

3.2.1 Reações

O procedimento adotado para a obtenção de cada um dos sistemas nanoestruturados está descrito detalhadamente a seguir.

3.2.1.1 Lipossomas Multilamelares

Como o objetivo principal é realizar o encapsulamento de ativos cosméticos lipofílicos, há a preferência de se trabalhar com lipossomas multilamelares, de forma a aumentar os “locais de armazenamento” dos ativos. Os lipossomas multilamelares foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico, em que os componentes são divididos em fase oleosa e aquosa. Os componentes são apresentados na Tabela 3.1. A receita experimental é baseada no trabalho de

GARCIA (1988), em que a concentração molar de filtro solar é igual a 15 % em relação a concentração molar total de lipídios.

Tabela 3.1: Receita experimental usada para o preparo dos lipossomas multilamelares pelo método de hidratação do filme lipídico.

Componentes	Concentração (mM)	Massa (g)
<u>Fase Oleosa:</u>		
Phospholipon [®] 90	42,0	0,1695
Colesterol	12,0	0,0232
Filtro solar (AVO ou BZ)	8,1	0,0126 g _{AVO} ou 0,0092 g _{BZ}
<u>Fase Aquosa:</u>		
Solução tampão TRIS pH=6,8	5,0 mL	

O preparo da solução tampão TRIS consistiu em pesar 2,42 g de tris(hidroximetil amino metano), sendo transferido para um balão volumétrico de 100 mL e em seguida completado com água destilada. Ao final, foi feito o ajuste do pH da solução para 6,8 utilizando ácido clorídrico concentrado.

Para o preparo dos lipossomas multilamelares, inicialmente os componentes da fase oleosa foram pesados em um balão de fundo redondo, para então serem dissolvidos em 4,0 mL de clorofórmio. Para que ocorresse a evaporação do solvente orgânico, a solução foi levada ao rota- evaporador a 20 rpm e 250 mbar, em banho-maria a 55 °C, durante 1 hora. Ao final desta etapa, ocorreu a formação de um filme fino do material lipídico no fundo do balão. Para que não houvesse qualquer vestígio do solvente, o balão era mantido em um dessecador por 24 horas.

Na etapa seguinte ocorria a hidratação do filme lipídico com a adição de 5,0 mL da solução tampão TRIS pH = 6,8. Com o intuito de facilitar o desprendimento do filme lipídico, era feita a adição de pérolas de vidro ao balão, sendo o mesmo levado a um agitador de tubos

para proporcionar uma agitação vigorosa. Após a etapa de hidratação, as vesículas se desprendiam do balão, formando os lipossomas multilamelares.

De acordo com VERMURI *et al.* (1995), a eficiência de encapsulamento está diretamente relacionada ao tempo de hidratação. Por isso, optou-se por avaliar a influência do tempo de hidratação utilizando diferentes tempos de hidratação: 24, 48, 72 ou 96 horas.

Por fim, a suspensão lipossomal final era submetida às etapas de normalização das vesículas. Primeiramente, com o auxílio de seringas descartáveis, os lipossomas foram filtrados em suporte de filtração Swinex[®] com 25 mm de diâmetro, contendo membranas de policarbonato com diâmetro de poro de 0,45 µm. Em seguida, é utilizada uma coluna PD-10 contendo gel Sephadex[®] G-50 para que fosse feita a separação do material ativo que não foi encapsulado nos lipossomas. A eluição da suspensão lipossomal nesta coluna era feita utilizando a solução tampão TRIS pH=6,8, sendo feita a separação por meio de uma análise visual da turbidez. O roteiro esquemático das atividades de preparo está apresentado na Figura 3.1.

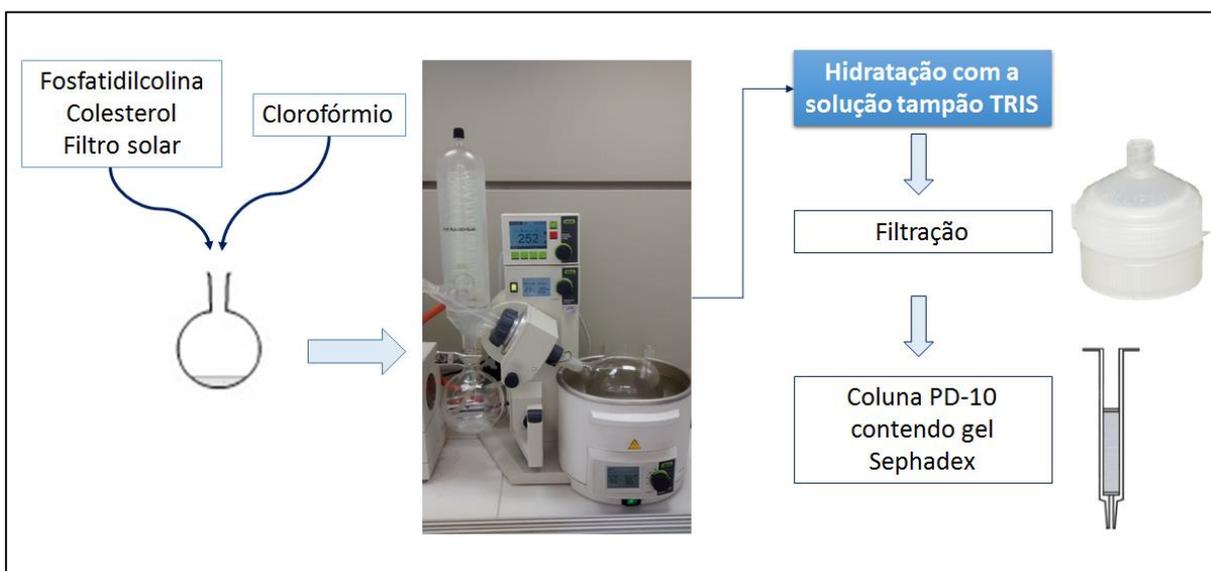


Figura 3.1: Roteiro esquemático do procedimento experimental de preparo dos lipossomas.

3.2.1.2 Nanoemulsão de Quitosana

O preparo das nanoemulsões à base de quitosana e contendo filtro solar foi baseado no trabalho de COUTINHO (2014), por causa do fácil preparo e da alta estabilidade obtida. No entanto, diante da ausência da fase oleosa na receita experimental descrita por COUTINHO (2014), do ponto de vista técnico tal sistema não caracteriza-se como uma nanoemulsão. Dessa forma, optou-se por realizar testes sem e com a inclusão de um óleo vegetal à receita experimental. A receita experimental referente a este sistema nanoestruturado está descrita na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Receita experimental usada para o preparo da nanoemulsão.

Componentes	Concentração (% m/m)	Massa (g)
Tween [®] 80	12,0	2,40
Span [®] 80	3,0	0,60
Filtro solar (AVO ou BZ)	5,0	1,00
Solução de Quitosana a 2 % m/m	10,0	2,00
Óleo de milho	5,0	1,00
Água	Qsp 100 %	12,00
Total:		20,0

Inicialmente, era preparada a solução de quitosana. Para isso, preparava-se anteriormente uma solução de ácido glicólico a 1 % m/m. A solução de quitosana era preparada para que a concentração final fosse igual a de 2 % m/m na solução de ácido glicólico. Esta solução foi mantida sob agitação à 800 rpm durante 24 horas. Em paralelo, os tensoativos eram pesados e homogeneizados com o filtro solar e o óleo de milho. Em seguida, eram adicionados os ingredientes restantes: a solução de quitosana e água. A mistura final era levada ao sonicador por 30 minutos na amplitude de 100 %. Por conta do tempo de preparo e da amplitude alta, era necessário utilizar um banho de gelo para o controle da temperatura, de forma a evitar o superaquecimento. O roteiro esquemático das atividades de preparo está apresentado na Figura 3.2.

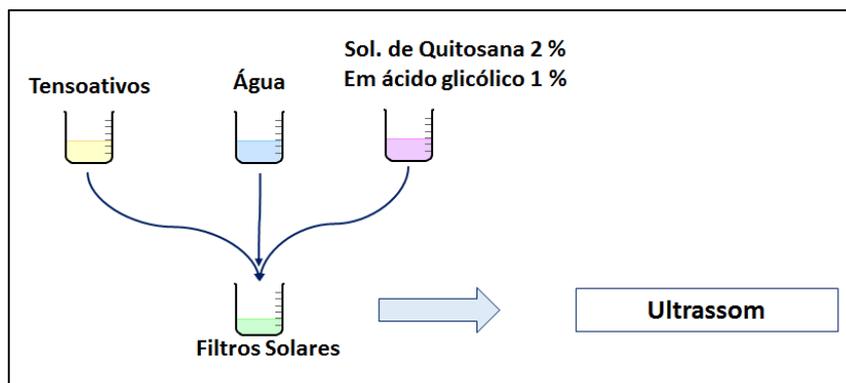


Figura 3.2: Roteiro esquemático do procedimento experimental usado para preparação das nanoemulsões.

3.2.1.3 Nanopartículas poliméricas de PMMA

O preparo das nanopartículas poliméricas de PMMA contendo filtro solar foi feito por intermédio da técnica de polimerização em miniemulsão, baseado no trabalho de LORCA *et al.* (2012). A receita experimental utilizada no sistema de mini-reator está descrita na Tabela 3.3, em que a quantidade de filtro solar usada foi de 30 % (% m/m) em relação à carga de monômero. Além disso, a fim de aumentar o tamanho das nanopartículas, foi feito um acréscimo de uma carga extra de PMMA na emulsão, representando 10 % (% m/m) em relação ao monômero.

Tabela 3.3: Receita experimental usada para o preparo das nanopartículas de PMMA via polimerização em miniemulsão.

Componentes	Função	Massa
Lauril sulfato de sódio (LSS)	Tensoativo	1,2400 g + 12,400 g _{H2O}
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	Agente tamponante	0,0074 g + 7,688 g _{H2O}
Persulfato de potássio (K ₂ S ₂ O ₈)	Iniciador	0,1490 g + 7,688 g _{H2O}
Água destilada (H ₂ O)	Solvente	28,520 g
Metacrilato de metila (MMA)	Monômero	24,800 g
Poli (metacrilato de metila) (PMMA)	Polímero	2,480 g
Filtro solar (AVO ou BZ)	Ativo	7,440 g

Na primeira etapa, as soluções de LSS, NaHCO_3 e $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ eram preparadas, mantendo-as sob agitação durante 20 minutos aproximadamente. A solução de LSS era ligeiramente aquecida para acelerar a completa solubilização. Em seguida, o filtro solar (AVO ou BZ) era solubilizado no monômero MMA, sendo também feita a adição da carga de polímero PMMA. Estando o sistema completamente solúvel, iniciava-se a etapa de dispersão com a adição das soluções de LSS e NaHCO_3 e da H_2O à mistura. Esta mistura era mantida sob agitação durante 30 minutos.

A etapa seguinte caracterizava-se pelo preparo da miniemulsão, com o uso do homogeneizador de alta pressão a 100 bar durante 20 minutos.

A última etapa era constituída pela polimerização propriamente dita, quando a miniemulsão retirada do homogeneizador era vertida no minireator através do orifício na tampa. Somente nesta etapa ocorria a adição da solução de iniciador ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), de forma a evitar que a polimerização se iniciasse anteriormente. Para reduzir a perda de monômero do meio reacional, um condensador resfriado a $10\text{ }^\circ\text{C}$ era conectado ao reator. As reações de polimerização ocorriam a $90\text{ }^\circ\text{C}$ e sob agitação de 900 rpm, por tempo de reação de 2 horas. O roteiro esquemático utilizado para preparo das emulsões poliméricas é apresentado na Figura 3.3.

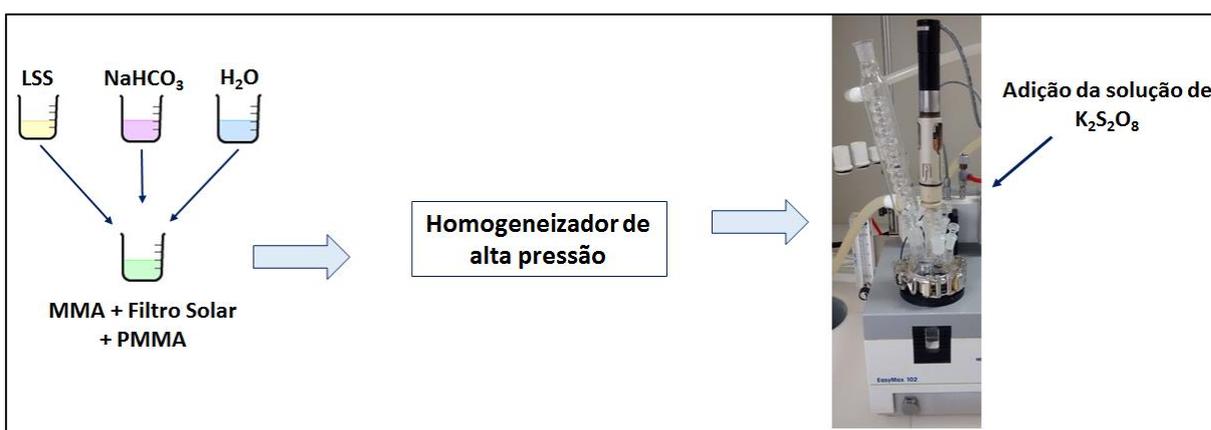


Figura 3.3: Roteiro esquemático do procedimento experimental usado para preparação das nanopartículas poliméricas.

3.2.2 Caracterização

3.2.2.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) são importantes para determinar a temperatura em que se inicia o processo de degradação dos filtros solares. Dessa forma, deve-se evitar o trabalhar nas proximidades dessas condições, de maneira a evitar o comprometimento destes materiais.

As análises de TGA foram realizadas com amostras de 10 mg em um analisador térmico da marca Perkin Elmer (modelo STA-6000), na faixa de 50 a 700 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. As análises foram conduzidas em atmosfera inerte, por conta da utilização de nitrogênio na vazão de 20 mL/min.

3.2.2.2 Eficiência de Encapsulamento

A fim de determinar a quantidade de filtro solar efetivamente encapsulada, as amostras foram analisadas com auxílio do espectrofotômetro UV-VIS da marca Perkin-Elmer (modelo Lambda 35).

Inicialmente, foram feitas curvas de calibração para cada filtro solar (AVO e BZ). Para a construção dessas curvas, uma solução mãe do ativo em etanol era preparada e diluída a diversas concentrações. Ao final, todas as soluções eram analisadas no espectrofotômetro na posição do pico máximo de absorção do ativo ($\lambda_{AVO} = 358 \text{ nm}$ e $\lambda_{BZ} = 335,5 \text{ nm}$ – vide Apêndice A).

Dessa forma, preparou-se uma solução mãe com 0,020 g/L de AVO em etanol. A partir desta solução, foram feitas diluições para a obtenção de soluções nas concentrações de 0,010; 0,009; 0,008; 0,007; 0,005; 0,004; 0,003; 0,002; 0,001 g/L de AVO em etanol. Para o filtro BZ, preparou-se uma solução mãe de 1,0 g/L de BZ em etanol. Após as diluições, obtiveram-se soluções nas concentrações de 0,8; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 g/L de BZ em etanol.

Tendo em mãos as curvas de calibração, os sistemas nanoestruturados puderam então ser analisadas quanto à eficiência de encapsulamento. Para isso, soluções etanólicas das amostras foram preparadas e analisadas no pico de máxima absorção do ativo em questão. Para as nanopartículas poliméricas, as soluções etanólicas tinham concentrações 0,03 g/L de NP-AVO e 1,0 g/L de NP-BZ, sendo preparadas a partir das amostras secas das nanopartículas. As soluções eram mantidas no banho de ultrassom por 30 minutos, para facilitar a solubilização. Antes de serem analisadas, as soluções obtidas eram filtradas com filtros de seringa de 0,45 µm. Para os lipossomas, as soluções etanólicas tinham concentrações 2,5 g/L de LIPO-AVO e 0,28 g/mL de LIPO-BZ. Para estas amostras, não era necessária a utilização do banho de ultrassom nem a etapa de filtração. As nanoemulsões não foram analisadas quanto à eficiência de encapsulamento.

Para confirmar que a medida da absorbância nos comprimentos de onda utilizados nas análises é referente apenas ao ativo, foram analisados também os lipossomas puros e as nanopartículas poliméricas puras, preparados sem os ativos. Os espectros de absorção destas amostras encontram-se no Apêndice B.

3.2.2.3 Distribuição de Tamanhos de Partículas

A determinação da distribuição de tamanhos de partículas foi feita por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz, utilizando um analisador de tamanhos de partícula da marca Malvern Instruments ZetaSizer, modelo Nano-ZS. Esta análise se baseia no espalhamento dinâmico da luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*), associado ao movimento das partículas em um meio sujeito ao movimento browniano. Para a realização da análise, foram utilizadas cubetas de quartzo. Uma gota da amostra a ser analisada era depositada na cubeta, e o restante do volume era preenchido com água destilada. Com o auxílio da pipeta *pasteur*, esta solução era homogeneizada e levada ao equipamento. Todas as amostras dos três sistemas nanoestruturados estudados foram analisados por DLS, utilizando a distribuição de volume.

3.2.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi utilizada para verificar se ocorre interação entre o ativo e o polímero (MAINARDES *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O método termoanalítico mede o fluxo de calor gerado ao aquecer ou resfriar uma amostra, comparando-o com uma amostra de referência (material termicamente estável). A inexistência das transições térmicas características dos ativos indica a dissolução dos materiais na matriz polimérica.

As análises foram realizadas no equipamento da marca Perkin-Elmer (modelo 8500), sendo feita a pesagem de aproximadamente 5 mg da amostra em cadinhos de alumínio fechados. As amostras foram submetidas a uma faixa de aquecimento de 0 a 200 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio. Vale ressaltar que foi utilizada a primeira história térmica, por conta da possível degradação dos ativos e da destruição de domínios cristalinos.

As amostras analisadas por DSC foram compostas pelos filtros solares (AVO e BZ), por PMMA e pelas nanopartículas poliméricas (NP-AVO e NP-BZ).

3.2.2.5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC), também conhecida como cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), foi utilizada para determinar as massas molares médias dos polímeros obtidos. Nesta análise, o polímero é solubilizado em um solvente adequado, para então ser injetado em uma coluna de gel poroso. A porosidade vai permitir a separação das moléculas de diferentes tamanhos de cadeia. As moléculas maiores, como não penetram nos poros da coluna, são eluídas primeiro. Em contrapartida, as moléculas menores precisam que um volume maior de solvente percorra a coluna para que sejam eluídos já que penetram nos poros.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo de permeação em gel da marca Viscotek (modelo GPC Max VE 2001), equipados com um detector refratométrico da marca Viscotek (modelo VE 3580) e um conjunto de colunas lineares da marca Shodex (modelos KF-

804L e KF-805L), com tamanhos máximos de poro de $1,5 \times 10^3$ e 5×10^3 Å. O equipamento foi calibrado com padrões de poliestireno com massas molares na faixa de 5×10^3 a 1×10^6 Da.

Para a realização da análise foram solubilizados 3 mg da amostra em 3 mL do solvente tetrahidrofurano (THF). As análises foram realizadas a 40 °C, usando como fase móvel o solvente THF, que mantido a uma vazão constante de 1,0 mL/min.

As amostras analisadas por GPC foram o PMMA e as nanopartículas poliméricas NP-AVO e NP-BZ.

3.2.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para visualização das superfícies das nanopartículas poliméricas obtidas. Para a realização das análises, as amostras foram metalizadas com ouro. As análises foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL Milestones (modelo 6460LV), equipado com filamento de tungstênio e resolução de 10 nm, operando com tensão máxima de 30 kV. O metalizador utilizado foi o Emitech K550, sob uma taxa de deposição de 50 nm/min e tamanho de partícula de 5 nm.

As amostras analisadas por MEV foram as nanopartículas poliméricas NP-AVO e NP-BZ.

3.2.2.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão - Criofratura

A análise de microscopia eletrônica de transmissão, associada com a técnica de criofratura, foi utilizada com o intuito de analisar a estrutura interna dos lipossomas obtidos, de modo a confirmar a formação das lamelas. O procedimento básico na criofratura consiste em 4 etapas: (i) congelamento das células em nitrogênio líquido; (ii) fratura da amostra em uma câmara à vácuo; (iii) deposição de platina e carbono, formando o molde da superfície fraturada (também chamado de réplica) e (iv) análise no microscópio eletrônico de transmissão. As

análises foram realizadas por intermédio do preparador de amostras da marca LEICA (modelo EMBAF060), pertencente ao Laboratório de Biotecnologia localizado no Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade (INMETRO), porém apenas uma amostra dos lipossomas foi analisada. A amostra foi avaliada antes da etapa de filtração e após a etapa de filtração.

Capítulo IV

Resultados e Discussão

A seguir, são apresentados e discutidos os resultados obtidos para cada sistema nanoestruturado estudado nesta dissertação. Os resultados são apresentados e analisados separadamente, para posterior comparação.

4.1 Caracterização dos Filtros Solares

Os filtros solares utilizados (avobenzona e benzofenona-3) foram previamente caracterizados quanto à estabilidade térmica, a fim de assegurar que estes materiais poderiam ser utilizados nas condições de reação, uma vez que as reações de polimerização em miniemulsão ocorrem a 90 °C. Além disso, nesta sessão também são apresentadas as curvas de calibração de análise de UV para cada filtro solar. Essas curvas foram utilizadas para o cálculo da eficiência de encapsulamento dos sistemas nanoestruturados.

4.1.1 Estabilidade Térmica

O teste de estabilidade térmica foi realizado com o intuito de caracterizar os filtros solares utilizados neste trabalho, de forma a garantir adequação de utilização nas condições de reações.

As análises termogravimétricas (Figura 4.1 e Figura 4.2) apontam a degradação térmica dos filtros solares a temperaturas bem superiores a 100 °C. Desta forma, a utilização destes ativos nas reações de polimerização, conduzidas na temperatura máxima de reação de 90 °C não parece comprometer a estabilidade dos filtros.

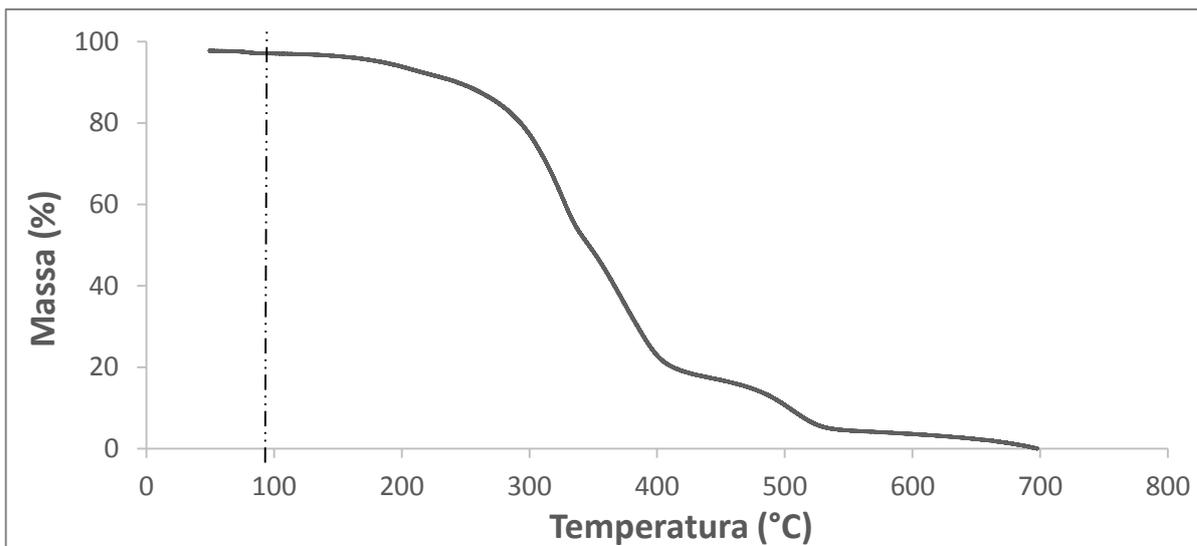


Figura 4.1: Análise termogravimétrica da avobenzona.

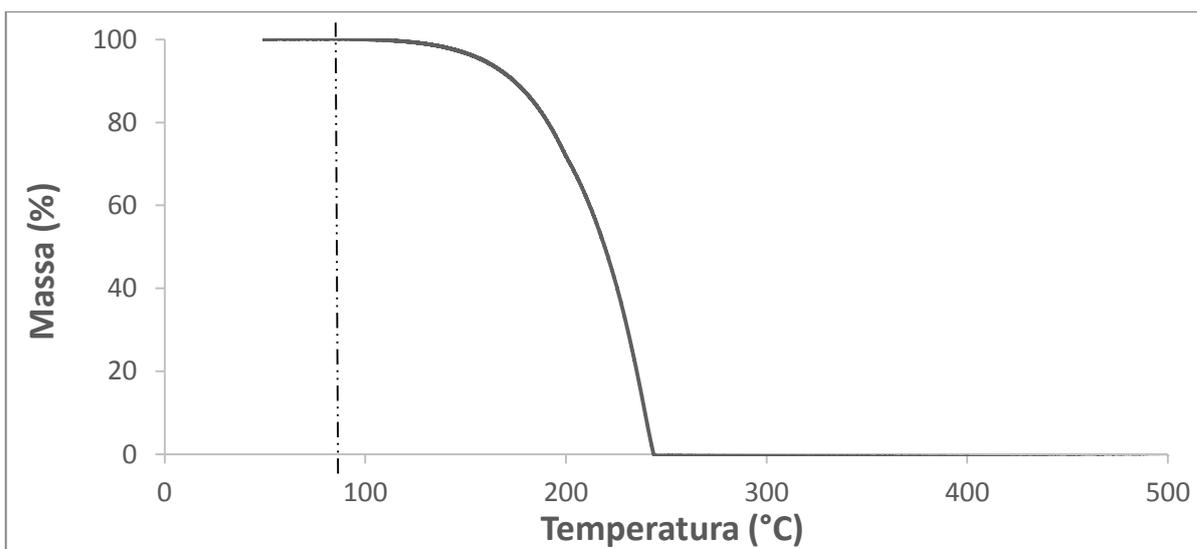


Figura 4.2: Análise termogravimétrica da benzofenona-3.

4.1.2 Curvas de Calibração

Como relatado na seção 3.2.2.2, as curvas de calibração para cada filtro solar devem ser previamente construídas, para permitir o cálculo das eficiências de encapsulamento. Como mostrado adiante, ambas as calibrações obtiveram coeficientes de correlação elevados,

garantindo a credibilidade do ajuste realizado. Em ambos os casos, o comportamento da curva de calibração é essencialmente linear, resultando em coeficientes de correlação superiores a 0,9950, caracterizando a forte correlação das medidas efetivadas. De modo geral, os erros da análise foram pequenos para ambos os filtros solares, indicando a alta reprodutibilidade da análise.

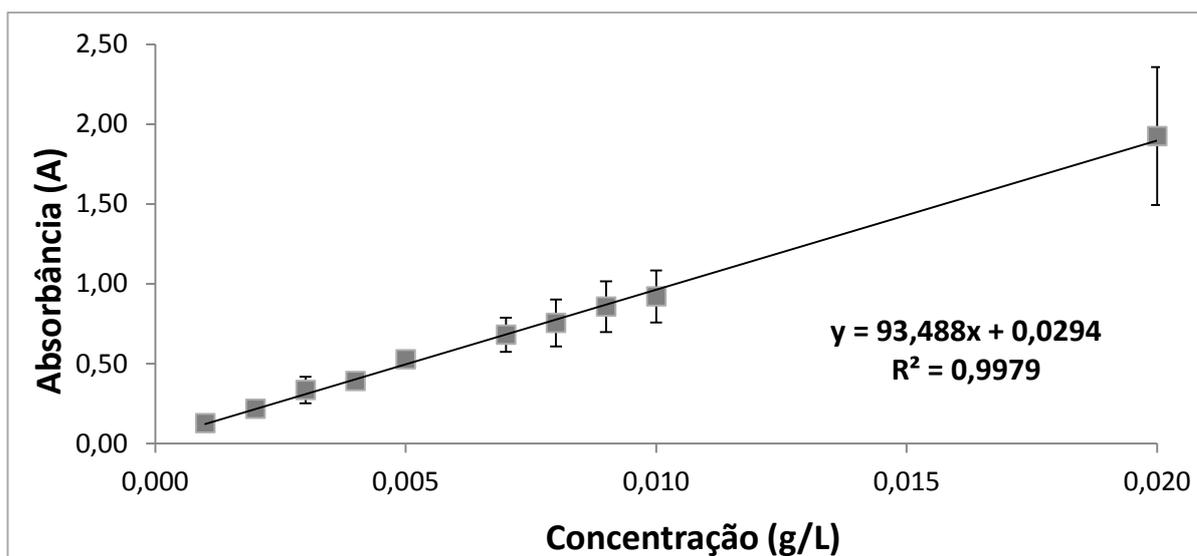


Figura 4.3: Curva de calibração do filtro solar avobenzona, usando etanol como solvente.

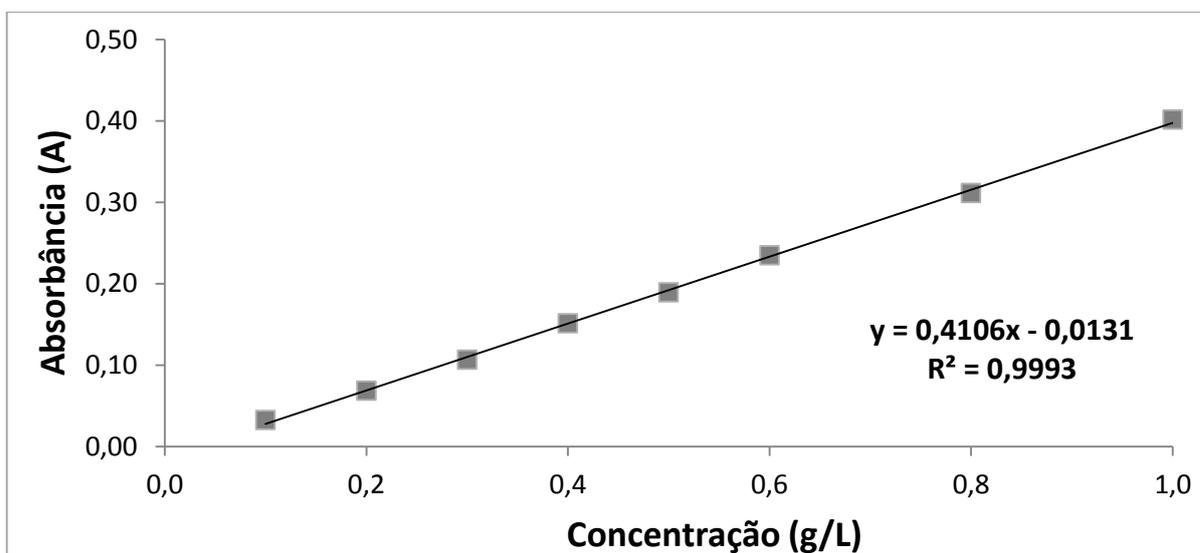


Figura 4.4: Curva de calibração do filtro solar benzofenona-3, usando etanol como solvente.

4.2 Lipossomas Multilamelares

A preparação dos lipossomas multilamelares seguiu o procedimento descrito no Capítulo III, em que foram variados o filtro solar a ser encapsulado e o tempo da etapa de hidratação. A Tabela 4.1 apresenta os diferentes materiais sintetizados.

Vale ressaltar que a temperatura do banho no rota-evaporador utilizada foi de 55 °C, a fim de atingir a temperatura de transição de fase da fosfatidilcolina. Nessa temperatura, BRAGA (2010) acredita que as bicamadas apresentem maior flexibilidade, o que resultaria em maior incorporação do ativo cosmético.

Tabela 4.1: Relação dos lipossomas multilamelares preparados.

Materiais	Filtro Solar	Tempo de Hidratação (h)
LIPO 01	Nenhum	24
LIPO 02	Nenhum	48
LIPO 03	Nenhum	72
LIPO 04	Nenhum	96
LIPO-AVO 01	AVO	24
LIPO-AVO 02	AVO	48
LIPO-AVO 03	AVO	72
LIPO-AVO 04	AVO	96
LIPO-BZ 01	BZ	24
LIPO-BZ 02	BZ	48
LIPO-BZ 03	BZ	72
LIPO-BZ 04	BZ	96

A seguir são apresentados os resultados obtidos das análises de caracterização e avaliação dos lipossomas multilamelares preparados.

4.2.1 Eficiência de Encapsulamento

Os lipossomas multilamelares são estruturas conhecidas pela ampla faixa de tamanhos das vesículas (BHAI *et al.*, 2012; MUFAMADI *et al.*, 2011). Por esse motivo, etapas adicionais para homogeneização são requeridas durante a preparação dos lipossomas. Para conhecimento da influência dessas etapas na qualidade do “produto final”, alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à eficiência de encapsulamento ao final de cada etapa. Vale ressaltar que em teoria, os cálculos referentes às etapas de homogeneização (‘após filtrar’ e ‘após coluna G-50’) nos fornece resultados de rendimento, mas de forma a facilitar o entendimento e a comparação ao longo do processo optou-se por nomeá-los também como eficiência de encapsulamento.

Para o cálculo do teor de filtro solar encapsulado, utilizou-se as curvas de calibração obtidas anteriormente (Figura 4.3 e Figura 4.4). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.2. Para ratificar que a medição da absorbância estava relacionada apenas ao filtro, não sendo influenciada por interposição de outro componente, a análise também foi realizada para o lipossoma puro, preparado sem ativos. No entanto, não foi detectada qualquer absorbância significativa nos comprimentos de onda utilizados para a análise. Os espectros referentes aos lipossomas puros encontram-se no Apêndice B.

Tabela 4.2: Eficiência de encapsulamento dos filtros solares no processo de preparação dos lipossomas multilamelares.

Amostras	Eficiência de Encapsulamento (%)		
	Sem filtrar	Após filtrar	Após Coluna G-50
LIPO-AVO 01	80,69	35,51	18,92
LIPO-AVO 02	78,26	51,31	13,98
LIPO-AVO 03	113,90	67,96	50,39
LIPO-AVO 04	84,14	36,39	37,59
LIPO-BZ 01	92,5	86,86	82,03
LIPO-BZ 02	89,00	64,04	59,65
LIPO-BZ 03	83,79	53,90	55,54
LIPO-BZ 04	95,39	68,84	49,58

Como é possível observar, a inclusão das etapas de separação e homogeneização afeta diretamente a quantidade de filtro solar encapsulado. Isso ocorre porque parte dos lipossomas não especificados é perdida nas operações de filtração e de separação cromatográfica. De forma geral, a filtração com as membranas de polycarbonato é responsável pela perda máxima de quase 50 % ativo cosmético inicialmente encapsulado, indicando o encapsulamento em lipossomas excessivamente grandes. A passagem pela coluna de gel Sephadex® G-50 resulta na perda máxima de aproximadamente 20 % do ativo cosmético, encapsulada nas frações descartadas durante o fracionamento.

Resultados similares foram obtidos por HENRIQUES (2008), que preparou formulações lipossomais contendo os filtros solares avobenzona e 3,4-metilbenzilideno cânfora. Ao trabalhar com uma concentração de 8,4 mM do filtro AVO (próxima à utilizada na presente dissertação), o autor deparou-se com uma perda total de 40 % do ativo. Por isso, o autor preferiu reduzir a concentração do ativo para 6,3 mM. Nesta concentração, a perda do ativo foi de aproximadamente 9 %, apresentando no final do processo cerca de 77,8 % do total de fosfolípidios para 88,3 % do total de filtro solar. Para o outro filtro solar em estudo, HENRIQUES obteve melhores resultados na concentração de 8,4 mM, que apresentou proporção de 78,5 % de fosfolípidios e 74,2 % de filtro solar.

Baseado nos resultados obtidos, verifica-se que as perdas dos ativos no processo de separação dos lipossomas podem ser muito expressivas, particularmente se houver o interesse de controlar a homogeneização das nanopartículas preparadas.

Curiosamente, observa-se que os lipossomas preparados com o filtro solar BZ apresentaram eficiências consistentemente maiores que os preparados com o filtro solar AVO. A amostra LIPO-BZ 01 exibiu comportamento diferenciado, apresentando perdas pouco significativas frente às demais amostras. Ao final do processo de homogeneização, esta amostra foi a que obteve maior teor de BZ incorporado, próximo a 82 %. Portanto, parece claro que a eficiência de encapsulamento depende das características do ativo encapsulado. Como ambos os filtros são insolúveis em água, parece claro que o processo de encapsulamento é regulado pela interação com o fosfolípido e o colesterol.

VERMURI *et al.* (1995) acredita que a etapa de hidratação é a etapa determinante para o aumento da incorporação dos ativos nas vesículas. Por isso, nesta dissertação optou-se por avaliar a influência do tempo de hidratação na eficiência de encapsulamento. No entanto, como mostrado na Tabela 4.2, os resultados não mostraram nenhuma relação consistente entre esses parâmetros. Resultado similar também foi encontrado por SANTOS (2007), quando trabalhou com BZ na mesma concentração. Porém ao reduzir a concentração do filtro solar para 7,0 mM, a influência do tempo de hidratação foi perceptível, resultando em um aumento de aproximadamente 36 % na eficiência de encapsulamento. No caso estudado, a eficiência de encapsulamento de benzofenona-3 parece cair com o tempo de hidratação, antes e após a aplicação dos processos de separação.

4.2.2 Distribuição de Tamanhos de Partícula

As análises de distribuição de tamanhos de partículas dos lipossomas (LIPO, LIPO-AVO e LIPO-BZ) foram obtidas com o auxílio da técnica de espalhamento de luz. A fim de avaliar a estabilidade destes sistemas nanoestruturados, as análises foram realizadas semanalmente, tendo início logo após as etapas de homogeneização. Os resultados estão apresentados na Figuras 4.5, 4.6 e 4.7.

Como pode ser visto na Figura 4.5, os lipossomas apresentaram largas distribuições de tamanho e baixa estabilidade, sendo visualmente aparente a mudança das distribuições de tamanhos de partícula ao longo das semanas. A única exceção foi a amostra ‘LIPO 01’, que apresentou maior similaridade entre as distribuições, indicando que o tempo de hidratação pode afetar a estabilidade dos lipossomas. Apesar da formação de um segundo pico nas amostras ‘LIPO 02’ e ‘LIPO 04’, é relevante observar que as distribuições iniciais de tamanhos foram sempre muito similares, ilustrando a eficiência e relevância das etapas de filtração e homogeneização para o preparo dos lipossomas. A Tabela 4.3 ilustra os tamanhos médios dos lipossomas puros, confirmando a baixa estabilidade dessas estruturas.

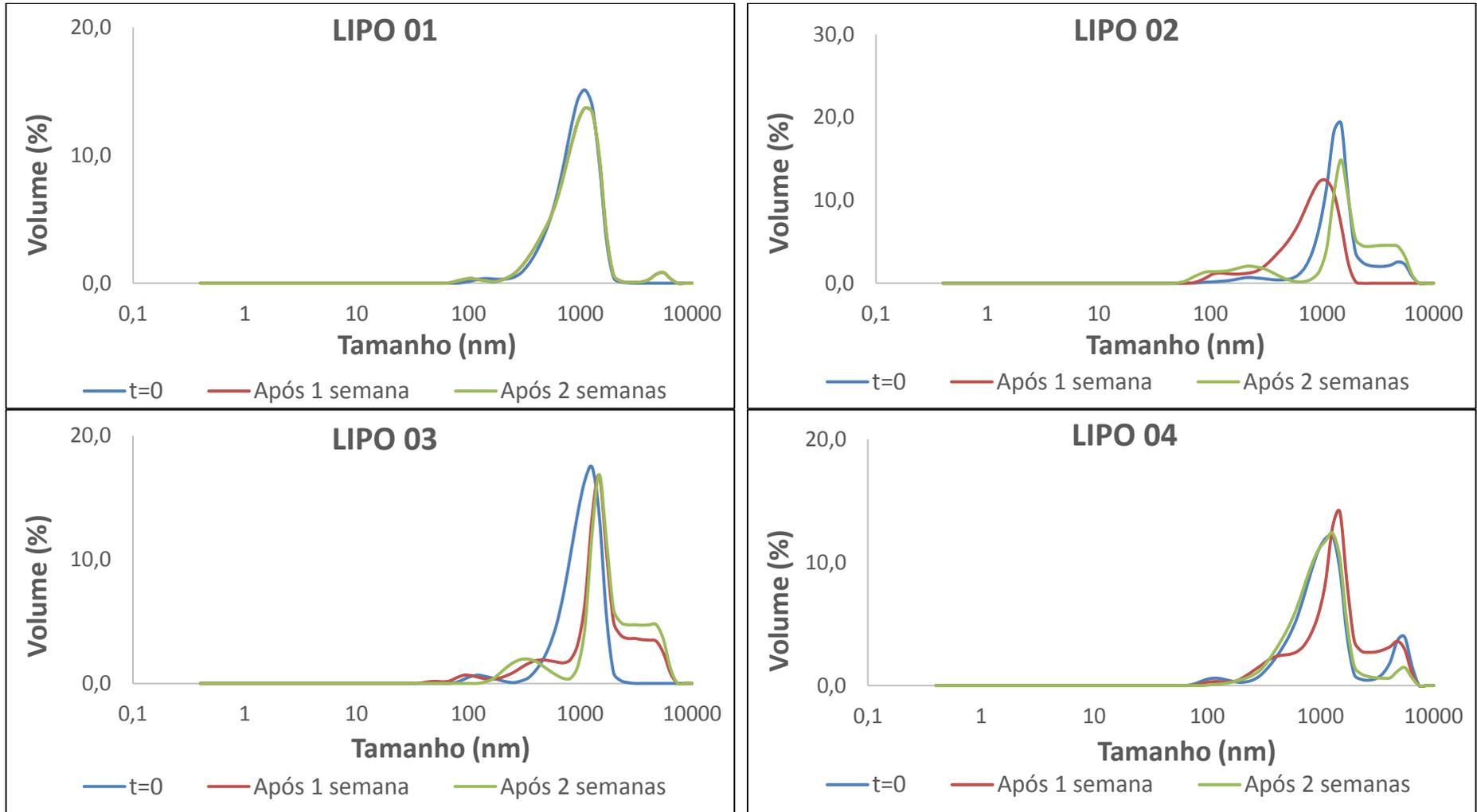


Figura 4.5: Efeito do tempo de hidratação na análise das distribuições de tamanho de partículas dos lipossomas.

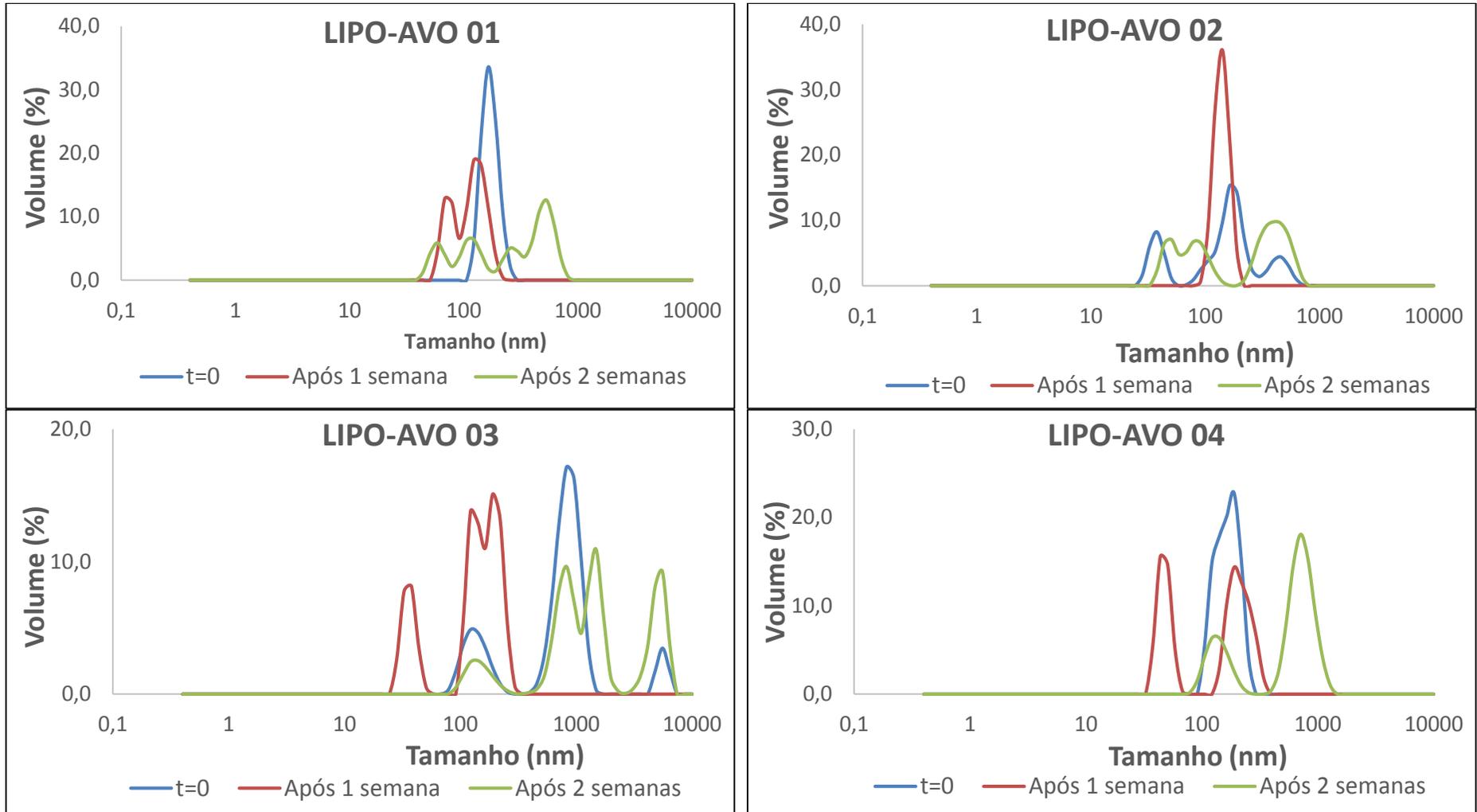


Figura 4.6: Efeito do tempo de hidratação na análise das distribuições de tamanho de partículas dos lipossomas carregados com AVO.

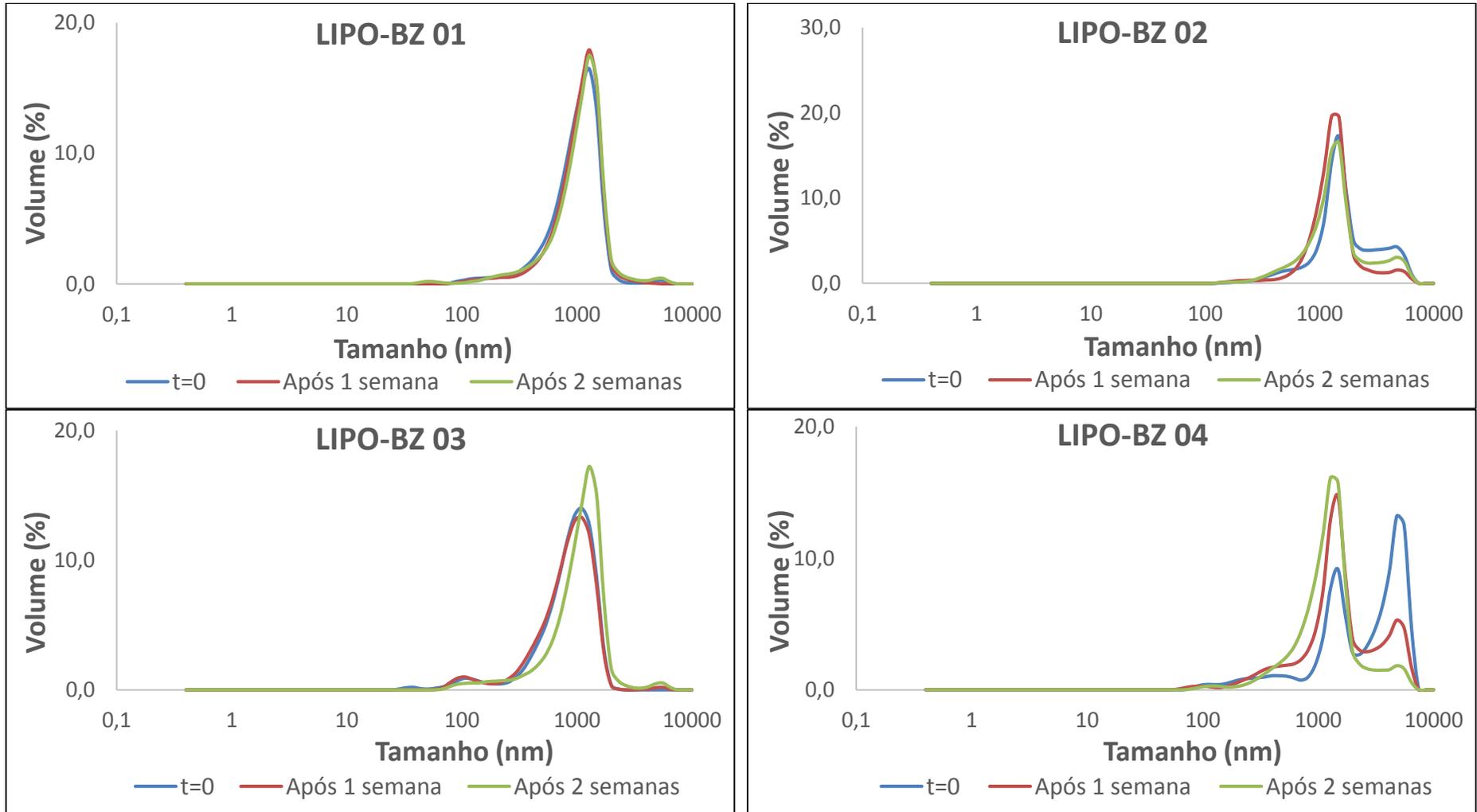


Figura 4.7: Efeito do tempo de hidratação na análise das distribuições de tamanho de partículas dos lipossomas carregados com BZ.

Tabela 4.3: Tamanhos médios dos lipossomas.

Amostras	Diâmetro Médio (nm)		
	t = 0	Após 1 semana	Após 2 semanas
LIPO 01	960,44	1052,97	1060,10
LIPO 02	1684,99	837,03	1924,68
LIPO 03	1058,26	1811,04	2093,46
LIPO 04	1490,75	1721,75	1196,35

Tabela 4.4: Tamanhos médios dos lipossomas carregados com avobenzona e benzofenona-3.

Amostras	Diâmetro Médio (nm)		
	t = 0	Após 1 semana	Após 2 semanas
LIPO-AVO 01	171,11	114,78	310,15
LIPO-AVO 02	182,01	140,61	256,87
LIPO-AVO 03	1031,14	140,33	2063,30
LIPO-AVO 04	168,50	147,27	582,48
LIPO-BZ 01	1072,07	1113,83	1171,59
LIPO-BZ 02	2006,54	1518,49	1714,88
LIPO-BZ 03	908,40	908,81	1145,45
LIPO-BZ 04	3026,56	1997,15	1460,71

As Figuras 4.6 e 4.7 mostram a influência da incorporação dos ativos lipofílicos na estabilidade das nanoestruturas. Nota-se que a presença da avobenzona provocou uma maior instabilidade ao sistema. A benzofenona-3 também resultou na instabilidade das vesículas; no entanto, é claramente perceptível que esse comportamento não foi tão drástico quanto no caso da avobenzona. Estes resultados mostram a influência do ativo a ser encapsulado na estabilidade das vesículas lipossômicas. De forma similar à observada anteriormente, embora as distribuições iniciais sejam similares, parece claro que o tempo de hidratação exerce efeito

deletério sobre a estabilidade dos lipossomas. Esse aspecto não foi estudado com detalhes em trabalhos anteriores, parecendo ser conveniente não fazer a hidratação por mais de 24 h.

Os resultados obtidos mostram uma vez mais que a interação do ativo com o fosfolípido pode afetar sobremaneira propriedades do produto obtido. Apesar de encapsulado de forma menos eficiente, a avobenzona exerce efeito mais marcante sobre a estabilidade dos lipossomas, o que provavelmente indica o desarranjo da estrutura lipossomal pela avobenzona.

Como mostrado na Tabela 4.4, os lipossomas carregados com avobenzona apresentaram tamanhos médios menores o que pode estar relacionado com a menor eficiência de encapsulamento, resultando em vesículas menores. No caso dos lipossomas com benzofenona-3, que apresentaram eficiências de encapsulamento melhores, a tabela indica a formação de partículas maiores, com tamanhos superiores ao indicado para a aplicação transdérmica.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (Criofratura)

A microscopia eletrônica de transmissão associada com a técnica de criofratura permitiu uma avaliação visual mais detalhada das vesículas, possibilitando a investigação da estrutura interna dos lipossomas. Além disso, foi possível avaliar por imagens a distribuição de tamanhos das vesículas. As imagens obtidas estão mostradas nas Figuras 4.8 e 4.9.

Na Figura 4.8-A é possível visualizar que, antes da etapa de filtração, os lipossomas apresentavam uma ampla variedade de tamanhos de vesículas. Verifica-se também a formação de estruturas esféricas, como relatado na literatura (AKBARZADEH *et al.*, 2013; TORCHILIN *et al.*, 2005). Visualizando uma única vesícula (Figura 4.8-B e C), confirma-se a existência de múltiplas lamelas, caracterizando a concepção de lipossomas multilamelares, como desejado (BHAI *et al.*, 2012). A Figura 4.9 ilustra a mudança na distribuição de tamanhos na amostra após a etapa de filtração. Pode-se perceber a predominância de vesículas menores, em função do fracionamento da mistura.

A partir da Figura 4.8, pode-se especular que o tempo de hidratação exerce um efeito na camada multilamelar que compõe as paredes do lipossoma. Parece claro que as paredes

lipossomais são formadas por múltiplas camadas lipídicas, que talvez fiquem menos espessas com o aumento do tempo de hidratação. Isso também pode justificar a queda da eficiência de encapsulamento com o tempo de hidratação, dado que partículas de tamanho similar poderiam ter paredes lipídicas de espessuras distintas. Essas especulações devem ser avaliadas no futuro por estudos detalhados de microscopia.

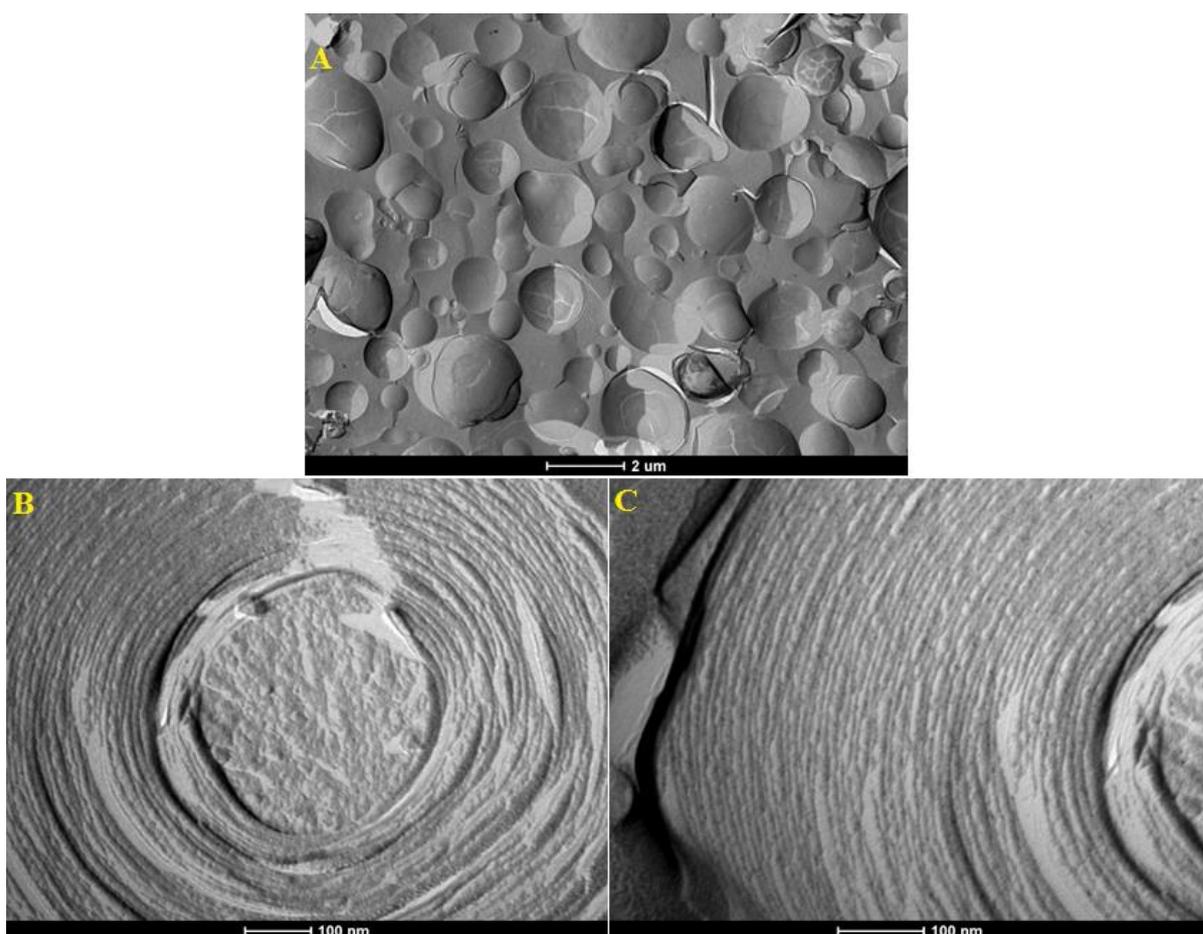


Figura 4.8: Imagens obtidas a partir de análises de microscopia eletrônica de transmissão com criofratura do lipossoma antes da etapa de filtração, sendo (A) uma visão geral da amostra e (B e C) a visão de uma única vesícula.

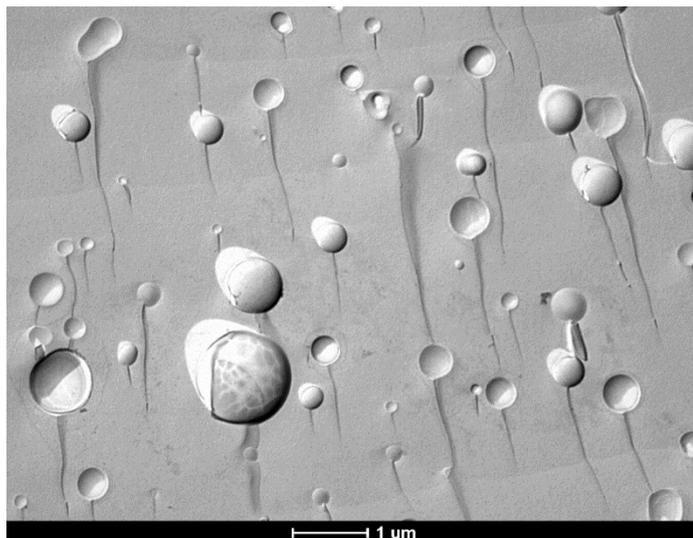


Figura 4.9: Imagens obtidas a partir de análises de microscopia eletrônica de transmissão com criofratura do lipossoma uma semana depois de realizada a etapa de filtração.

4.3 Nanoemulsão de Quitosana

A preparação das nanoemulsões à base de quitosana seguiram o procedimento descrito no Capítulo III, baseado no trabalho de COUTINHO (2004). Vale ressaltar que o autor utilizou em seu trabalho diversos filtros solares (sólidos e líquidos) em conjunto, obtendo uma mistura homogênea após o aquecimento e contínua agitação. No entanto, na presente dissertação os filtros solares escolhidos são sólidos; por isso, optou-se por realizar os experimentos de forma exploratória, sem que fosse seguido um plano experimental previamente definido.

Por conta dos resultados obtidos e mostrados adiante, somente as nanoemulsões contendo avobenzona foram preparadas. Na Tabela 4.5 são listadas as amostras preparadas ao longo do trabalho. O experimento inicial (NE-AVO 1º teste) foi realizado segundo a receita experimental descrita na Tabela 3.2, porém, esta nanoemulsão mostrou-se instável, ocorrendo separação de fases pouco tempo do preparo (Figura 4.10).

Tabela 4.5: Relação das nanoemulsões preparadas.

Amostras	Avobenzona (%)	Observação
NE-AVO 1° teste	15 %	-
NE-AVO 2° teste	10 %	-
NE-AVO 3° teste	10 %	Fase Oleosa: 5 % de Avobenzona 5 % de Óleo de Milho



Figura 4.10: Análise visual da amostra NE-AVO 1° teste: (A) imediatamente após o preparo; (B) após 15 minutos em repouso.

A análise de distribuição de tamanhos, por meio da técnica de espalhamento de luz, foi realizada logo após o preparo da nanoemulsão, enquanto ainda apresentava aspecto homogêneo, como indicado na Figura 4.11. Percebe-se que a nanoemulsão apresentou tamanhos de partícula elevados, apesar da distribuição estreita. Por uma questão prática, os sistemas nanoestruturados para encapsulamento de filtro solar devem apresentar tamanhos de partículas na faixa de 100 a 300 nm, de maneira que as partículas preparadas parecem inapropriadas para esse fim. Como

ocorreu a separação de fases, não foi possível realizar a análise de distribuição de tamanhos ao longo do tempo.

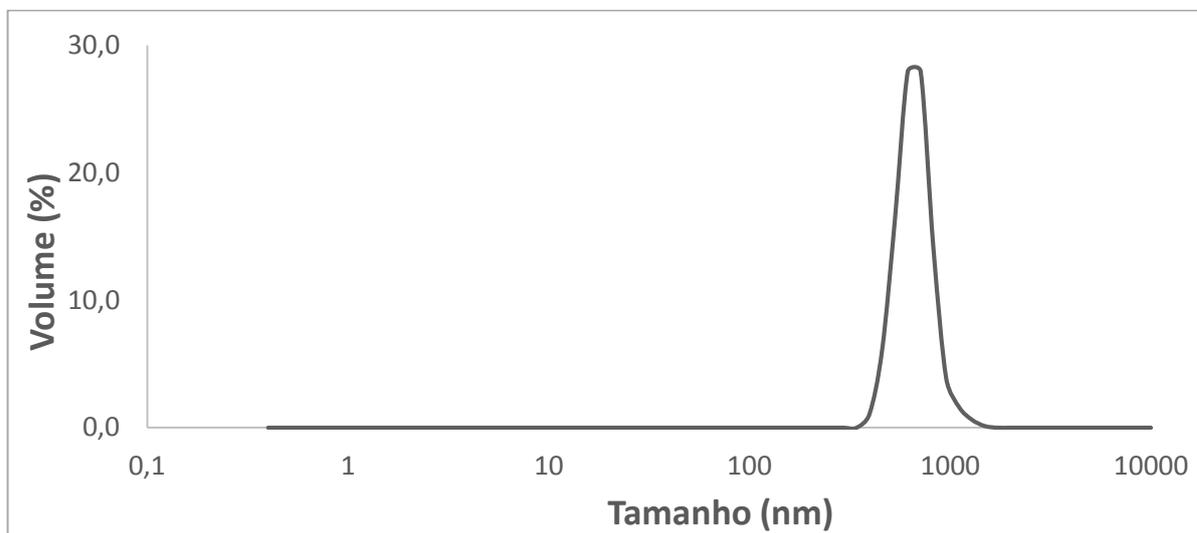


Figura 4.11: Análise de distribuição de tamanhos de partícula para a amostra NE-AVO 1º teste imediatamente após o preparo.

Diante da instabilidade observada no primeiro teste da nanoemulsão, no teste seguinte optou-se por reduzir a concentração de filtro solar para 10 % em relação ao total. No entanto, a nanoemulsão continuou apresentando o mesmo comportamento instável, ilustrado na Figura 4.12. A análise de distribuição de tamanhos de partícula novamente foi realizada enquanto o produto ainda apresentava aspecto homogêneo. Como ilustrado na Figura 4.13, a redução da fase oleosa resultou na diminuição do tamanho médio da partícula. Apesar disso, a distribuição obtida era multimodal, com dispersão de tamanhos muito larga e inadequada para aplicação pretendida.

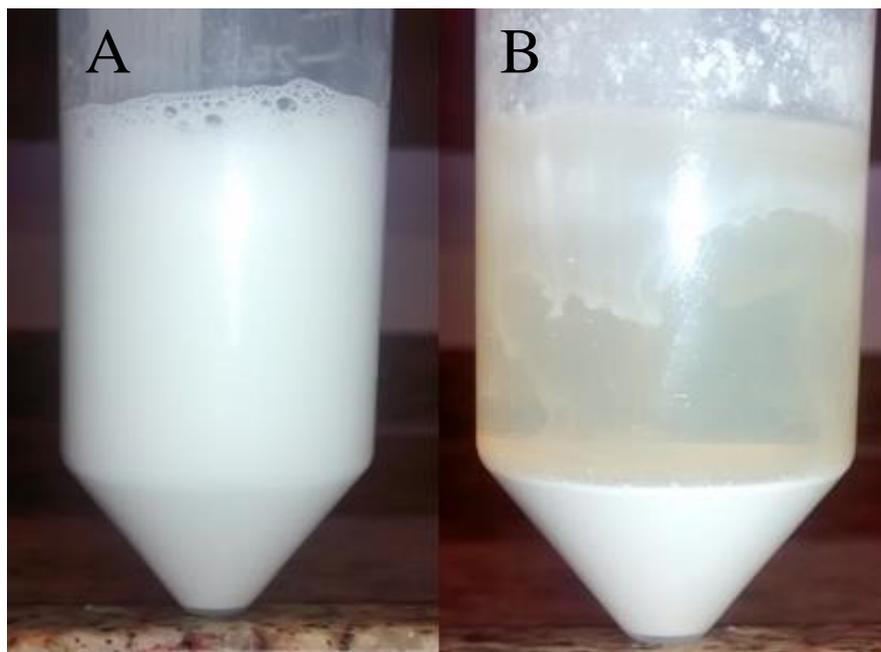


Figura 4.12: Análise visual da amostra NE-AVO 2° teste: (A) imediatamente após o preparo; (B) após 60 minutos em repouso.

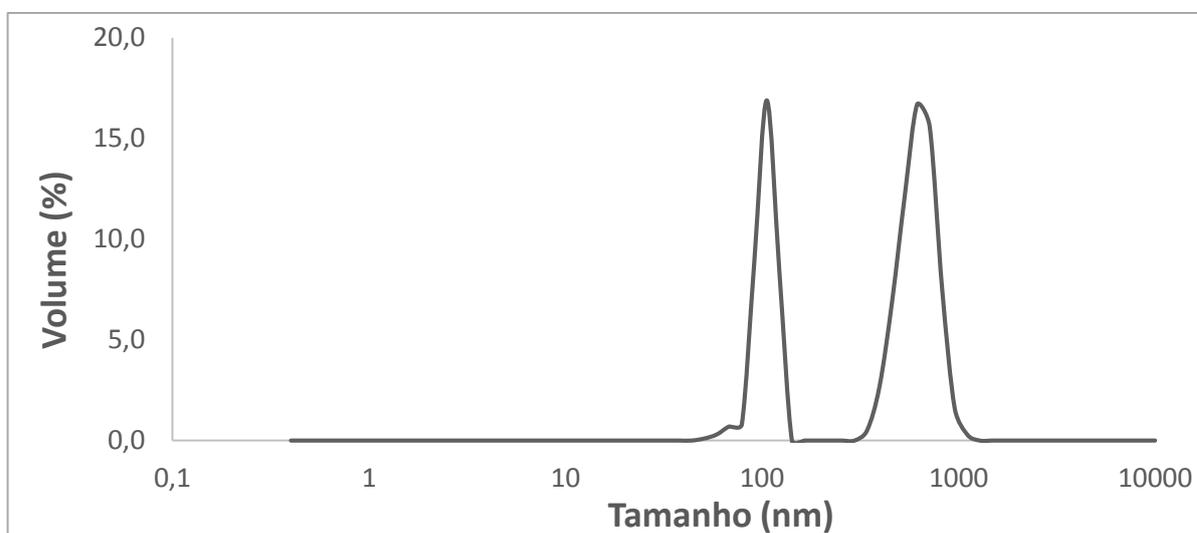


Figura 4.13: Análise de distribuição de tamanhos de partícula para amostra NE-AVO 2° teste, imediatamente após o preparo.

Com o intuito de obter uma fase oleosa similar à obtida no trabalho de COUTINHO (2014) (ou seja, uma mistura oleosa homogênea líquida), no terceiro teste examinou-se a utilização de um óleo vegetal como um componente adicional da fase oleosa. Os óleos são componentes bastante utilizados em formulações cosméticas para a pele, por causa da conhecida capacidade de hidratação do tecido. Por conta da natureza hidrofóbica, os óleos se caracterizam pela afinidade com os lipídios presentes no estrato córneo, proporcionando uma melhor função de barreira (STAMATAS *et al.*, 2008). O óleo utilizado no terceiro teste foi o óleo de milho, que apresenta uma elevada capacidade antioxidante. Além disso, exibe proteção contra a radiação UVB (NGUYEN *et al.*, 2013).

Dessa forma, a fase oleosa da amostra 'NE-AVO 3º teste' foi composta pelo filtro solar avobenzona e pelo óleo vegetal, numa relação de 1:1 (como mostrado na Tabela 4.5). Como era esperado, a presença do óleo vegetal tornou a nanoemulsão mais fluida, frente às amostras anteriormente preparadas. A análise de distribuição de tamanhos, ilustrada na Figura 4.14, mostra que este terceiro teste resultou em uma nanoemulsão de tamanhos médios menores. Acredita-se que a fluidez, causada pela adição do óleo à receita, facilite o cisalhamento das gotas pelo sonicador, resultando em nanoemulsões com tamanhos menores. No entanto, apesar da presença do óleo de milho aumentar o tempo que o sistema permanece homogêneo, não foi o suficiente para tornar a nanoemulsão estável, como ilustrado na Figura 4.15. Além disso, observou-se uma vez mais a formação de uma distribuição de tamanhos larga, com picos posicionados nas proximidades de 20 nm, 80 nm e 800 nm, o que é totalmente inapropriado para a aplicação pretendida.

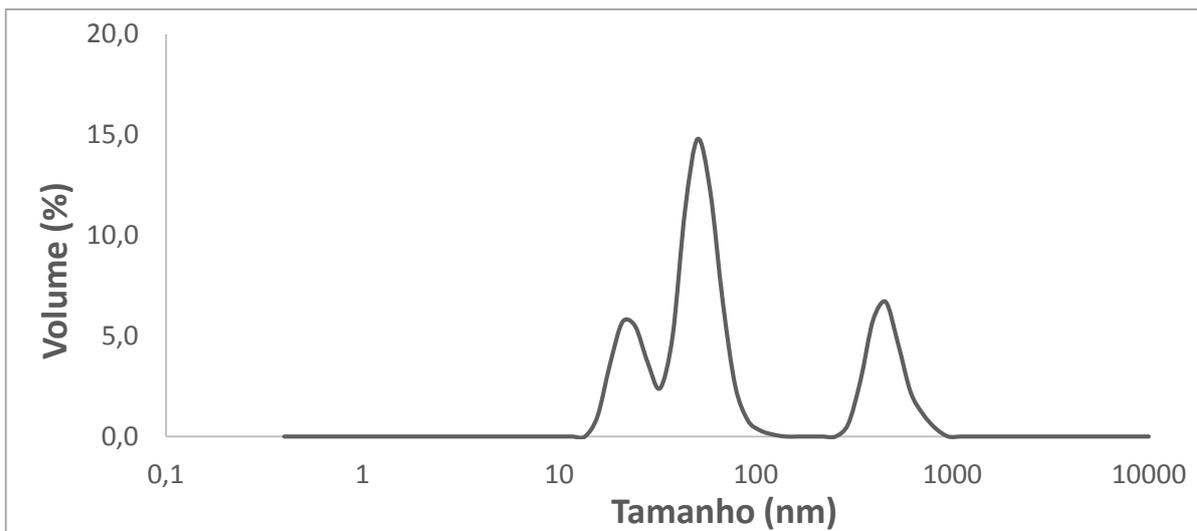


Figura 4.14: Análise de distribuição de tamanhos de partícula para amostra NE-AVO 3º teste, imediatamente após o preparo.

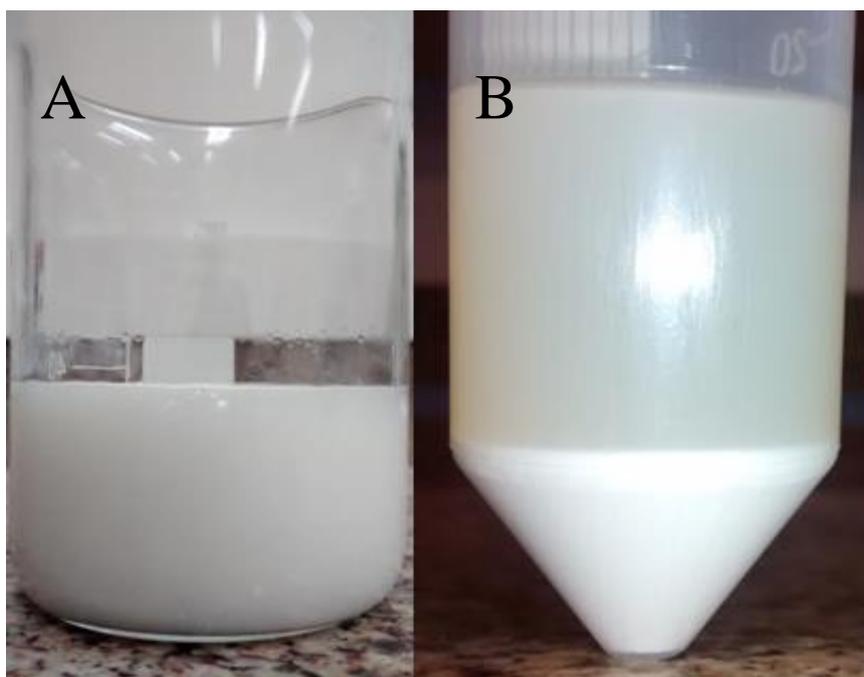


Figura 4.15: Análise visual da amostra NE-AVO 3º teste: (A) imediatamente após o preparo; (B) após 3 horas em repouso.

A Figura 4.16 ilustra claramente a diferença na estabilidade das nanoemulsões obtidas, quando se utiliza o óleo vegetal na composição. A ausência do óleo vegetal nos primeiros testes resulta no início da sedimentação em apenas 10 minutos após o término do preparo. Em contrapartida, no terceiro teste realizado, a separação de fases só foi observada depois de 3 horas.

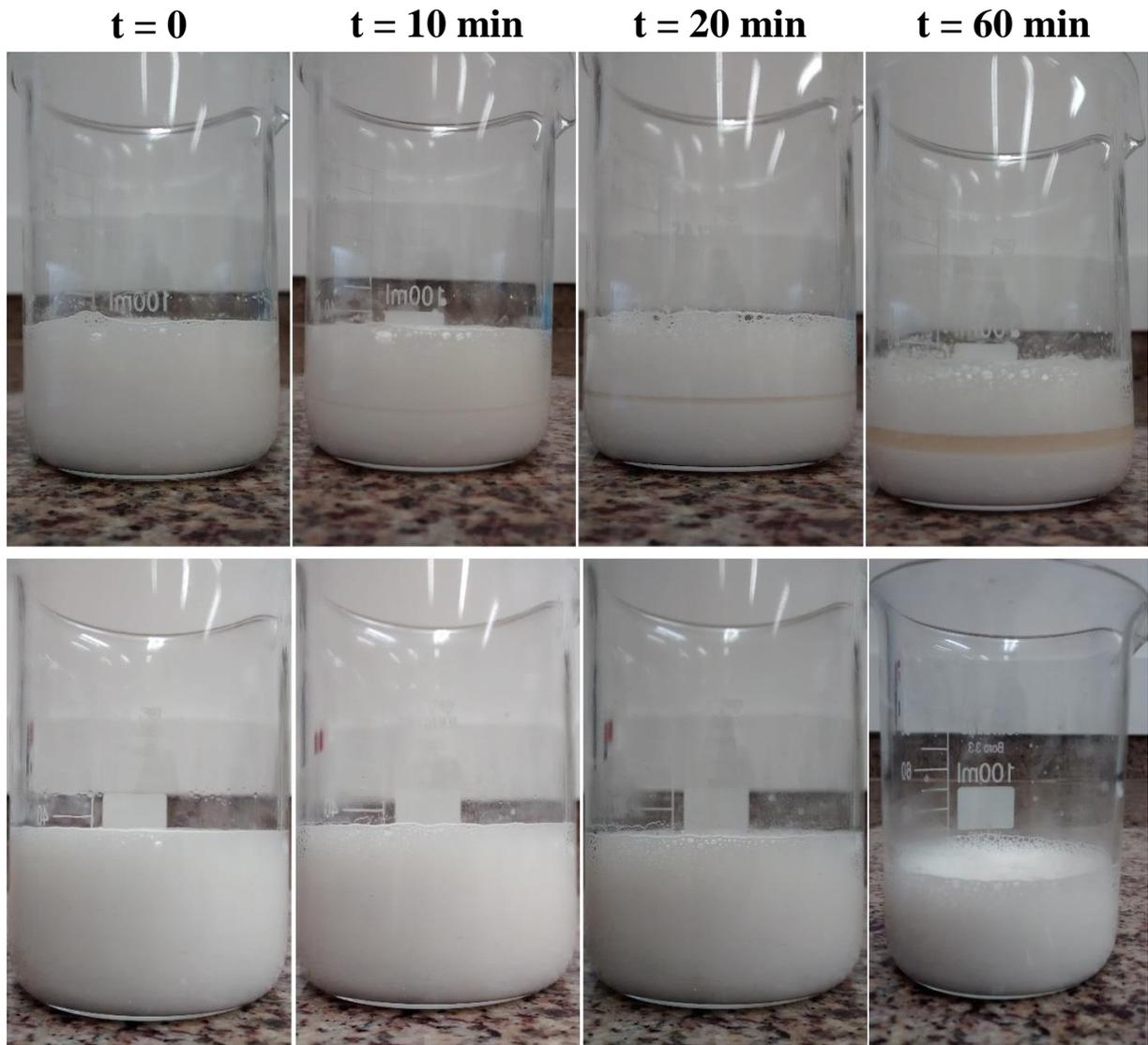


Figura 4.16: Análise visual comparativa entre as amostras NE-AVO 2° teste (imagens superiores) e NE-AVO 3° teste (imagens inferiores) ao longo do tempo.

Como exposto anteriormente, a análise de distribuição de tamanhos não foi realizada ao longo do tempo por conta da instabilidade das amostras. Para fins de avaliação da influência do óleo sobre a evolução das distribuições de tamanho, submeteu-se as amostras a vigorosa agitação antes da realização das análises após diferentes tempos de preparo, com o intuito de verificar a integridade das partículas na fase precipitada. Como observado na Figura 4.17, os sistemas não apresentaram estabilidade em relação à distribuição de tamanhos de partícula, o que já poderia ser esperado por conta do processo de separação de fases. Portanto, é possível inferir que o sistema particulado não se mantém íntegro após o processo de separação das fases.

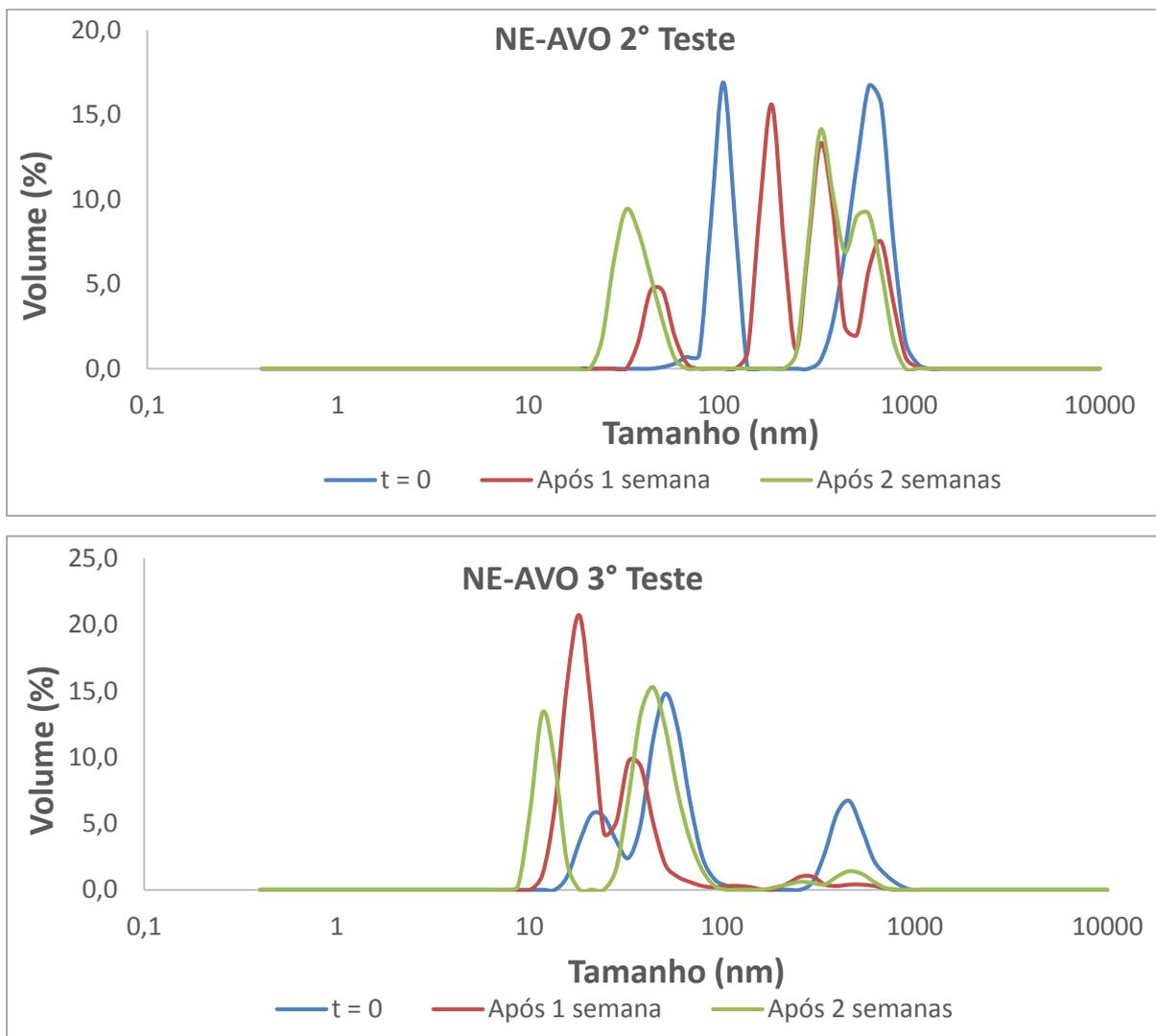


Figura 4.17: Análise comparativa da evolução das distribuições de tamanho de partícula das amostras NE-AVO 2° teste e 3° teste, após agitação.

É muito importante enfatizar que um grande inconveniente no preparo das nanoemulsões, quando se utiliza o sonicador, é o superaquecimento das amostras. Por isso, é de suma importância a utilização de um banho de gelo. A fim de registrar o aquecimento a que as nanoemulsões estão sujeitas, nanoemulsões similares ao 2º e 3º teste foram preparadas sem o uso do banho de gelo no sonicador, medindo-se a temperatura a cada 5 minutos durante o trabalho de dispersão. A Figura 4.18 confirma o aquecimento excessivo imposto às nanoemulsões, já que as amostras chegam a atingir temperaturas próximas a 90 °C. Isso indica que o consumo e dissipação de energia no sistema são muito grandes para a dispersão das gotas. Apesar disso, a estabilidade do produto final é baixa e a distribuição de tamanhos de partícula é larga. Isso também indica possíveis problemas para escalonamento do processo.

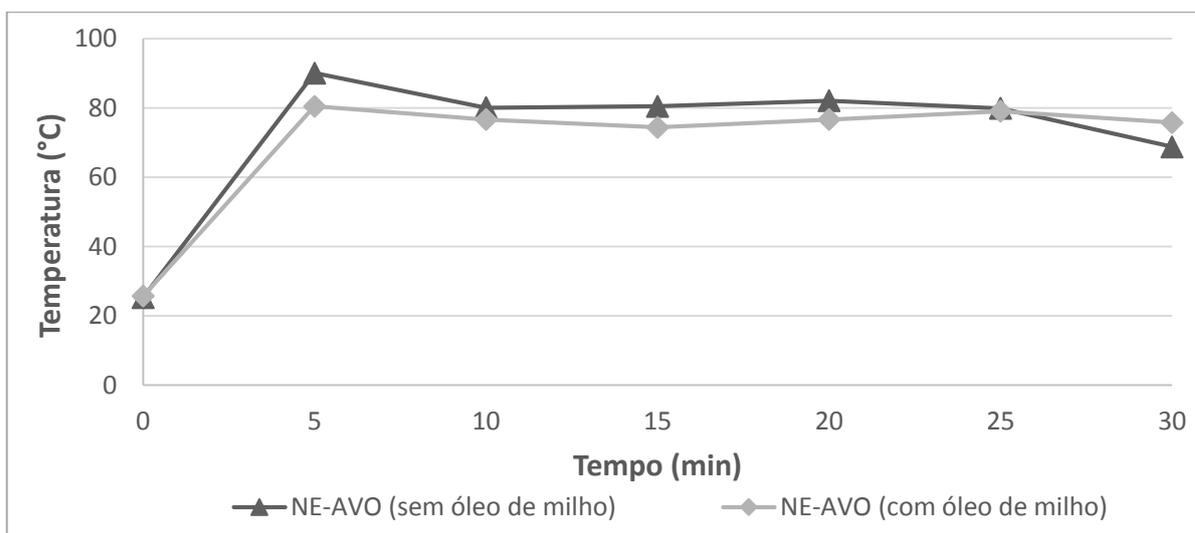


Figura 4.18: Curva de aquecimento das nanoemulsões durante a etapa de dispersão sem o uso do banho de gelo.

Deve-se ressaltar que estudos de otimização poderiam ser realizados para otimização da receita, embora 15 % (% m/m) de agentes tensoativos sejam já usados, sem sucesso, para manutenção da estabilidade da nanoemulsão.

É importante enfatizar que estudos realizados com benzofenona-3 não resultaram em formação eficiente da nanoemulsão e não são apresentados.

4.4 Nanopartículas Poliméricas de PMMA

As reações de polimerização conduzidas para a preparação de nanopartículas de PMMA foram regidas segundo o procedimento experimental descrito no Capítulo III. A Tabela 4.6 indica as nanopartículas preparadas. Ao contrário das nanoemulsões, não foi observado qualquer indício de separação de fases ao longo de todo o trabalho. Estudos realizados por FONSECA (2012) e LORCA (2012) indicam que essas emulsões podem ser armazenadas em repouso de forma estável por pelo menos 6 meses na temperatura ambiente

Tabela 4.6: Relação das nanopartículas poliméricas preparadas.

Amostras	Filtro Solar
PMMA	Nenhum
NP-AVO	Avobenzona
NP-BZ	Benzofenona-3

Com o intuito de ajustar o diâmetro final das nanopartículas poliméricas para a faixa de interesse, as reações conduzidas para obtenção das amostras NP-AVO e NP-BZ foram realizadas com uma carga de 10 % (% m/m) PMMA, em relação ao monômero, na dispersão. Essa metodologia também foi utilizada por LORCA (2012). Dessa forma, primeiramente foi realizada a reação para a obtenção de PMMA puro, ou seja, os filtros solares não foram utilizados nesta reação. O PMMA foi obtido com massa molar numérica média de $5,19 \cdot 10^5$ Da e massa molar ponderal média de $8,25 \cdot 10^5$ Da, tendo o índice de polidispersão igual a 1,590; sendo então utilizado nas reações seguintes para obtenção das amostras ‘NP-AVO’ e ‘NP-BZ’.

Adiante estão listados os resultados das análises de caracterização das nanopartículas obtidas.

4.4.1 Distribuição de Tamanhos de Partículas

As análises de distribuição de tamanhos de partículas foram realizadas por meio da técnica de espalhamento de luz, no ZetaSizer. Assim como nos demais sistemas nanoestruturados, a análise foi realizada ao longo do período de duas semanas com o objetivo de avaliar a estabilidade das nanopartículas. Como ilustrado na Figura 4.19 e Figura 4.20, as nanopartículas poliméricas carregadas com avobenzona ou benzofenona-3 apresentaram grande estabilidade ao longo do tempo, sem que apresentassem qualquer diferença significativa da distribuição de tamanhos. Ademais, as distribuições de tamanhos de partículas são também relativamente estreitas e monomodais.

Essa propriedade é de fundamental importância e é devida à estabilidade dimensional da partícula de PMMA, que é sólida e não quebra para formar partículas menores, nem coalesce, para formar partículas maiores. Além disso, as amostras NP-AVO e NP-BZ apresentaram tamanhos médios (cerca de 95 nm e 50 nm, respectivamente) superiores ao tamanho médio da carga de polímero PMMA adicionado inicialmente (cerca de 43 nm), indicando que a adição do polímero foi eficiente em controlar o tamanho das nanopartículas. No entanto, observa-se que o tamanho atingido ainda não está na faixa desejada entre 100-300 nm para formulações fotoprotetoras, o que pode ser facilmente resolvido trabalhando-se com maiores cargas de polímero. Tal fato foi confirmado por LORCA (2012) que mostrou que as distribuições de tamanhos de partículas dependem pouco do ativo encapsulado, já que a viscosidade do meio na etapa de dispersão é controlada pela carga de PMMA. Isso torna o projeto das partículas mais simples e menos sensível ao ativo adicionado ao meio.

Ressalta-se ainda que LORCA (2012) não detectou diferenças nas análises de conversão diante da presença dos ativos cosméticos nas nanopartículas poliméricas, obtendo ao final conversões próximas a 100 %, confirmando a pouca influência do ativo no desempenho destes sistemas.

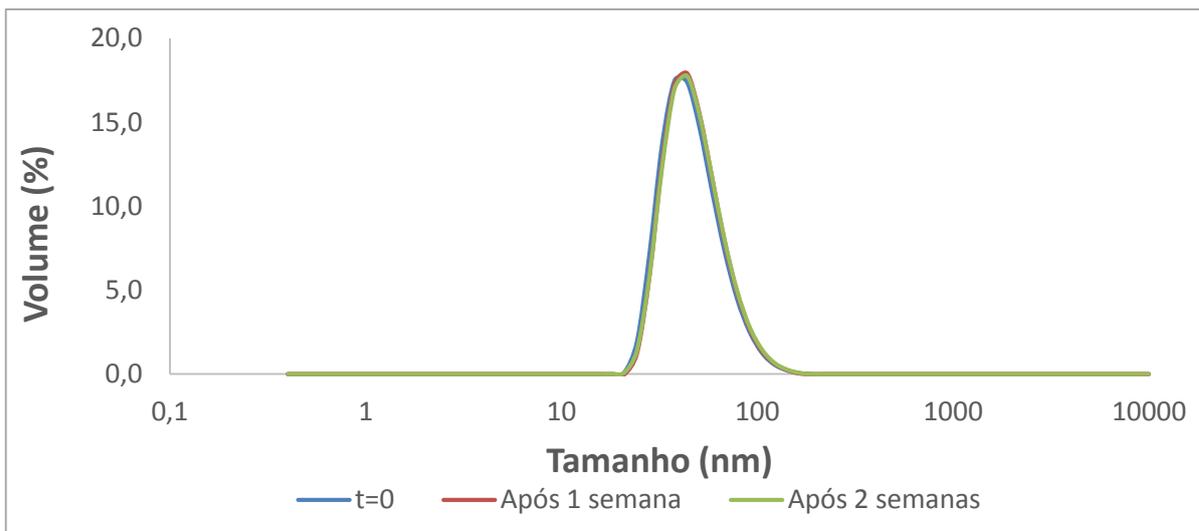


Figura 4.19: Distribuição de tamanhos de partícula para a nanopartícula NP-AVO ao longo do tempo.

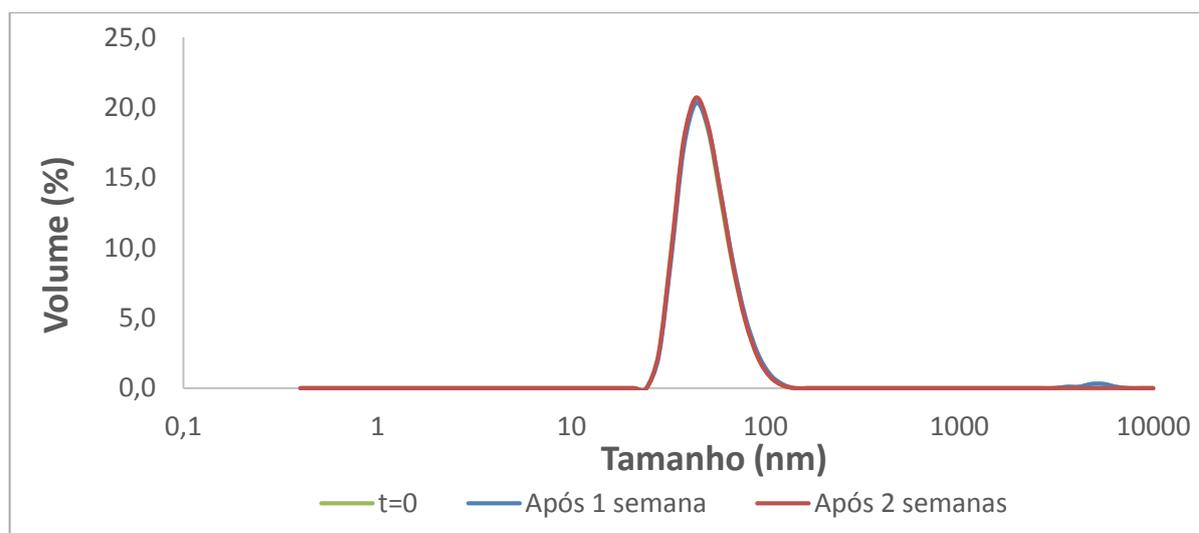


Figura 4.20: Distribuição de tamanhos de partícula para a nanopartícula NP-BZ ao longo do tempo.

4.4.2 Eficiência de Encapsulamento

O cálculo do teor de filtro solar incorporado foi realizado com auxílio do espectrofotômetro UV-VIS, utilizando as curvas de calibração previamente apresentadas na

seção 4.1.2 (Figuras 4.3 e 4.4). A análise foi feita em duplicata e os resultados obtidos estão listados na Tabela 4.7. Os resultados indicam uma elevada eficiência de encapsulamento, o que já era esperado por conta da alta lipofilicidade dos filtros solares utilizados. Dessa forma, como os ativos são completamente dissolvidos no monômero (MMA), evita-se que haja migração dos mesmos para a fase aquosa. Para confirmar que a medição da absorvância estava relacionada apenas ao filtro solar, não sendo afetada por interferência de outro componente, a análise também foi realizada para a nanopartícula pura, preparada sem ativos. Porém, não foi detectada qualquer absorvância significativa nos comprimentos de onda utilizados para a análise (vide Apêndice B).

Esses resultados comprovam a eficiência expressiva do encapsulamento, quando comparada aos resultados anteriores, em particular quando se observa que as partículas foram carregadas com 30 % (% m/m) de composto ativo, quantidade significativamente maior que nos casos anteriores. É provável que valores próximos de 100 % sejam obtidos, caso se minimizem as perdas na etapa de dispersão e de manipulação da emulsão, dado que os ativos são insolúveis em água. Como nos casos anteriores, o encapsulamento de benzofenona-3 é mais efetivo.

Tabela 4.7: Eficiência de encapsulamento dos ativos nas nanopartículas poliméricas.

Amostras	Eficiência de Encapsulamento (%)
NP-AVO	83,47 ± 5,46
NP-BZ	107,87 ± 7,08

4.4.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Com base nas análises de DSC, as nanopartículas poliméricas produzidas foram caracterizadas quanto à temperatura de transição vítrea. Obtiveram-se também as temperaturas de fusão dos filtros solares. Como indicado na Figura 4.21, os filtros solares avobenzona e benzofenona-3 apresentaram ponto de fusão em torno de 80 °C e 52 °C, respectivamente,

estando próximo ao reportado pela literatura (LORCA, 2012). Além disso, a Figura 4.21 mostra a presença de outros picos, a baixas temperaturas, possivelmente relacionados a mudanças da forma cristalina da fase sólida, e a altas temperaturas, relacionados à degradação dos filtros.

Com base nos termogramas das nanopartículas carregadas com os filtros solares (Figura 4.22), a amostra NP-AVO não indicou a transição endotérmica característica da fusão da avobenzona, demonstrando que o filtro solar não formou uma fase cristalina distinta e que está dissolvido na matriz polimérica, evidenciando a existência da afinidade entre o ativo cosmético e o PMMA. Resultados similares foram obtidos por LORCA (2012), FONSECA (2012) e MAINARDES *et al.* (2006). Contudo, na amostra NP-BZ, um pequeno pico em torno de 90 °C pôde ser observado, sugerindo que a benzofenona pode não estar completamente dissolvida na matriz polimérica. O deslocamento do pico característico da fusão da benzofenona-3 de 50 °C para 90 °C pode indicar a formação de estruturas conjugadas à matriz de PMMA ou simplesmente refletir o atraso do aquecimento da matriz polimérica, já que o polímero é mau condutor de calor.

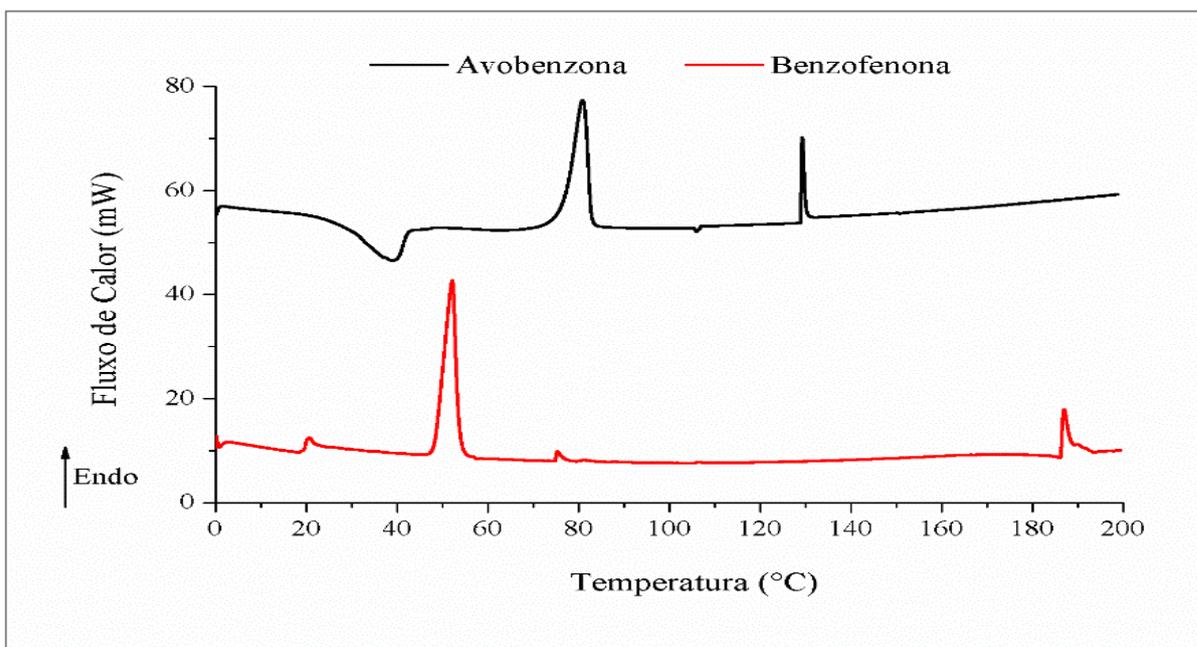


Figura 4.21: Termogramas de DSC dos filtros solares avobenzona e benzofenona-3.

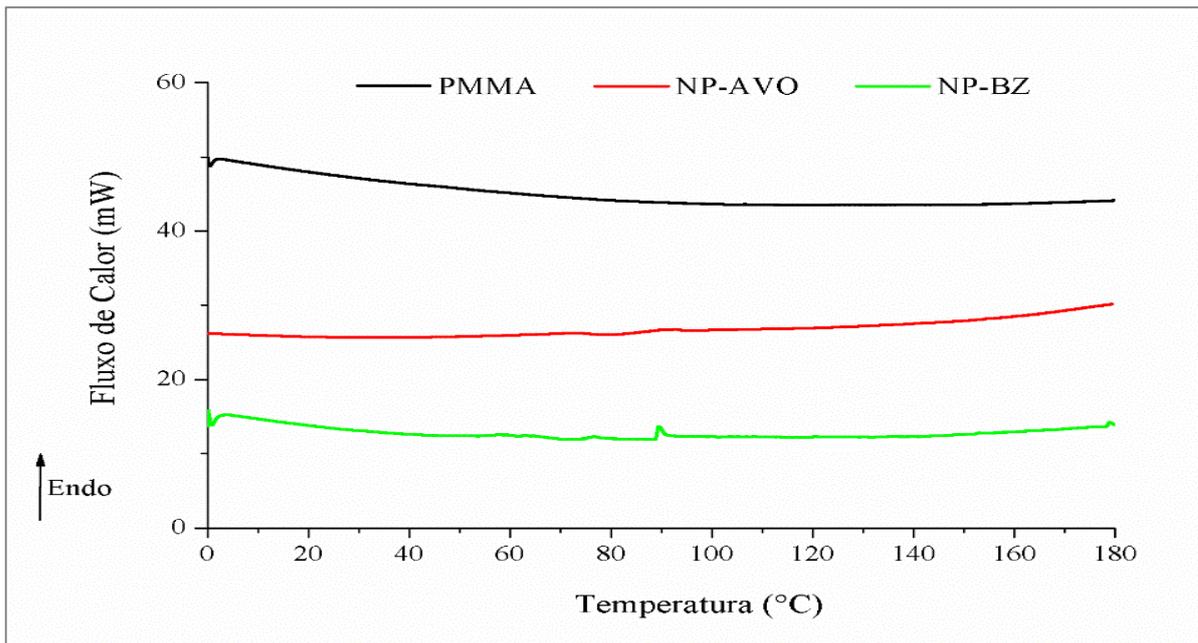


Figura 4.22: Termogramas de DSC das amostras PMMA, NP-AVO e NP-BZ.

4.4.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As análises de GPC foram feitas usando THF como fase móvel, para obter informações sobre as propriedades moleculares das nanopartículas poliméricas produzidas. Na Figura 4.23, são apresentadas as distribuições de massas molares das nanopartículas e também, a nível de comparação, da amostra de PMMA produzidas sem os compostos ativos. Percebe-se que a distribuição de massas molares da amostra NP-BZ é muito semelhante à do PMMA, indicando que o encapsulamento deste filtro solar não afetou as massas molares significativamente. Isso sugere a inexistência de qualquer efeito significativo da benzofenona-3 sobre a cinética da reação. Em contrapartida, a amostra NP-AVO exibiu uma distribuição mais larga e deslocada para massas molares mais elevadas. Nesse caso, os resultados parecem indicar que o filtro solar AVO pode afetar o comportamento cinético da reação, como também foi indicado por OLIVEIRA *et al.* (2012). Os autores observaram que os múltiplos grupos funcionais presentes nos compostos bioativos podem participar da reação inibindo as taxas de polimerização ou

atuando como agentes de transferência de cadeia ou de reticulação. Em todos os casos, observam-se mudanças nas distribuições de massas molares dos produtos obtidos.

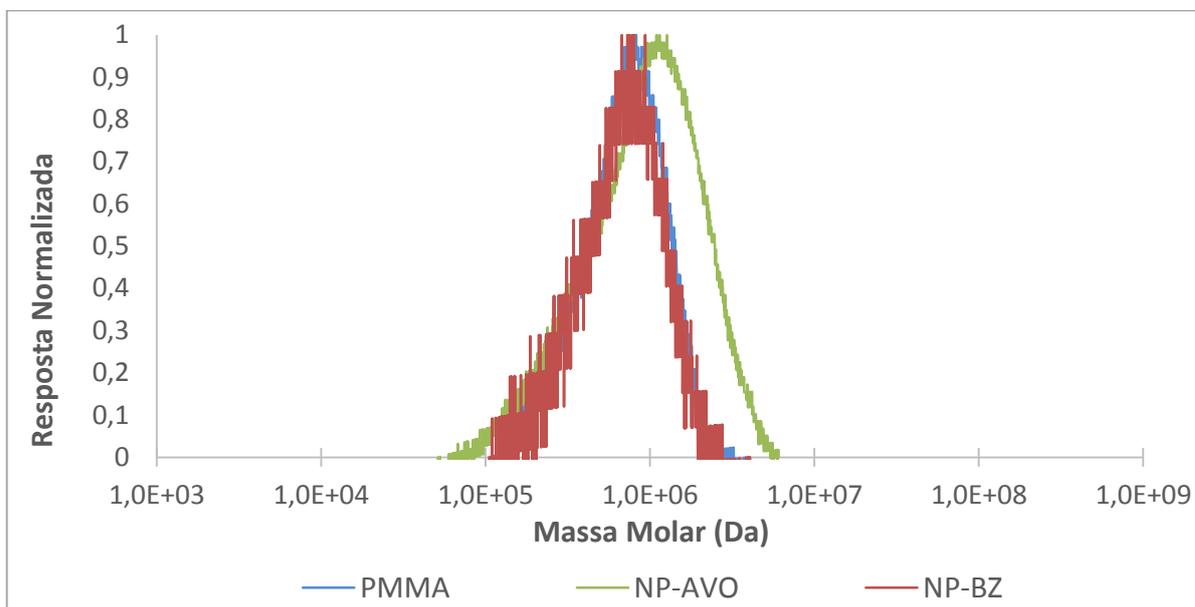


Figura 4.23: Distribuições de massas molares das amostras PMMA, NP-AVO e NP-BZ.

A Tabela 4.8 apresenta as massas molares ponderais médias (M_n e M_w) das nanopartículas produzidas e do PMMA, assim como os respectivos índices de polidispersão. Pode-se notar que a amostra NP-BZ exibe massas molares ponderais médias (M_n e M_w) semelhantes às do polímero PMMA produzido na ausência do ativo. Contudo, no que diz respeito à amostra NP-AVO, apesar de apresentar M_n não muito alterado, caracteriza-se pela massa molar ponderal média (M_w) maior em comparação às outras amostras, confirmando as observações feitas em relação às distribuições de massas molares. Do ponto de vista prático, contudo, o produto polimérico é pouco afetado pela presença dos compostos ativos, já que as mudanças observadas não afetam o desempenho do produto final.

Tabela 4.8: Massas molares médias e índices de polidispersão das nanopartículas.

Amostras	M_n (Da)	M_w (Da)	IP (M_w/M_n)
PMMA	5,19E+05	8,25E+05	1,590
NP-AVO	4,36E+05	1,04E+06	2,378
NP-BZ	5,89E+05	8,30E+05	1,409

4.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As nanopartículas obtidas ao final de cada uma das reações foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura para caracterização morfológica, e avaliar se as partículas apresentavam em escala nanométrica. As imagens obtidas pela técnica de MEV (Figura 4.24 e Figura 4.25) confirmam a formação de partículas esféricas com distribuições de tamanhos relativamente homogêneos.

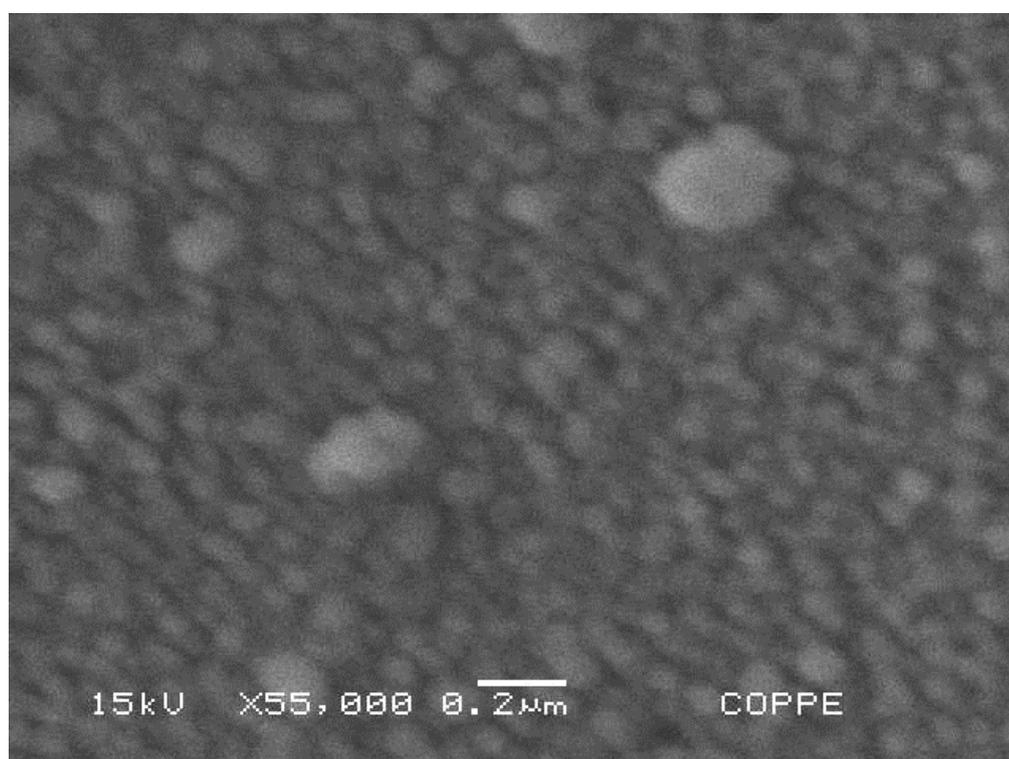


Figura 4.24: Micrografia da amostra NP-AVO.

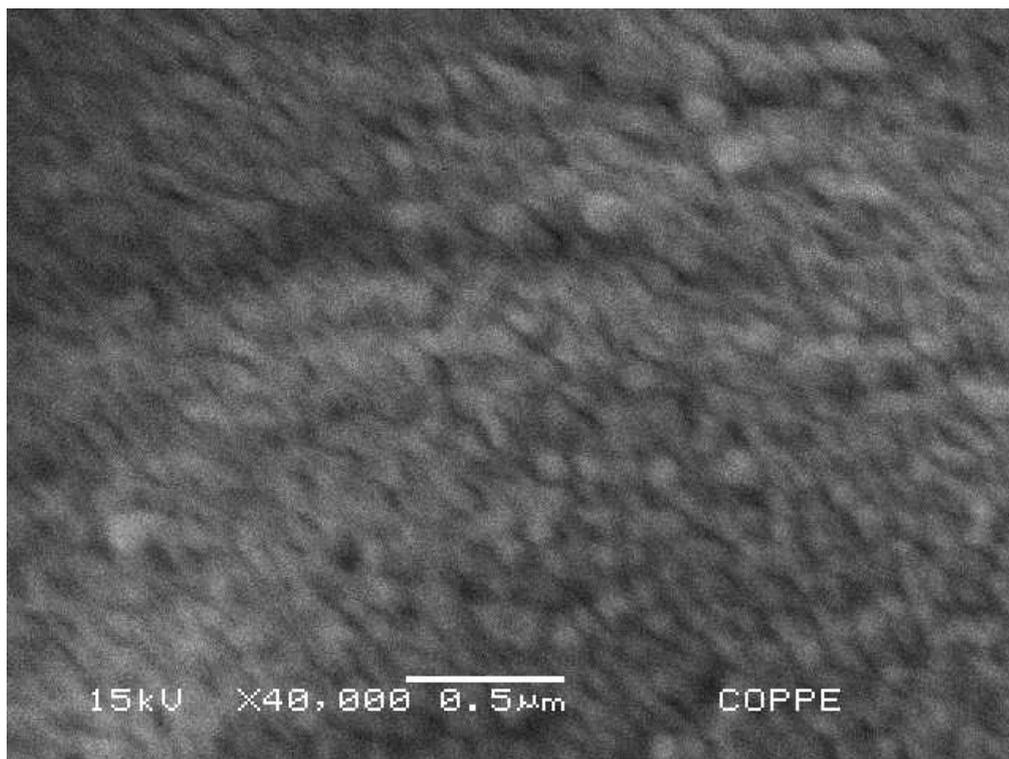


Figura 4.25: Micrografia da amostra NP-BZ.

4.5 Estudo Comparativo

Diante dos resultados apresentados nesta dissertação, é possível delimitar vantagens e desvantagens das técnicas de encapsulamento estudadas e assim obter uma análise comparativa dos processos de nanoencapsulamento mais utilizados na literatura para os filtros solares. No que diz respeito aos reagentes utilizados para o preparo dos sistemas, os lipossomas apresentam o inconveniente do uso de solventes orgânicos, como o clorofórmio. O alto risco à saúde e ao meio ambiente relacionado ao manuseio deste tipo de reagente, além das dificuldades de descarte, mostra uma grande desvantagem para os lipossomas (GORINI *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2005).

Os lipossomas também apresentam pontos negativos relacionados ao procedimento experimental, já que requerem etapas extras para a homogeneização e fracionamento das vesículas. Além disso, estas etapas adicionais exibem custo elevado e baixa eficiência. Apesar da maior facilidade no preparo, as nanoemulsões também mostram desvantagens nesse quesito

por requererem grande quantidade de tensoativos para o preparo. Como visto anteriormente, a quantidade utilizada de tensoativos não foi suficiente para estabilizar as nanoemulsões. Ademais, outra desvantagem que deve ser mencionada é a necessidade de alta energia de cisalhamento pelo agente de dispersão, sendo de extrema importância a utilização do banho de gelo para evitar o superaquecimento das nanoemulsões, o que pode ser muito custoso para aplicações comerciais reais.

O sonicador ainda apresenta dificuldades no escalonamento e custos elevados, não sendo indicado para produções em larga escala (SCHORK *et al.*, 2005). O homogeneizador de alta pressão por sua vez, utilizado no preparo das nanopartículas poliméricas, é o mais aconselhável por atingir elevada homogeneidade do produto (LANDFESTER *et al.*, 2004).

Do ponto de vista comercial, a estabilidade das nanopartículas é de suma importância e deve ser levada em conta no que diz respeito ao tempo de prateleira. Com os resultados mostrados neste capítulo, ficam claros os problemas de estabilidade apresentados pelos lipossomas multilamelares e pelas nanoemulsões, indicando grandes desvantagens para aplicações comerciais. Além disso, os lipossomas mostraram-se mais instáveis diante da presença do composto ativo. Em contrapartida, as nanopartículas poliméricas destacaram-se pela alta estabilidade, sendo menos sensíveis à presença do ativo. Ressalta-se também que o controle de tamanho de partícula é mais simples para as nanopartículas poliméricas, sendo realizado com o uso de um controlador de viscosidade.

Outro fator a ser avaliado para aplicações comerciais é o custo e por isso foi feita uma análise preliminar dos preços dos reagentes e materiais utilizados na preparação de cada um dos sistemas de encapsulamento. Para esta estimativa de custo, foi utilizado como base de dados os preços apresentados no sítio eletrônico da empresa Sigma Aldrich. Como pode ser visto na Tabela 4.9, os lipossomas caracterizam-se pelo custo elevado dos reagentes e materiais (cerca de R\$ 4.230,00) devido principalmente as etapas adicionais de homogeneização e fracionamento. Por sua vez, as nanoemulsões apresentam menor custo (cerca de R\$ 890,00) entre os sistemas aqui estudados e as nanopartículas poliméricas mostram um custo total de reagentes de cerca de R\$ 1.240,00).

Ao levar em conta a quantidade de reagentes utilizada nas receitas de cada um dos sistemas, é possível obter uma estimativa do custo para o preparo das formulações (Tabela 4.10). Analisando a Tabela 4.10, confirma-se o maior benefício na utilização das nanopartículas poliméricas, que mesmo não apresentando o menor custo dos reagentes, ao final obteve melhor relação custo/benefício quando comparada aos outros sistemas. Dessa forma, é evidente a vantagem na utilização das nanopartículas poliméricas para o encapsulamento de filtros solares.

Tabela 4.9: Estimativa de custo dos reagentes para os sistemas de nanoencapsulamento.

Reagentes e Materiais dos Lipossomas Multilamelares	Preço
Clorofórmio (1 L)	R\$ 18,00
Fosfatidilcolina (100 g)	R\$ 1.175,40
Colesterol (100 g)	R\$ 426,00
Tris-hidroximetil amino (100 g)	R\$ 25,54
Membranas de Policarbonato (100 un)	R\$ 545,00
Suporte Filtração Swinex (1 un)	R\$ 188,00
Coluna PD-10 (50 un)	R\$ 733,70
Gel Sephadex G-50 (50 g)	R\$ 1.117,00
Total:	R\$ 4.228,64
Reagentes e Materiais das Nanoemulsões	Preço
Tween 80 (1 L)	R\$ 259,00
Span 80 (250 mL)	R\$ 218,00
Quitosana (50 g)	R\$ 269,00
Ácido Glicólico (1 L)	R\$ 140,00
Óleo de Milho (1 L)	R\$ 3,00
Total:	R\$ 889,00
Reagentes e Materiais das Nanopartículas Poliméricas	Preço
LSS (500 g)	R\$ 772,00
NaHCO ₃ (500 g)	R\$ 124,00
MMA (1 L)	R\$ 215,00
K ₂ S ₂ O ₈ (500 g)	R\$ 124,00
Total:	R\$ 1.235,00

Tabela 4.10: Estimativa do custo das formulações preparadas.

Sistema de Encapsulamento	Custo da formulação
Lipossomas Multilamelares	R\$ 8,78/mL
Nanoemulsão de Quitosana	R\$ 0,59/g
Nanopartículas Poliméricas	R\$ 0,08/g

Capítulo V

Conclusões

5.1 Conclusões

Este trabalho permitiu comparar diferentes sistemas nanoestruturados para o encapsulamento de filtros solares. Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que o encapsulamento de ativos por meio de nanopartículas poliméricas gera produtos mais estáveis e processos mais eficientes, quando comparados aos demais sistemas aqui estudados, à base de lipossomas e nanoemulsões.

No que diz respeito às nanoemulsões, apesar de ter sido empregada uma alta energia de cisalhamento por meio de ultrassom, os resultados sugeriram que emulsões estáveis não foram formadas, impondo desafios para a estocagem e manipulação desses produtos. Particularmente, esses sistemas podem ser muito influenciados pela natureza dos componentes presentes na fase oleosa. Este fato foi confirmado pela inclusão do óleo vegetal na receita experimental, que permitiu a formação de nanoemulsões mais fluidas e estáveis por um período de tempo maior.

A metodologia experimental empregada para o preparo dos lipossomas mostrou-se adequada para a formação das vesículas multilamelares. Este procedimento, no entanto, apresenta um grande inconveniente frente aos outros sistemas, por conta do uso de solventes orgânicos agressivos, como o clorofórmio. As vesículas lipossômicas apresentaram tamanhos médios superiores (na faixa de tamanho micrométrica) aos dos demais sistemas, impossibilitando a utilização direta para a aplicação desejada e requerendo o fracionamento. A análise da distribuição de tamanhos deste sistema ao longo do tempo indicou ainda um comportamento instável, uma vez que observaram-se diferenças significativas das distribuições com o passar do tempo. Além disso, os resultados indicaram baixas eficiências de encapsulamento (entre 15 a 50 %), resultante das etapas adicionais de homogeneização e fracionamento das vesículas.

Por outro lado, as nanopartículas poliméricas de PMMA, produzidas via polimerização em miniemulsão, apresentaram tamanho médio próximo ao apropriado para a aplicação transdérmica (cerca de 70 nm). É importante ressaltar que o ajuste do tamanho pode ser feito facilmente com a manipulação da viscosidade da fase oleosa. Ao contrário dos lipossomas e das nanoemulsões, as partículas mostraram-se estáveis durante todo o tempo de acompanhamento das distribuições de tamanhos. E com relação à eficiência de encapsulamento, as nanopartículas poliméricas se destacaram por exibir altos valores, próximos a 100 %.

Com o intuito de fazer uma comparação preliminar dos custos de cada um dos sistemas nanoestruturados, realizou-se um balanço material dos preços dos reagentes empregados no seu preparo. Tal análise sugeriu que as nanopartículas poliméricas apresentam uma relação custo/benefício mais vantajosa (em torno de R\$ 1.240,00) do que os lipossomas (cerca de R\$ 4.230,00) e as nanoemulsões (cerca de R\$ 890,00). Apesar de não serem levados em conta os equipamentos utilizados, essa estimativa inicial já destaca a vantagem no uso das nanopartículas poliméricas do ponto de vista comercial.

De uma forma geral, portanto, esse estudo indica que as técnicas de encapsulamento de ativos em nanopartículas poliméricas obtidas via polimerização em miniemulsão apresentam muitas vantagens competitivas para a utilização como sistemas de inclusão de compostos bioativos em geral e de filtros solares.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Para trabalhos futuros, sugere-se que sejam feitos testes de liberação *in vitro*, assim como testes de irritação dérmica, de forma a comparar a eficácia e a segurança dos sistemas de inclusão aqui estudados.

Para as nanoemulsões, recomenda-se que sejam testados a utilização de outros filtros solares lipofílicos (ou até mesmo uma mistura de diversos filtros), de maneira a confirmar e entender a dependência da estabilidade com a composição da fase oleosa.

Para as nanopartículas poliméricas, indica-se que novas reações de polimerização sejam feitas, adicionando mais de um filtro solar à receita experimental, o que facilitaria o preparo das formulações fotoprotetoras.

Diante dos resultados promissores, propõe-se ainda que seja dado início aos testes de escalonamento do processo de polimerização das nanopartículas poliméricas. Deve ser observado que é necessário avaliar se as características das formulações se mantêm constantes na escala de produção em relação às observadas em escala laboratorial. Além disso, estes sistemas nanoestruturados devem ser avaliados para o encapsulamento de outros fármacos, e que não necessariamente sejam utilizados em aplicações transdérmicas.

No que diz respeito aos lipossomas, sugere-se avaliar a influência do tempo de hidratação na espessura das paredes lipossômicas, o que pode explicar as baixas eficiências de encapsulamento desses sistemas nanoestruturados. Além disso, avaliar a influência do pH no desempenho desses sistemas.

Sugere-se o estudo de simulação molecular, para entender a interação química e física do ativo cosmético com o meio que encapsula.

Capítulo VI

Referências Bibliográficas

AKBARZADEH, A., REZAEI-SADABADY, R., DAVARAN, S., JOO, S.W., ZARGHAMI, N., HANIFEHPOUR, Y., SAMIEI, M., KOUHI, M., NEJATI-KOSHKI, K., 2013, “Liposome: Classification, Preparation, and Applications”, *Nanoscale Research Letters*, v. 8, pp. 102-110.

ALVAREZ-ROMÁN, R., BARRÉ, G., GUY, R.H., FESSI, H., 2001, “Biodegradable Polymer Nanocapsules Containing a Sunscreen Agent: Preparation and Photoprotection”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, pp. 191-195.

ANCHISI, C., MACCIONI, A.M., MELONI, M.C., 2004, “Physical Properties of Chitosan Dispersions in Glycolic Acid”, *In Farmaco*, v. 59, pp. 557-561.

ANTONIETTI, M., LANDFESTER, K., 2002, “Polyreactions in Miniemulsions”, *Progress in Polymer Science*, v. 27, pp. 689-757.

ANTONIOU, C., KOSMADAKI, M.G., STRATIGOS, A.J., KATSAMBAS, A.D., 2008, “Sunscreen – What’s Important to Know”, *European Academy of Dermatology and Venereology Journal*, v. 22, pp. 1110-1119.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2006, Resolução RDC nº 47, de 16 de março de 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012, Resolução RDC nº 30, de 1º de junho de 2012.

ASUA, J.M., 2002, “Miniemulsion Polymerization”, *Progress in Polymer Science*, v. 27, pp. 1283-1346.

ASUA, J.M., 2014, “Challenges for Industrialization of Miniemulsion Polymerization”, *Progress in Polymer Science*, v. 39, pp. 1797-1826.

BAILLO, V.P., LIMA, A.C., 2012, “Nanotecnologia Aplicada à Fotoproteção”, *Revista Brasileira de Farmácia (RBF)*, v. 93, n° 3, pp. 271-278.

BALOGH, T.S., PEDRIALI, C.A., BABY, A.R., VELASCO, M.V.R., KANEKO, T.M., 2011, “Proteção à Radiação Ultravioleta: Recursos Disponíveis na Atualidade em Fotoproteção”, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n° 4, pp. 732-742.

BATISTA, C.M., CARVALHO, C.M.B., MAGALHÃES, N.S.S., 2007, “Lipossomas e suas Aplicações Terapêuticas: Estado da Arte”, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas – Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n° 2, pp. 167-179.

BHAI, S.A., YADAV, V., MAMATHA, Y., PRASANTH, V.V., 2012, “Liposomes: An Overview”, *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, v. 1, pp. 13-21.

BJORN, L.O., 2007, “Stratospheric Ozone, Ultraviolet Radiation, and Cryptogams”, *Biological Conservation*, v. 35, pp. 326-333.

BOUCHEMAL, K., BRIANÇON, S., PERRIER, E., FESSI, H., 2004, “Nano-emulsion Formulation Using Spontaneous Emulsification: Solvent, Oil and Surfactant Optimisation”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 280, pp. 241-251.

BRAGA, R.R., 2010, Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Alantoína em Lipossomas e Formulações Tópicas, Dissertação de M.Sc., UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

BROOKE, D.N., BURNS, J.S., CROOKES, M.J., 2008, “UV Filters in Cosmetics – Prioritisation for Environmental Assessment”, *Environment Agency*.

CALVO, P., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J., 1997, “Evaluation of Cationic Polymer-Coated Nanocapsules as Ocular Drug Carriers”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 153, pp. 41-50.

CARLOTTI, M.E., SAPINO, S., VIONE, D., PELIZZETTI, E., UGAZIO, E., MOREL, S., 2005, “Study on the Photostability of Octyl-p-Methoxy Cinnamate in SLN”, *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 26, n° 6, pp. 809-816.

COUTINHO, C.S.C., 2014, Desenvolvimento de Sistemas Fotoprotetores e Antioxidantes Nanoemulsionados à Base de Quitosana, Dissertação de M.Sc, IMA/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

DASH, M., CHIELLINI, F., OTTENBRITE, R.M., CHIELLINI, E., 2011, “Chitosan – A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical”, *Progress in Polymer Science*, v. 36, pp. 981-1014.

DAUDT, R.M., EMANUELLI, J., KULKAMP-GUERREIRO, I., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S., 2013, “A Nanotecnologia como Estratégia para o Desenvolvimento de Cosméticos”, *Ciência e Cultura*, v. 65, n° 3, pp. 28-31.

DIFFEY, B., 2001, “Sunscreen isn’t Enough”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 64, pp. 105-108.

ELSAYED, M.M.A., ABDALLAH, O.Y., NAGGAR, V.F., KHALAFALLAH, N.M., 2007, “Lipid Vesicles for Skin Delivery of Drugs: Reviewing Three Decades of Research”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 332, pp. 1-16.

FAN, Y., ZHANG, Q., 2013, “Development of Liposomal Formulations: From Concept to Clinical Investigations”, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, pp. 81-87.

FEUSER, P.E., GASPAR, P.C., RICCI-JUNIOR, E., SILVA, M.C.S., NELE, M., SAYER, C., ARAUJO, P.H.H., 2014, “Synthesis and Characterization of Poly(Methyl Methacrylate)

PMMA and Evaluation of Cytotoxicity for Biomedical Application”, *Macromolecular Symposia*, v. 343, pp. 65-69.

FLOR, J., DAVOLOS, M.D., 2007, “Protetores Solares”, *Química Nova*, v. 30, n° 1, pp. 153-158.

FLORENCE, A.T., ATTWOOD, D., 2003, *Princípios Físico-Químicos em Farmácia*, 3ª ed., São Paulo, Edusp – Editora da Universidade de São Paulo.

FONSECA, L.B., 2012, Desenvolvimento de Nanopartículas Poliméricas Contendo Praziquantel para o Tratamento da Esquistossomose, Tese de D.Sc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

FONSECA, L.B., NELE, M., VOLPATO, N.M., SEICEIRA, R.C., PINTO, J.C., 2013, “Production of PMMA Nanoparticles Loaded with Praziquantel Through “*in situ*” Miniemulsion Polymerization”, *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 7, pp. 54-63.

GARCIA, L., 1988, Lipossomas com Filtro Solar: Preparação e Controle de Qualidade, Tese de D.Sc., USP, São Paulo, SP, Brasil.

GENTA, I., CONTI, B., PERUGINI, P., PAVANETTO, F., SPADARO, A., PUGLISI, G., 1997, “Bioadhesive Microspheres for Ophtalmic Administration of Acyclovir”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 49, pp. 737-742.

GONÇALVES, T.S.F, 2010, O Uso do Protetor Solar por Alunos do Curso de Formação de Oficiais da Escola de Saúde do Exército para a Prevenção do Câncer de Pele, Trabalho de Conclusão de Curso, Escola de Saúde do Exército, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

GONZÁLEZ, S., FERNÁNDES-LORENTE, M., GILABERTE-CALZADA, Y., 2008, “The Latest on Skin Photoprotection”, *Clinics in Dermatology*, v. 26, pp. 614-626.

GORINI, F., CHIAPPA, E., GARGANI, L., PICANO, E., 2014, “Potential Effects of Environmental Chemical Contamination in Congenital Heart Disease”, *Pediatric Cardiology*, v. 35, pp. 559-568.

HAYDEN, C.G., ROBERTS, M.S., BENSON, H.A.E., 1997, “Systemic Absorption of Sunscreen after Topical Administration”, *The Lancet*, v. 350, pp. 863-864.

HENRIQUES, B.G., 2008, Desenvolvimento e Avaliação de Preparações Lipossomais contendo Filtros Solares Sólidos UVA e UVB, Dissertação de M.Sc., UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

JANJUA, N.R., MOGENSEN, B., ANDERSSON, A., PETERSEN, J.H, HENRIKSEN, M., SKAKKEBÆK, N.E., WULF, H.C., 2004, “Systemic Absorption of the Sunscreens Benzophenone-3, Octyl-Methoxycinnamate, and 3-(4-Methyl-Benzylidene) Camphor After Whole-Body Topical Application and Reproductive Hormone Levels in Humans”, *The Journal of Investigative Dermatolology*, v.123, pp. 57-61.

JANSEN, R., OSTERWALDER, U., WANG, S.Q., BURNETT, M., LIM, H.W., 2013, “Photoprotection”, *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 69, n° 6, pp. 867-881.

JIMÉNEZ, M.M., PELLETIER, J., BOBIN, M.F., MARTINI, M.C., 2004, “Influence of Encapsulation on the *in vitro* Percutaneous Absorption of Octyl Methocynnamate”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 272, pp. 45-55.

KIM, J.J., EVANS, G.R.D., 2012, “Applications of Biomaterials in Plastic”, *Clinics in Plastic Surgery*, v. 39, pp. 359-376.

KOROLEVA, M.Y., YURTOV, E.V., 2012, “Nanoemulsions: the Properties, Methods of Preparation and Promising Applications”, *Russian Chemical*, v. 81, n° 1, pp. 21-43.

KULLAVANIJAYA, P., LIM, H.W., 2005, “Photoprotection”, *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 52, n° 6, pp. 937-958.

LANFESTER, K., EISENBLATTER, J., ROTHE, R., 2004, "Preparation of Polymerizable Miniemulsions by Ultrasonication", *Journal of Coatings Technology and Research*, v. 1, pp. 65-68.

LANDFESTER, K., MUSYANOVYCH, A., MAILANDER, V., 2010, "From Polymeric Particles to Multifunctional Nanocapsules for Biomedical Applications Using the Miniemulsion Process", *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v. 48, pp. 493-515.

LARANJEIRA, M.C.M., FÁVERE, V.T., 2009, "Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico", *Química Nova*, v. 32, n° 3, pp. 672-678.

LASIC, D.D., 1988, "The Mechanism of Vesicle Formation", *Biochemical Journals*, v. 256, pp. 1-11.

LATHA, M.S., JACINTA, M., SHOBHA, V., SHINDE, R.S., BANGERA, S., KRISHNANKUTTY, B., BELLARY S., VARUGHESE, S., RAO, P., KUMAR, B.R.N., 2013, "Sunscreening Agents - A Review", *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, v. 6, n° 1, pp. 16-26.

LÓPEZ, A., CHEMTOB, A., MILTON, J.L., MANEA, M., PAULIS, M., BARANDIARAN M.J., THEISINGER, S., LANDFESTER, K., HERGETH, W.D., UDAGAMA, R., McKENNA, T., SIMAL, F., ASUA, J.S., 2008, "Miniemulsification of Monomer-Resin Hybrid Systems", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 47, pp. 6289-6297.

LORCA, B.S.S., BESSA, E.S., NELE, M., SANTOS, E.P., PINTO, J.C., 2012, "Preparation of PMMA Nanoparticles Loaded with Benzophenone-3 through Miniemulsion Polymerization", *Macromolecular Symposia*, v. 319, pp. 246-250.

LORCA, B.S.S., 2012, Desenvolvimento de Formulação Fotoprotetora contendo Nanopartículas Poliméricas com Filtro Solar, Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

LUCENTE, A.G.B., 2008, Estudo da Copolimerização em Mini Emulsão de Metacrilato de Metila/Metacrilato de Etila, Dissertação de M.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

MAHAPATRO, A., SINGH, D.K., 2011, “Biodegradable Nanoparticles are excellent vehicle for site directed *in-vivo* delivery of drugs and vaccines”, *Journal of Nanobiotechnology*, v. 9, pp. 55-65.

MAINARDES, R.M., GREMIÃO, M.P.D., EVANGELISTA, R.C., 2006, “Thermoanalytical Study of Praziquantel-Loaded PLGA Nanoparticles”, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas – Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n° 4, pp. 523-530.

MANCIBO, S.E., HU, J.Y., 2014, “Sunscreen - A Review of Health Benefits, Regulations, and Controversies”, *Dermatologic Clinics*, v.32, n° 3, pp. 427-438.

MANSUR, C.R.E., RICCI Jr., E., CAMPOS, V.E.B., SENNA, J.P., 2014, “Nanoemulsão Óleo em Água e Seu Processo de Produção”, *Patente n° WO 2014/117236*.

MANSUR, J.S., BREDER, M.N.R., MANSUR, M.C.A., AZULAY, R.D., 1986, “Determinação do Fator de Proteção Solar por Espectrofotometria”, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 61, n° 3, pp. 121-124.

MASON, T.G., WILKING, J.N., MELESON, K., CHANG, C.B., GRAVES, S.M., 2006, “Nanoemulsions: Formation, Structure, and Physical Properties”, *Journal of Physics Condensed Matter*, v. 2006, pp. 635-666.

MCCLEMENTS, D.J., 2012, “Nanoemulsions versus Microemulsions: Terminology, Differences, and Similarities”, *Soft Matter*, v. 8, pp. 1719-1729.

MENDES, A.N., HUBBER, I., SIQUEIRA, M., BARBOSA, G.M., MOREIRA D.L., HOLANDINO, C., PINTO, J.C., NELE, M., 2012, “Preparation and Cytotoxicity of Poly(Methyl Methacrylate) Nanoparticles for Drug Encapsulation”, *Macromolecular Symposia*, v. 319, pp. 34-40.

MERTINS, O., 2004, Desenvolvimento e Caracterização de Nanovesículas Lipossômicas Compósitas de Fosfatidilcolina da Lecitina de Soja e Quitosana, Dissertação de M.Sc., UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

MIRANDA, M.C., 2005, Desenvolvimento de Lipossoma com Produto Repelente de Insetos e Metodologia Analítica, Dissertação de M.Sc., UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MONTEIRO, M.S.S.B., OZZETTI, R.A., VERGNANINI, A.L., BRITO-GITIRANA, L., VOLPATO, N.M., FREITAS, Z.M.F., RICCI-JUNIOR, E., SANTOS, E.P., 2012, "Evaluation of Octyl *p*-Methoxycinnamate Included in Liposomes and Cyclodextrins in Anti-Solar Preparations: Preparations, Characterizations and *in vitro* Penetration Studies", *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, pp. 3045-3058.

MORABITO, K., SHAPLEY, N.C., STEELEY, K.G., TRIPATHI, A., 2011, "Review of Sunscreen and the Emergence of Non-Conventional Absorbers and their Applications in Ultraviolet Protection", *International Journal of Cosmetic Science*, v. 33, pp. 385-390.

MORAIS, J.M., SANTOS, O.D.H., DELICATO, T., GONÇALVES, R.A., ROCHA-FILHO, P.A., 2006, "Physicochemical Characterization of Canola Oil/Water Nano-emulsions Obtained by Determination of Required HLB Number and Emulsion Phase Inversion Methods", *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 27, pp. 109-115.

MOTA, A.C.V., VOLPATO, N.M., FREITAS, Z.M.F., SANTOS, E.P., 2008, "Estudo de Liberação *in vitro* do Filtro Solar *p*-Metoxicinamato de Octila Incluso em Lipossoma e β -Ciclodextrina", *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.29, n° 3, pp. 285-289.

MOTA, A.C.V., FREITAS, Z.M.F., DELLAMORA-ORTIZ, G.M., OZZETTI, R.A., VERGNANINI, A.L., RIBEIRO, V.L., SILVA, R.S., SANTOS, E.P., 2013, "In vivo and in vitro Evaluation of Octyl Methoxycinnamate Liposomes", *International Journal of Nanomedicine*, v.8, pp. 4689-4701.

MUFAMADI, M.S., PILLAY, V., CHOONARA, Y.E., DU TOIT, L.S., MODI, G., NAIDOO, D., NDESENDO, V.M.K., 2011, “A Review on Composite Liposomal Technologies for Specialized Drug Delivery”, *Journal of Drug Delivery*, v. 2011, article ID 939851, 19 pages.

MYERS, D., 1999, *Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications*, 2^a ed., New York, Wiley-VCH.

NASCIMENTO, D.F., 2011, Nanocosméticos em Fotoproteção: Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas Poliméricas com Filtros Solares, Dissertação de M.Sc., UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

NASCIMENTO, L.F., SANTOS, E.P., AGUIAR, A.P., 2014, “Fotoprotetores Orgânicos: Pesquisa, Inovação e a Importância da Síntese Orgânica”, *Revista Virtual de Química*, v. 6, n^o 2, pp. 190-223.

NGUYEN, M.-H., HWANG, I.-C., PARK, H.-J., 2013, “Enhanced Photoprotection for Photo-Labile Compounds Using Double-Layer Coated Corn Oil-Nanoemulsions with Chitosan and Lignosulfonate”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 125, pp. 194-201.

NICULAE, G., LACATUSU, I., BADEA, N., MEGHEA, A., 2012, “Lipid Nanoparticles Based on Butyl-methoxydibenzoylmethane: *in vitro* UVA Blocking Effect”, *Nanotechnology*, v. 23, n^o 31.

ODIAN, G., 2004, *Principles of Polymerization*, 4^a ed., New Jersey, John Wiley & Sons.

OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V., CORREA, M.A., CERA, L.F.R., FORMARIZ, T.P., 2004, “Microemulsões: Estrutura e Aplicações como Sistema de Liberação de Fármacos”, *Química Nova*, v. 27, n^o 1, pp. 131-138.

OLIVEIRA, M.A.M., MELO Jr., P.A., NELE, M., PINTO, J.C., 2012, “Suspension Copolymerization of Vinyl Acetate and Methyl Methacrylate in the Presence of Amoxicillin”, *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 6, pp. 280-292.

OLIVEIRA, M.A.M., NELE, M., PINTO, J.C., 2013, “Polimerização RAFT em Miniemulsão”, *Polímeros*, v. 23, n° 6, pp. 1-14.

ORÉFICE, R.L., “Materiais Poliméricos: Ciência e Aplicação como Biomateriais”, In: ORÉFICE, R., PEREIRA, M., MANSUR, H. (eds), *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*, 1ª ed., Rio de Janeiro, Cultura Médica, 2006.

PUGLIA, C., TROMBETTA, D., VENUTI, V., SAIJA, A., BONINA, F., 2010, “Evaluation of *in-vivo* Topical anti-Inflammatory Activity of Indometacin from Liposomal Vesicles”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 56, n° 10, pp. 1225-1232.

SAMBANDAN, D.R., RATNER, D., 2011, “Sunscreens: An Overview and update”, *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 64, n° 4, pp. 748-758.

SANTOS, V.M., 2007, Preparação de Filtros Solares em Nanosistema Visando à Maior Ação Protetora, Dissertação de M.Sc., UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SCHAFFAZICK, S.R., GUTERRES, S.S., FREITAS, L.L., POHLMANN, A.R., 2003, “Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos”, *Química Nova*, v. 26, n° 5, pp. 726-737.

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., 2004, “Endocrine Activity and Developmental Toxicity of Cosmetic UV Filters – an Update”, *Toxicology*, v. 205, pp. 113-122.

SCHORK, F.J., LUO, Y., SMULDERS, W., RUSSUM, J.P., BUTTÉ, A., FONTENOT, K., 2005, “Miniemulsion Polymerization”, *Advances in Polymer Science*, v. 175, pp. 129-255.

SERPONE, N., DONDI, D., ALBINI, A., 2007, “Inorganic and Organic UV Filters: Their Role and Efficacy in Sunscreens and Suncare Products”, *Inorganica Chimica Acta*, v. 360, n° 3, pp. 794-802.

SHAATH, N.A., “Evolution of Modern Sunscreen Chemicals”, In: Lowe, N.J., SHAATH, M.A., PATHAK, M.A. (eds), *Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects*, 2^a ed., New York, Marcel Dekker, 1997.

SHARMA, A., KUMAR, S., MAHADEVAN, N., 2012, “Nanotechnology: A Promising Approach for Cosmetics”, *International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research*, v. 2, n° 2, pp. 54-61.

SILVA, F.M., LACERDA, P.S.B., JUNIOR, J.J., 2005, “Desenvolvimento Sustentável e Química Verde”, *Química Nova*, v. 28, n° 1, pp. 103-110.

SILVA, D.G., SARRUF, F.D., OLIVEIRA, L.C.D., ARÊAS, E.P.G., KANEKO, T.M., CONSIGLIERI, V.O., VELASCO, M.V.R., BABY, A.R., 2013, “Influence of Particle Size on Appearance and *in vitro* Efficacy of Sunscreens”, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, n° 2, pp.251-261.

SIQUEIRA, N.M., 2008, Desenvolvimento Tecnológico e Avaliação da Penetração Cutânea de Benzofenona-3 a partir de Nanocápsulas Revestidas com Quitosana, Dissertação de M.Sc., UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

SOLANS, C., IZQUIERDO, P., NOLLA, J., AZEMAR, N., GARCIA-CELMA, M.J., 2005, “Nano-emulsions”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 10, pp. 102-110.

SONNEVILLE-AUBRUN, O., SIMONNET, J.T., L'ALLORET, F., 2004, “Nanoemulsions: A New Vehicle for Skincare Products”, *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 108, pp. 145-149.

SOPPIMATH, K.S., AMINABHAVI, T.M., KULKARNI, A.N., RUDZINSKI, W.E., 2001, “Review – Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices”, *Journal of Controlled Release*, v. 70, pp. 1-20.

SPERNARTH, L., MAGDASSI, S., 2007, “Preparation of Ethyl Cellulose Nanoparticles from Nano-emulsion Obtained by Inversion at Constant Temperature”, *Micro & Nano Letters*, v. 2, n° 4, pp. 90-95.

STAMATAS, G.N., STERKE, J. de, HAUSER, M., STETTEN, O. von, POL, A. van der, 2008, “Lipid Uptake and Skin Occlusion Following Topical Application of Oils on Adult and Infant Skin”, *Journal of Dermatological Science*, v. 50, pp. 135-142.

TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., SOLANS, C., 2004, “Formation and Stability of Nano-emulsions”, *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 108, pp. 303-318.

TORCHILIN, V.P., 2005, “Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers”, *Nature Reviews – Drug Discovery*, v. 4, pp. 145-160.

VELASCO, M.V.R., BALOGH, T.S., PEDRIALI, C.A., SARRUF, F.D., PINTO, C.A.S.O., KANEKO, T.M., BABY, A.R., 2011, “Novas Metodologias Analíticas para Avaliação da Eficácia Fotoprotetora (*in vitro*) – Revisão”, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 32, n° 1, pp. 27-34.

VERMURI, S., RHODES, C.T., 1995, “Preparation and Characterization of Liposomes as Therapeutic Delivery Systems: A Review”, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 70, pp. 95-111.

WOLF, R., WOLF, D., MORGANTI, P., RUOCCO, V., 2001, “Sunscreen”, *Clinics in Dermatology*, v. 19, pp. 452-459.

WU, P.S., HUANG, L.N., GUO, Y.C., LIN, C.C., 2014, “Effect of the Novel Poly (methyl methacrylate) (PMMA)-encapsulated Organic Ultraviolet (UV) Filters on the UV absorbance and in vitro Sun Protection Factor (FPS)”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 131, pp. 24-30.

YENER, G., INCEGUL, T., YENER, N., 2003, “Importance of Using Solid Lipid Microspheres as Carriers for UV Filters on the Example Octyl Methoxy Cinnamate”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 258, pp. 203-207.

Sítio eletrônico da Sigma Aldrich. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>. Acesso em 16 de dezembro de 2014.

Apêndice A

Espectros de absorção dos filtros solares

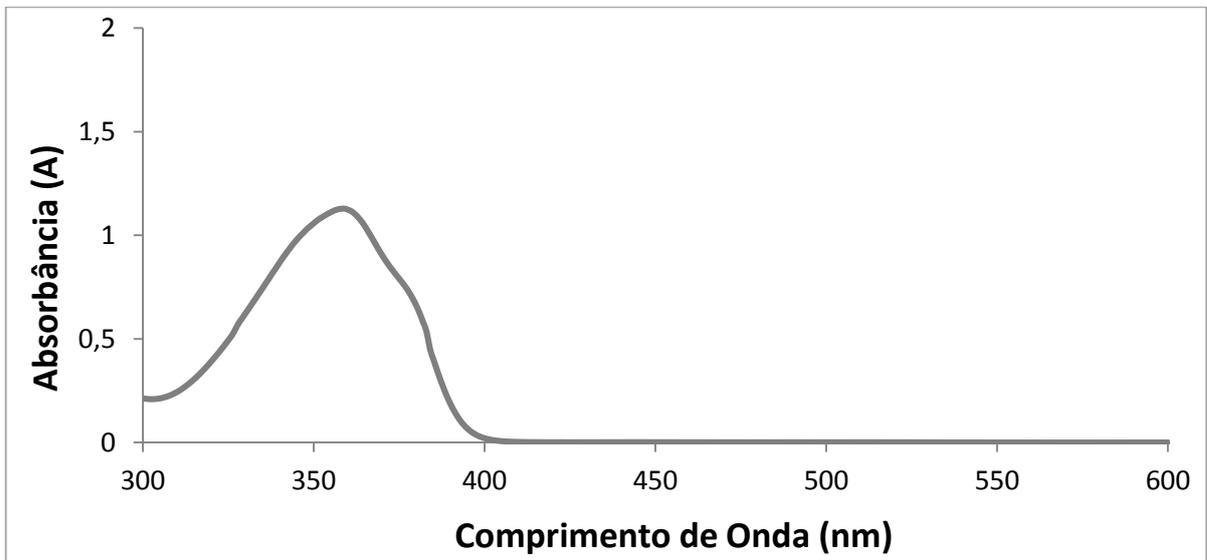


Figura A.1: Espectro de absorção do filtro solar avobenzona.

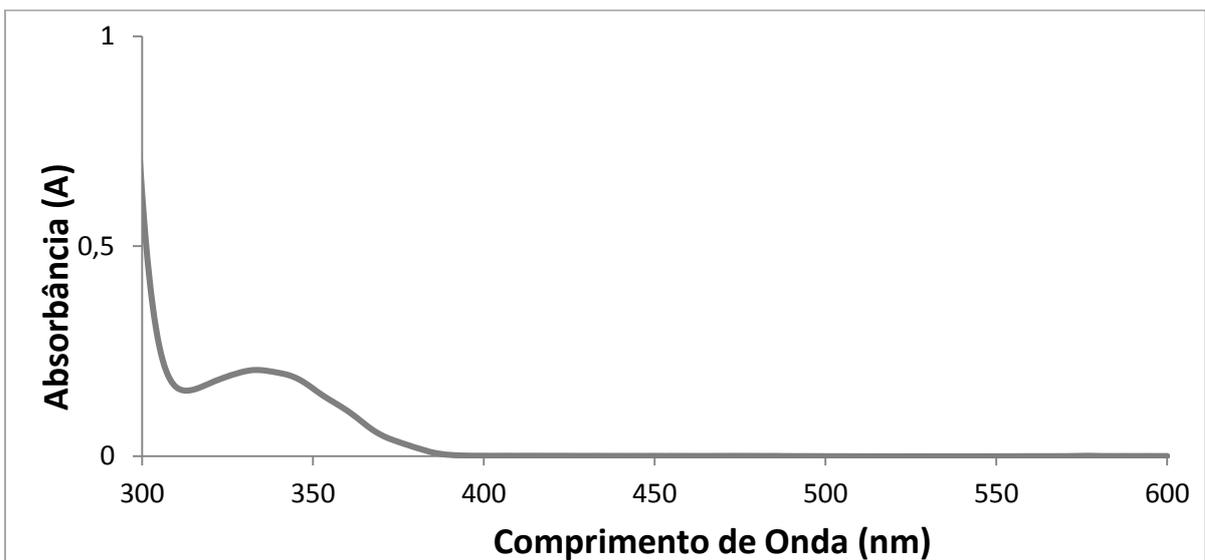


Figura A.2: Espectro de absorção do filtro solar benzofenona-3.

Apêndice B

Espectros de absorção dos lipossomas puros e das nanopartículas poliméricas puras.

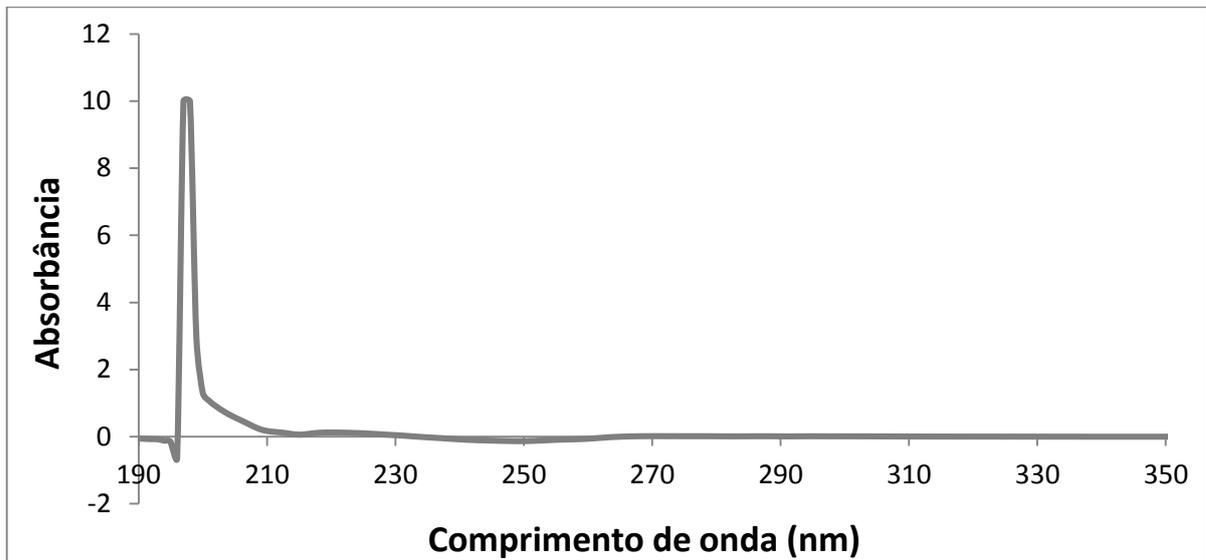


Figura B.1: Espectro de absorção da amostra LIPO 01.

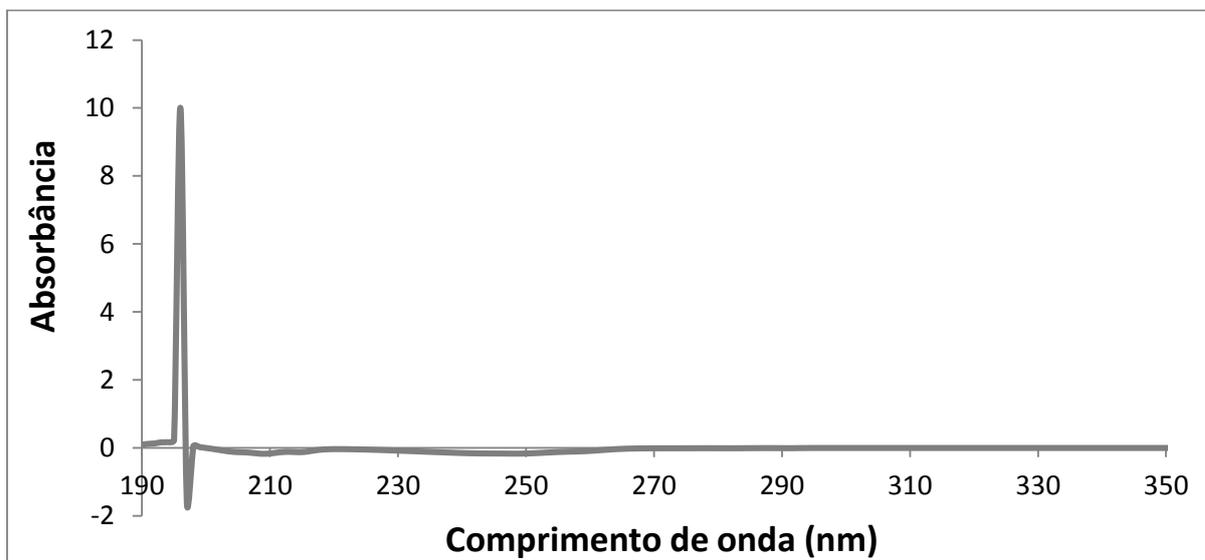


Figura B.2: Espectro de absorção da amostra LIPO 02.

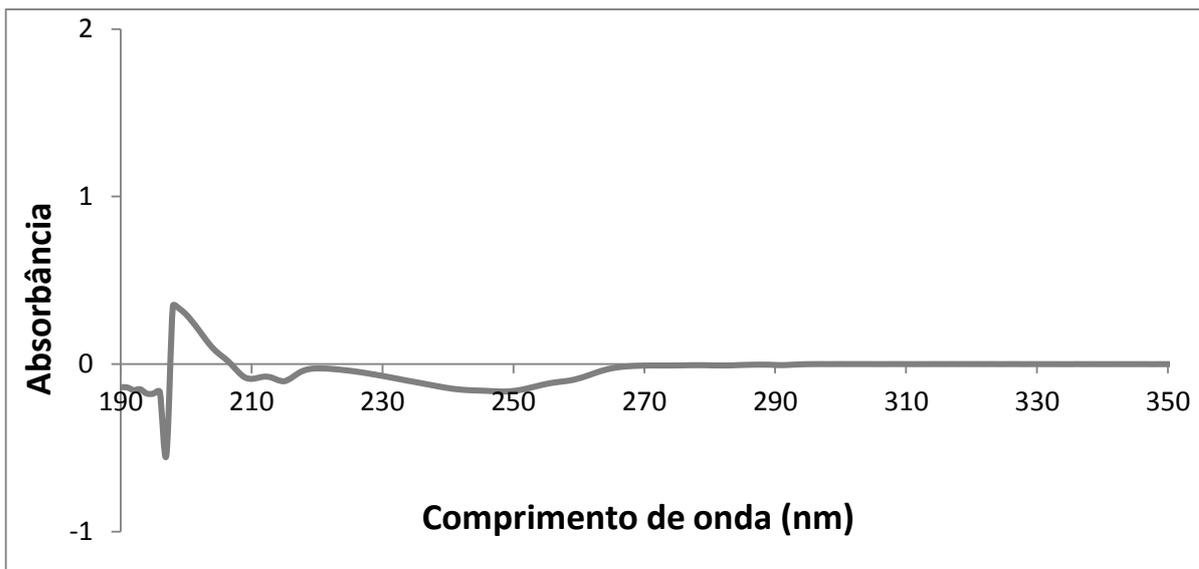


Figura B.3: Espectro de absorção da amostra LIPO 03.

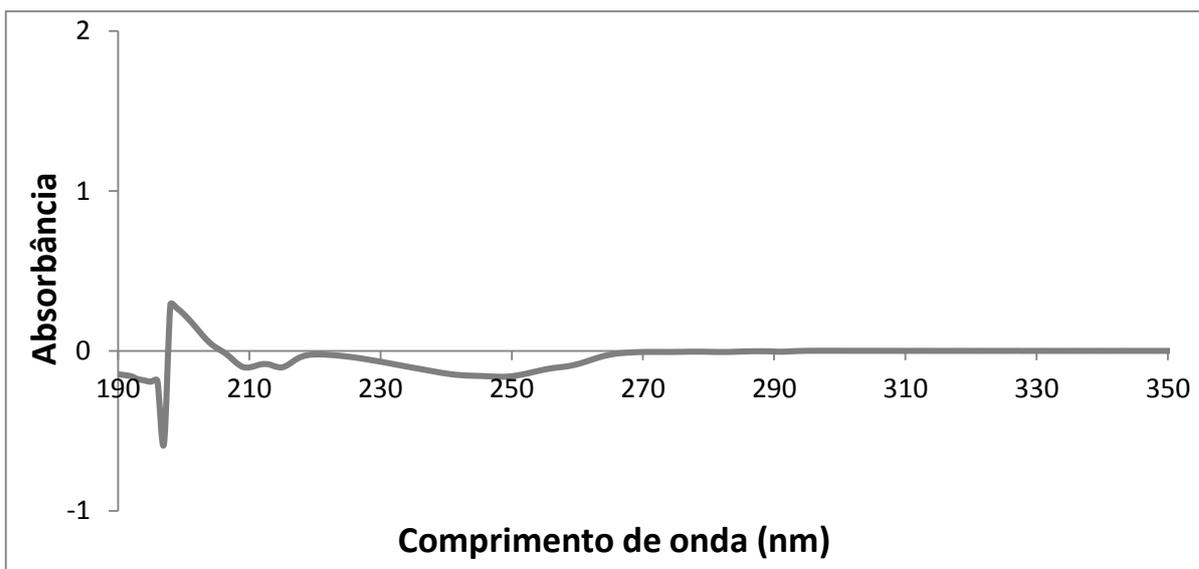


Figura B.4: Espectro de absorção da amostra LIPO 04.

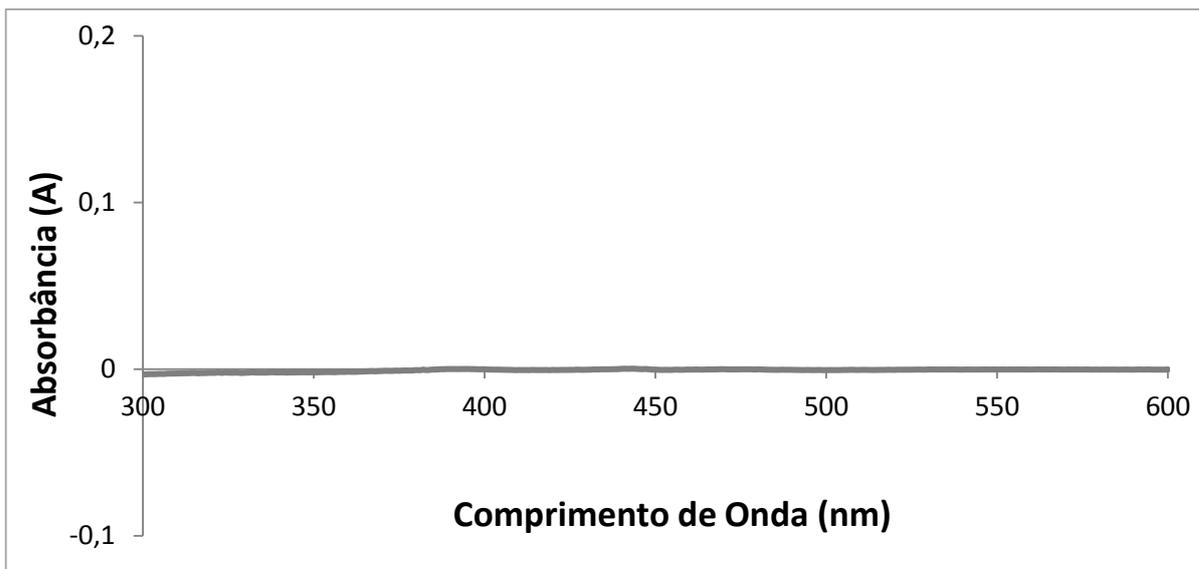


Figura B.5: Espectro de absorção das nanopartículas poliméricas puras (PMMA).