UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento, avaliação da segurança e eficácia clínica de sistemas nanoparticulados de gelatina contendo rutina

Camila Areias de Oliveira

Tese para a obtenção do grau de DOUTOR

Orientador: **Prof. Dr. André Rolim Baby**

São Paulo

2015

Camila Areias de Oliveira

Desenvolvimento, avaliação da segurança e eficácia clínica de sistemas nanoparticulados de gelatina contendo rutina

Tese para a obtenção do grau de DOUTOR

Orientador: **Prof. Dr. André Rolim Baby**

São Paulo

2015

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

O48d Oliveira, Camila Areias de
Desenvolvimento, avaliação da segurança e eficácia clínica de sistemas nanoparticulados de gelatina contendo rutina / Camila Areias de Oliveira. -- São Paulo, 2015.
157p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Baby, André Rolim

1. Proteção solar : Cosmetologia 2. Nanotecnologia I. T. II. Baby, André Rolim, orientador.

668.55 CDD

Desenvolvimento, avaliação da segurança e eficácia clínica de sistemas nanoparticulados de gelatina contendo rutina

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. André Rolim Baby
Orientador/presidente

_____

1º Examinador

_____

2º Examinador

_____

3º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015

DEDICATÓRIA

Dedico essa Odisseia acadêmica

Aos Meus pais, **Luis Fernando** e **Dilma**
À minha irmã, **Fernanda**

Ao meu orientador e mestre,

Prof.º Drº André Rolim Baby

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional e a relação afetiva com a educação!

Ao meu orientador, amigo e mestre **Prof. Dr. André Rolim Baby**, por ter me acolhido e divido seus conhecimentos pessoais e profissionais. Agradeço principalmente pela confiança e o carinho em mim depositados nesses quatro anos!

À querida **Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco**, pela confiança e carinho.
À querida **Profa. Dra. Nádia Araci Bou Chacra**, pelo imenso suporte e carinho.

À minha querida supervisora de estágio em pesquisa no exterior, **Profa. Dra. Catarina Rosado**, pelo acolhimento, ensinamentos e imenso carinho.

Aos professores do Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde (CBIOS) da Universidade Lusófona em Lisboa, pelo acolhimento carinhoso e pelos ensinamentos divididos: **Joana Mota**, **Nuno Saraiva**, **Ana Sofia Fernandes**, **Tânia Almeida**, **Luís Rodrigues** e **Henrique Silva**.

A todos os **professores** e **professoras** do Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, que muito me ensinaram durante as disciplinas, reuniões e representação discente.

Aos parceiros de vida acadêmica e laboratório, por dividirem diariamente esse momento muito especial de formação profissional e científica: **Ana Lúcia**, **André**, **Bruna**, **Daniela**, **Danielle**, **Débora**, **Fabiana**, **Fernanda**, **Franciele**, **Gabriela**, **Kamila**, **Karina**, **Larissa**, **Letícia**, **Margarida**, **Maíra**, **Mariana Guimarães**, **Mariana Pires**, **Mayara**, **Marina**, **Michelle, Michelli**, **Mirela**, **Mirla**, **Nicole**, **Paula**, **Priscila**, **Rafael**, **Tércio**, **Thalita**, **Thamires**, **Victoria**, **Viviane** e **Vitor**.

À **Silvia Dotta**, **Paulo Aguiar** e **Érica Jorge** pelo profundo mergulho na EaD.

As amadas amigas que a UFRJ me deu **Michele Caetano** e **Sara Lins**.

À **Rafael Lacanna Mendes** pelo carinho e apoio incondicional.

Aos técnicos e queridos amigos, **Claudinéia** e **Edgar**, pelo apoio e carinho.

Aos funcionários da FCF-USP: **David**, **Doralice**, **Elizabete**, **Elaine**, **Jorge**, **Mirian** e **Irineu**, pela enorme competência e suporte.

À **Fabiana Inácio**, pela grande ajuda com as análises microbiológicas.

À **Ana Lúcia Freire** e **Mayara Kojima**, pela ajuda nos ensaios dessa Tese e por me proporcionar o desafio e a alegria de ensiná-las.

À **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**, em especial à **Fernanda Sarruf**, pela parceria na realização dos ensaios *in vivo.*

Às empresas **Gelita** e **Seppic**, pelo fornecimento de amostras.

Ao **CNPq**, **CAPES** e **FAPESP**, pelos auxílios financeiros, diretos e indiretos, para a realização desta pesquisa.

À **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, pela incrível oportunidade de ter me concedido o título de farmacêutica.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**, pelo acolhimento, estrutura, ensinamentos, e por ter proporcionado minha descoberta vocacional.

E a todos que participaram da minha Odisseia acadêmica!

“*Por mais que se avance em cada ciência, chega-se a um ponto onde ou se tem de decretar arbitrariamente que além de ali se não quer ir, ou de parar de cansaço, tão de inexplicável em inexplicável se vai - e em qualquer dos casos fica, quer queiramos quer não, o vago para além do ponto onde, cansados ou teimosos, paramos***”.**

Fernando Pessoa

“O binômio de Newton é tão belo como a Vénus de Milo. O que há é pouca gente para dar por isso (...)".

Fernando Pessoa

RESUMO

OLIVEIRA, C.A. **Desenvolvimento, avaliação da segurança e eficácia clínica de sistemas nanoparticulados de gelatina contendo rutina**. 2015. 157p (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A associação de filtros solares a compostos bioativos tem sido estudada com ênfase na última década. Contudo, a solubilidade limitada dos compostos naturais, tais como a rutina, restringe o desenvolvimento de preparações cosméticas seguras, funcionais e estáveis. A proposta deste estudo envolveu a obtenção de nanoestruturas de gelatina (contendo ou não rutina) para aplicação em protetores solares. Os objetivos específicos foram: *(1)* preparar partículas de gelatina; *(2)* realizar a caracterização física, físico-química, morfológica, térmica e funcional (*in vitro*)*; (3)* avaliar a citotoxicidade e a penetração/permeação curtânea *in vitro* dos sistemas; *(4)* desenvolver fotoprotetores bioativos de eficácia estimada *in vitro*; e *(5)* determinar a segurança e eficácia clínica fotoprotetora das preparações contendo as estruturas proteicas. As nanopartículas apresentaram-se esféricas e com diâmetro médio e índice de polidispersividade variando entre 318,9 ± 6,9 (B-NC) a 442,8 ± 4,9 nm (R-NC) e 0,06 ± 0,03 (B-NC) a 0,12 ± 0,01 (R-NC), respectivamente. Os valores do potencial zeta apresentaram-se entre -28,5 ± 0,9 mV (B-NC) e -26,6 ± 0,5 mV (R-NC). R-NC apresentou eficiência de associação equivalente a 51,8 ± 1,4%. Os ensaios de segurança das nanopartículas evidenciaram perfil citotóxico adequado para aplicação cosmética, bem como, a ausente tendência de penetração/permeação cutânea. Tendo em vista os resultados obtidos *in vitro*, as nanopartículas contendo rutina apresentaram capacidade antioxidante 74% superior à rutina em seu estado livre e contribuíram para o aumento de 48% do fator de proteção solar (FPS) quando associada à avobenzona (butyl methoxydibenzoylmethane), ao *p*-metoxicinamato de octila (ethylhexyl methoxycinnamate) e ao octil dimetil PABA (ethylhexyl dimethyl PABA). A avaliação da eficácia clínica das formulações evidenciou a influência da nanopartícula, sem adição do flavonoide, na proteção da pele contra a formação do eritema UV induzido. Por meio da avaliação dos aspectos funcionais, foi possível constatar, *in vitro* e *in vivo*, que a adição das nanopartículas em sistemas fotoprotetores influenciou seu perfil de transmitância da radiação UV, bem como, seus efeitos sobre o eritema UV induzido. Os resultados obtidos apresentaram perspectivas de aplicação prática no desenvolvimento de produtos cosméticos fotoprotetores associados a substâncias bioativas, por meio de plataforma nanotecnológica.

Palavras-chave: rutina, gelatina, nanopartícula, fotoproteção, filtro solar

ABSTRACT

OLIVEIRA, C.A. **Desenvolvimento, avaliação da segurança e eficácia clínica de sistemas nanoparticulados de gelatina contendo rutina**. 2015. 157p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Especially, in the last decade, the association of chemical filters and bioactive compounds has been studied by several authors. However, the limited solubility of natural compounds, such as rutin restricts the development of safe and stable cosmetic preparations. The aim of this work was the development of gelatin nanoparticles (with or without rutin) as an ingredient in sunscreens. The specific goals were: (1) the development of rutin-loaded gelatin nanoparticles; (2) to perform the physical, physical-chemical, morphological, thermal and functional (in *vitro*) analysis; (3) to assess the cytotoxicity and skin penetration / permeation *in vitro* of the nanoparticles; (4) to develop bioactive sunscreens and to perform the in vitro photoprotection efficacy assay; and (5) to evaluate the *in vivo* sun protection factor (SPF) of the formulations. The nanoparticles were spherical with an average size and polydispersive index between 318.9 ± 6.9 nm (B-NC) at 442.8 nm ± 4.9 (R-NC), and 0.06 ± 0, 03 (B-NC) to 0.12 ± 0.01 (R-NC). The zeta potential values were high and negative, ranging from -28.5 ± 0.9 mV (B-NC) and -26.6 ± 0.5 mV (R-NC). R-NC entrapment efficient was 51.8 ± 1.4%. The nanoparticle safety assessment showed a cytotoxic profile suitable for cosmetic application, as well as the absent trend of penetration/ permeation of the skin. The *in vitro* results indicated that the rutin-loaded gelatin nanoparticles increased 74% the antioxidant profile in comparison with free rutin and also increased 48% the SPF (*in vitro*) when combined with butyl methoxydibenzoylmethane, ethylhexyl methoxycinnamate and ethylhexyl dimethyl PABA. The assessment of the clinical efficacy assays showed the influence of blank nanoparticle in the protection of the skin against UV-induced erythema response. It was established *in vitro* and *in vivo* that the addition of gelatin nanoparticles in sunscreens influenced its UV transmittance profile, as well as its anti-erythema effects on the skin. The results have practical application in the development of sunscreen with bioactive ingredients and at the design of an innovative ingredient with a chemopreventive profile.

Key-words: rutin, gelatin, nanoparticle, photoprotection, sunscreen

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.Composição quali/quantitativa (%) de amino ácidos da gelatina tipo B (ZWIOREK, 2006).....40
Tabela 2. Matérias-primas utilizadas no desenvolvimento das formulações cosméticas.....49
Tabela 3.Composição qualitativa e quantitativa (% p/p) das formulações fotoprotetoras.....64
Tabela 4. Escala de Draize para avaliação do grau de irritação cutânea.....72
Tabela 5. Nanopartículas preparadas em meio alcalino.....82
Tabela 6. Valores de pH das nanopartículas preparadas em meio alcalino.....83
Tabela 7. Caracterização física das partículas: diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta 85
Tabela 8. Avaliação da estabilidade física da amostra R-NC durante 90 dias em geladeira(5,0 ± 2,0 ℃).....89
Tabela 9. Dados termogravimétricos das matérias primas, mistura física dos componentes e NPGs.....92
Tabela 10. Dados para a construção da curva analítica das diluições do flavonoide rutina padrão de referência primário (T = 97,1%).....97
Tabela 11. Análise de regressão na avaliação da linearidade da curva analítica do flavonide rutina padrão de referência primário (T = 97,1%).....98
Tabela 12. Precisão intradia das soluções de rutina padrão de referência primário (T=97,1%).....103
Tabela 13. Precisão interdia das soluções de rutina padrão de referência primário (T=97,1%).....104
Tabela 14. Exatidão intradia a partir do ensaio de recuperação do padrão de referência primário (T=97,1%) na presença da preparação de nanopartículas de gelatina sem adição de rutina.....105
Tabela 15. Exatidão interdia a partir do ensaio de recuperação do padrão de referência primário (T=97,1%) na presença da preparação de nanopartículas de gelatina sem adição de rutina.....106
Tabela 16. Eficiência de associação do flavonoide rutina ao sistema nanoparticulado de gelatina.....108

Tabela 17. Porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL) da rutina e das nanopartículas de gelatina antes e depois da irradiação 119
Tabela 18. Características organolépticas das formulações fotoprotetoras submetidas ao estudo de estabilidade preliminar.....121
Tabela 19. Características organolépticas, físicas e físico-químicas dos fotoprotetores no T0 (24 horas após o preparo) 122
Tabela 20. Características organolépticas, físicas e físico-químicas dos fotoprotetores no T12 (ao final do ciclo).....123
Tabela 21. FPS e comprimento de onda crítico das formulações antes e após irradiação 127
Tabela 22. Avaliação microbiológica das formulações em estudo.....131
Tabela 23. Ensaios de segurança *in vivo* das formulações.....132
Tabela 24. FPS *in vivo* e FPUVA *in vitro* das formulações desenvolvidas 133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Índice UV do Brasil para o dia 28/08/2014 (CPTEC, 2014) 21
Figura 2. Estrutura química da avobenzona e sua possível fragmentação em radicais fenacila e benzoila após irradiação solar (KOCKLER *et al*,. 2012).....25
Figura 3. Espectro UV da avobenzona em solução (5µg/ml) em DMSO 26
Figura 4. Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto (PINTO, 2014).....27
Figura 5. Estrutura química do octil dimetil PABA (KOCKLER *et al*,. 2012).....28
Figura 6. Estrutura química do p-metoxicinamato de octila (KOCKLER *et al*,. 2012).....29
Figura 7. Isomerização trans-cis do *p*-metoxicinamato de octila (KOCKLER *et al*,. 2012).....29
Figura 8. Representação esquemática do núcleo comum fundamental dos flavonoides (estrutura química geral) (PIETTA, 2000). 30
Figura 9. Estrutura química da rutina (PIETTA, 2000). 31
Figura 10. Sítios de ligação de metais (PIETTA, 2000). 32
Figura 11. Formação de agregados e aglomerados, a partir de nanopartículas primárias de TiO_2 (WANG; TOOLEY, 2011).....35
Figura 12. Efeito dos filtros físicos (pigmentos de maior tamanho e nanopartículas) sobre a radiação UV quando aplicado na pele (MORABITO *et al.*, 2011). 36
Figura 13. Processo de obtenção da gelatina ácida e básica (TABATA; IKADA, 1998).....39
Figura 14. Estrutura química básica da gelatina (ELZOGHBY, 2013). 40
Figura 15. Reações químicas entre polifenois e grupamentos amino de cadeias polipepitídicas 42
Figura 16. Polimerização do glutaraldeído em solução ácida e alcalina(HERMANSON, 2008) 80
Figura 17. Reação do glutaraldeído com aminas primárias (HERMANSON, 2008).....80
Figura 18. Intensidade de espalhamento de luz em função da distribuição de tamanho 86

Figura 19. Fotomicrografias de R-NC (esquerda) e B-NC (direita). As imagens confocais foram obtidas com excitação a 458,0 nm, com 30% de intensidade de laser para R-NC e 80% para B-NC. A emissão da flurescência foi recolhida na faixa de 475,0-700,0 nm 90
Figura 20. Fotomicrografia por MEV das nanopartículas B-NC (A) e R-NC (B) em aumentos de 30.000 vezes 91
Figura 21. Perfil Termoanalítico das matérias primas, mistura física dos componentes e das NPGs obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL /min): TG: curva A; DTG curva B ; DSC curva C; DDSC curva D 93
a 22 93
Figura 23. Curva analítica do flavonoide rutina padrão de referência primário (T = 97,1%) 98
Figura 24. Cromatrograma referente ao flavonoide rutina, padrão de referência primário (97,1%; 20 µg/mL).....100
Figura 25. Cromatrograma referente ao flavonoide rutina, amostra comercial (95,0%; 20 µg/mL).. 101
Figura 26. Cromatograma referente a amostra de nanopartícula sem adição do flavonoide. 102
Figura 27. Cromatrograma referente à quantificação de rutina total.. 107
Figura 28. Cromatrograma referente à quantificação de rutina livre.:. 109
Figura 29. Perfil da citotoxicidade de queratinócitos humanos *in vitro* após 3 horas de incubação.....112
Figura 30. Perfil da citotoxicidade de queratinócitos humanos *in vitro* após 24 horas de incubação.....113
Figura 31. Representação molecular da reação de redução do DPPH• 117
Figura 32. Perfil espectrofotométrico das amostras R-NC e RL, na mesma concentração do flavonoide (6,0mg/mL), e B-NC. 125
Figura 33. Perfil espectrofotométrico das amostras das formulações fotoprotetoras.....128

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Limite de detecção 54
Equação 2. Limite de quantificação 55
Equação 3. Precisão, calculada como desvio padrão relativo (DPR, %) 56
Equação 4. Exatidão (%) 57
Equação 5. Taxa de associação do flavonoide (%) com os sistemas nanoestruturados 58
Equação 6. Equação determinante da porcentagem de sequestro de radicais livres 62
Equação 7. Fator de Proteção Solar *in vitro* (FPS estimado) 69
Equação 8. Comprimento de onda crítico *in vitro*.....69
Equação 9. Fator de proteção solar *in vivo*.....75
Equação 10.Dose de radiação (D) aplicada às formulações fotoprotetoras 76
Equação 11. Fator de Proteção UVA.....76
Equação 12. Diâmetro hidrodinâmico 84

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE EQUAÇÕES

1. INTRODUÇÃO 16

2. REVISÃO DE LITERATURA 19

2.1 Espectro solar e impactos deletérios da radiação ultravioleta sobre a pele 19

2.2 Fotoproteção 22

2.3 Flavonoides 30

2.4 Rutina 31

2.5 Nanotecnologia 34

2.6 Nanopartículas aplicadas à fotoproteção 34

2.7 Gelatina 38

3. OBJETIVOS 44

3.1 Objetivo geral: 44

3.2 Objetivos específicos: 44

4. MATERIAL E MÉTODOS 46

4.1 Materiais 46

4.2 Métodos 50

4.2.1 Obtenção das partículas de gelatina 50

4.2.2 Determinação do valor de pH 51

4.2.3 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta 51

4.2.4 Microscopia confocal de fluorescência.....51
4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura 52
4.2.6 Caracterização Térmica.....52
4.2.7 Validação de método analítico para determinação da taxa/eficiência de associação do flavonoide nas nanoestruturas.....53
4.2.8 Determinação da concentração total do flavonoide.....57
4.2.9 Taxa/eficiência de associação do flavonoide nas nanopartículas.....57
4.2.10 Avaliação da citotoxicidade dos sistemas nanoparticulados.....58
4.2.11 Avaliação da penetração/permeação cutânea in vitro.....60
4.2.12 Avaliação da atividade antirradicalar e fotoestabilidade funcional das nanopartículas.....61
4.2.13 Preparo das formulações dermocosméticas.....62
4.2.14 Avaliação preliminar da estabilidade 66
4.2.15 Teste de estabilidade acelerada.....66
4.2.16 Atividade fotoprotetora *in vitro* 68
4.2.17 Avaliação *in vitro* da fotoestabilidade das formulações.....69
4.2.18 Ensaios in vivo – aspectos legais e éticos.....70
4.2.19 Ensaios de segurança das formulações.....71
4.2.20 Determinação do FPS (estático).....74
4.2.21 Fator de Proteção UVA (FPUVA).....76
4.2.22 Forma de análise de resultados.....76
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 79
5.1 Obtenção das partículas de gelatina.....79
5.2 Determinação do valor de pH.....83
5.3 Determinação do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersividade e potencial zeta.....84
5.4 Microscopia confocal de fluorescência 89
5.5 Microscopia eletrônica de varredura 91
5.6 Caracterização Térmica.....92
5.7 Validação de método analítico para determinação da taxa/eficiência de associação do flavonoide nas nanoestruturas.....96
5.8 Determinação da concentração total do flavonoide.....106

5.9 Taxa/eficiência de associação do flavonoide nas nanopartículas.....107
5.10 Avaliação da citotoxicidade dos sistemas nanoparticulados.....110
5.11 Avaliação da penetração/permeação cutânea in vitro 114
5.12 Avaliação da atividade antirradicalar e fotoestabilidade funcional das nanopartículas.....117
5.13 Preparo das formulações dermocosméticas.....119
5.14 Avaliação preliminar da estabilidade.....120
5.15 Teste de estabilidade acelerada.....121
5.16 Atividade fotoprotetora *in vitro* das nanopartículas.....125
5.17 Avaliação *in vitro* da atividade fototprotetora e da fotoestabilidade das formulações.....127
5.18 Ensaios de segurança das formulações.....130
5.19 Determinação do FPS (estático) e Fator de Proteção UVA (FPUVA)..132
6. CONCLUSÕES 136
7. REFERÊNCIAS 139
Anexo A- Informações para os membros de banca julgadora de Doutorado.159
ANEXO B- Aprovação do comitê de ética 161
ANEXO C- Currículo lattes 165
ANEXO D – Ficha do aluno 172
ANEXO E- Produção científica na forma de artigo 176

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Fotoprotetores são utilizados na prevenção de danos causados pela radiação solar, protegendo a pele dos eventos adversos, dentre eles: queimaduras, fotoenvelhecimento, carcinoma, melanoma e a indução da imunossupressão sistêmica, entre outros. As formulações fotoprotetoras são, geralmente, compostas por filtros químicos (orgânicos) ou físicos (inorgânicos), ou a combinação de ambos. O desenvolvimento de protetores solares de amplo espectro, utilizando concentrações reduzidas de filtros químicos, favorece a segurança clínica das formulações nas condições normais e previsíveis de uso e tal tendência é ocasionada pelas possíveis reações alérgicas ou irritativas e pela possibilidade de permeação cutânea dos compostos ativos. Estudos nessa área almejam desenvolver novas moléculas ou descobrir potenciais de uso para substâncias não utilizadas para esta finalidade (FLOR; DAVALOS; CORREA, 2007; GIOKAS *et al*., 2007; GILBERT *et al*., 2012; BURNETT; WANG, 2011).

Ao longo dos anos, diversos pesquisadores estudaram os efeitos sinérgicos da associação de compostos bioativos e filtros solares químicos. Na última década, o *Grupo de Cosmetologia* da *Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP,* dedicou-se à compreensão dos mecanismos de interação entre a rutina e filtros solares de classes diversas. As referidas pesquisas versaram sobre o entendimento acerca de elementos que compõem a temática da fotoproteção, tais como, eficácia fotoprotetora, fotoinstabilidade e aspectos relacionados à segurança. Todavia, a utilização do composto bioativo apresenta limitações, tendo em vista a dificuldade de incorporação do flavonoide nas preparações cosméticas, devido à solubilidade reduzida nos veículos de aplicação tópica, sem adição de solventes que apresentam potencial de sensibilização cutânea e que sejam permitidos para o uso proposto (OLIVEIRA *et al*., 2015; PERES *et al*., no prelo; PINTO, 2014; SCALIA; MEZZENA, 2010; VELASCO *et al*., 2008b).

A nanoencapsulação de compostos ativos antioxidantes, como a rutina, representa uma perspectiva promissora para a fotoproteção bioativa. Nesse contexto, a busca por polímeros biocompatíveis, seguros e com propriedades

multifuncionais é desejável. Por conseguinte, a gelatina, um ingrediente conhecido pelas suas características biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicas, foi selecionada como biopolímero no presente trabalho. Tal perspectiva introduz a utilização de nanopartículas de gelatina (NPGs) para aplicação na fotoproteção (CURCIO *et al*., 2010).

Tendo em vista o panorama que contempla a potencial atividade fotoprotetora da rutina, sua estabilidade química e funcional em veículos de aplicação tópica e seu efeito sinérgico no aumento do valor de fator de proteção solar (FPS) em associação com filtros solares químicos UVB e UVA, justifica-se o desenvolvimento de sistemas particulados de gelatina contendo rutina, visando à obtenção de matéria-prima inovadora e funcional para utilização dermocosmética e, por conseguinte, o desenvolvimento de fotoprotetores de amplo espectro, de eficácia estimada *in vitro* por espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração e confirmada *in vivo*, partindo-se da incorporação das NPGs em veículos de aplicação tópica. Por fim, ressalta-se o caráter vanguardista do presente estudo que alia o desenvolvimento e aplicação cosmética de um ingrediente nanoparticulado, bem como, sua caraterização, avaliação de segurança e eficácia, por meio de métodos *in vitro* e *in vivo*.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *ESPECTRO SOLAR E I*MPACTOS DELETÉRIOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA SOBRE A PELE

A vida na Terra evoluiu sob influência da radiação solar. O corpo humano percebe a incidência das radiações por diversos mecanismos. A radiação infravermelha é percebida sob a forma de calor, a visível por meio das diferentes cores detectadas pelo sistema ótico e, a ultravioleta (UV), pelas reações fotoquímicas. A energia da radiação solar aumenta com a diminuição do comprimento de onda (λ), portanto, a radiação UV, de intervalo de λ (nm) inferior, é a mais energética e de maior propensão à indução de reações fotoquímicas. O espectro da radiação UV se apresenta subdividido, por conveniência didática, em: UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm). Adicionalmente, a radiação UVA é subdividida em: UVA I (340-400nm) e UVA II (320-340nm). UVB e UVA são as componentes espectrais UV, que atingem a superfície do planeta, haja vista que a radiação UVC é absorvida pelo oxigênio e ozônio presentes na atmosfera terrestre (UNITED STATES, 2007; FLOR; DAVALOS; CORREA, 2007; BRASIL, 2012a; IKEHATA; ONO 2011; SAEWAN; JIMTAISONG, 2013).

A radiação UVB, em função da intensidade de exposição, pode causar dano ao DNA celular, induzir processos inflamatórios, estresse oxidativo e imunossupressão. Paralelamente, repetidas exposições à radiação UVA estão relacionadas ao dano celular mediado por processo oxidativo, a alterações no tecido conjuntivo dérmico e espessamento do estrato córneo. A inter-relação dos processos listados está envolvida no fotoenvelhecimento e em vários estágios do desenvolvimento de carcinomas. Como efeitos adversos da exposição à radiação UV estão as reações fotóxicas e fotoalérgicas, queimaduras solares e aumento da incidência e severidade de infecções (SAMBANDAR; RATNER, 2011; CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

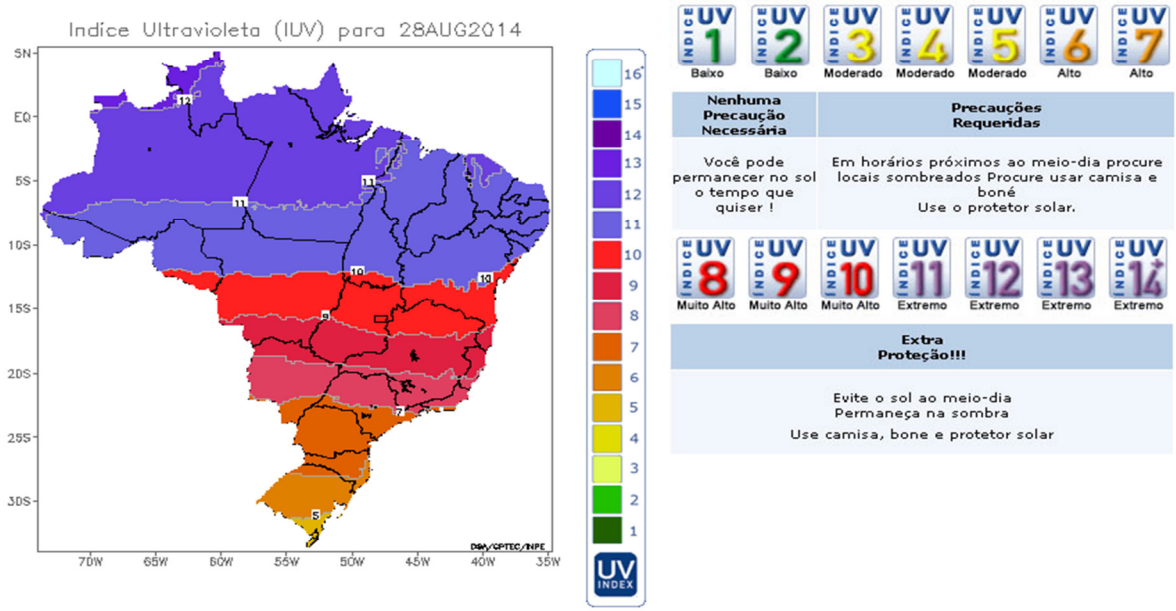
A partir de um panorama detalhado, a radiação UV ativa uma complexa cascata de reações bioquímicas na pele. A inflamação e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) são as causas principais do fotodano

cutâneo. Com o passar dos anos, sucessivas exposições a radição UV diminuem a eficiência do sistema antioxidante endógeno, o que culmina no dano direto ao DNA celular. As EROs causam dano oxidativo ao DNA, proteínas e lipídios da pele. Ambos espectros da radiação, UVA e UVB, contribuem para o oxidação de estruturas cutâneas, entretanto, a geração de radicais livres é uma das principais vias que caracterizam os efeitos deletérios da radiação UVA (NATARAJAN *et al.* 2014; HALLIDAY, 2005).

Uma vez que a radição UV incide sobre a pele, o aumento do fluxo sanguíneo e da infiltração de células do sistema imune, ocorre, caracterizando o processo inflamatório UV-induzido. O aumento da produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas desempenha papel principal nos eventos mencionados. A peroxidação lipídica induzida por UV, aumenta a produção de prostaglandinas (PGE2), que desencadeia a reação inflamatória na pele. A complexidade da cascata de eventos se estende, tendo em vista que a geração de EROs é intrínseca ao processo inflamatório. Atribui-se aos efeitos descritos uma das vias de indução da fotocarcinogênese (IKEHATA; ONO 2011; HALLIDAY, 2005).

Na última década, tem sido registrado aumento na incidência de câncer de pele, representando problema de saúde pública. Em 2015, o câncer de pele não melanoma (carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular) será o de maior incidência na população brasileira. Estima-se que 182 mil pessoas receberão esse diagnóstico, reforçando a magnitude do problema no país (INCA, 2014). Há uma relação direta entre a incidência de câncer não melanoma e a latitude, quanto mais próximo um indivíduo se encontra da linha do equador, mais intensos são os índices da radiação UV que ele está exposto. No que tange os aspectos relacionados ao melanona, a latitude aparenta não exercer influência significativa, ao contrário dos índices de exposição à radiação UVA (RIGEL, 2008). A **Figura 1** ilustra o índice UV do Brasil para o dia 28/08/2014, e indica as medidas preventivas, tendo em vista os valores registrados.

Figura 1. Índice UV do Brasil para o dia 28/08/2014 (CPTEC, 2014)



Em resposta a esta questão, autoridades internacionais de saúde recomendam à população se precaver contra os efeitos nocivos da radiação UV. Estas medidas incluem evitar exposição solar nos horários de maior incidência de radiação, utilizar vestimentas adequadas e fotoprotetores (GILBERT *et al*., 2012; MAIER *et al*., 2001; MORABITO *et al*., 2011). Como um órgão extremamente adaptado as intempéries que a vida na Terra proporciona, a pele, apresenta diversos mecanismos endógenos que a protegem dos impactos deletérios da radiação UV. Os pelos que cobrem o corpo, por exemplo, representam barreira física contra a radiação. Por conseguinte, o suor, que desemboca sobre o folículo piloso, absorve e reflete a radiação incidente. Como mecanismo intrínseco de defesa da pele pode-se citar, ainda, a melanina e o complexo sistema de enzimas antirradicalares e reparadoras de DNA. Contudo, faz-se necessário a utilização de proteção adicional, tendo vista as características individuais, como o fototipo de pele, duração de exposição a radiação e a posição geográfica (SAMBANDAN; RATNER 2011; CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012; SEITÉ *et al.,* 2010; JANSEN *et al*., 2013).

2.2 *FOTOPROTEÇÃO*

Os fotoprotetores possuem filtros solares em sua composição e representam uma alternativa viável para proteger a pele contra os danos UV. Os filtros solares distinguem-se em orgânicos (químicos) ou inorgânicos (físicos). Esses agem por mecanismos de ação distintos quando aplicados sobre a pele. Os filtros químicos são capazes de absorver os raios UV, enquanto os filtros físicos refletem a radiação incidente, bem como, absorvem parte da radiação que atinge à pele. Formulações fotoprotetoras, atualmente, apresentam combinação de diversos filtros UV orgânicos e inorgânicos, com intuito de proporcionar amplo espectro de proteção (GILBERT *et al*., 2012; MAIER *et al*., 2001; MORABITO *et al*., 2011).

Os filtros químicos são compostos essencialmente aromáticos conjugados com grupos carboxílicos e, geralmente, possuem um grupo doador de elétrons como, por exemplo, uma amina ou metoxila na posição *orto* ou *para* do anel aromático que absorvem a radiação em diferentes regiões espectrais (UVA ou UVB). Para uma ação fotoprotetora efetiva, tais compostos orgânicos, podem ser utilizados em combinação com demais filtros. Comumente são associados, pelo menos, dois tipos de filtros químicos. Contudo, em virtude da fotoinstabilidade, existem restrições limitando a escolha da combinação de filtros em fotoprotetores (GILBERT *et al*., 2012; BURNETT; WANG, 2011).

O fato de absorverem a radiação torna os filtros químicos suscetíveis à fotodegradação e geração de radicais livres, comprometendo a segurança e eficácia dos protetores solares. Soma-se a isso, o conhecido potencial de permeação cutânea atribuído a alguns filtros comercialmente utilizados, como a benzofenona-3 (*benzophenone-3*) e o *p*-metoxicinamato de octila (*ethylhexyl methoxycinnamate*). Justifica-se esse fenômeno pelo baixo peso molecular e pelo caráter lipofílico das substâncias. Janjua e colaboradores (2008) realizam um estudo com 32 voluntários (15 homens e 17 mulheres) que fizeram uso, durante quatro dias, de uma formulação contendo 10,0 % (p/p) de benzofenona-3 e *p*-metoxicinamato de octila. A formulação foi aplicada sobre a pele na razão de 2,0 mg/cm^2. Medidas no sangue e urina indicaram a presença

dos referidos filtros nos voluntários, cerca de 96h após aplicação tópica das formulações (GILBERT *et al*., 2012;JANJUA *et al*., 2008).

Victor e colaboradores (2010) publicaram um estudo sobre os principais compostos causadores da dermatite de contato fotoalérgica. Tal injúria é caracterizada pela reação alérgica à luz, mediada pelo contato de algumas substâncias químicas com a pele. A pesquisa avaliou 76 pacientes ao longo de 20 anos. Octildimetil PABA (*ethylhexyl dimethyl PABA*), *p*-metoxicinamato de octila, benzofenona-3 e 4-metilbenzilideno cânfora (*4-methylbenzylidene camphor*), fizeram parte da lista de substâncias testadas. Os resultados demonstraram que os filtros solares orgânicos foram os principais compostos responsáveis pela dermatite de contato fotoalérgica, representando cerca de 24% dos resultados positivos para doença. Tais substâncias, ao absorverem a radiação, tem sua estrutura clivada, originando intermediários reativos. Estes compostos reativos são capazes de promover reações fototóxicas e fotoalérgicas (GILBERT *et al*., 2012; BURNETT; WANG, 2011; KERR; FERGUSON, 2004; VICTOR *et al*., 2010).

Os filtros solares físicos, representados pelo dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO) apresentam potencial reduzido de irritação cutânea, sendo inclusive utilizados no desenvolvimento de preparações para crianças e indivíduos com pele sensível. Estima-se que na Austrália, 70% dos fotoprotetores contém TiO_2 e 30% ZnO (GILBERT *et al*., 2012).

Contudo, a utilização de filtros físicos, pode conferir aspecto esbranquiçado à pele, por conseguinte, nanopartículas desses óxidos foram desenvolvidas e incorporadas aos fotoprotetores. Tendo em vista que, as partículas nanométricas de TiO_2 ou ZnO minimizam o efeito esbranquiçado, estes filtros UV são não só mais eficientes, mas também, resultam em uma melhor aceitação do consumidor (WANG *et al*., 2010).

As nanopartículas são conhecidas por apresentar propriedades óticas, químicas, mecânicas e elétricas distintas em relação ao material de origem. É possível inferir que as partículas nanométricas podem, também, apresentar propriedades biológicas distintas. Existe uma correlação geral entre o tamanho de partícula e a toxicidade, quanto menor a partícula, maior é a sua razão superfície/volume, logo, mais provável é o efeito tóxico. A toxicidade é, em

parte, resultado do aumento da reatividade química ocasionada pelo aumento da razão superfície/volume (SINGH; NANDA, 2012).

A recente incorporação de nanopartículas de TiO_2 e ZnO em protetores solares tem suscitado questões sobre o potencial de penetração cutânea, a absorção sistêmica e toxicidade de tais compostos. A análise das evidências disponíveis, no entanto, não indica a toxicidade desses produtos após a aplicação cutânea na pele saudável e intacta (BANGALE *et al.*, 2012).

Apesar das questões em torno da segurança dos filtros solares disponíveis no mercado, seu uso deve ser mantido pelos consumidores. A possibilidade de rejeição ao uso do produto apresenta riscos maiores à saúde dos usuários, do que a utilização diária de fotoprotetores (BANGALE *et al.*, 2012; GILBERT *et al*., 2012; MORABITO *et al*., 2011).

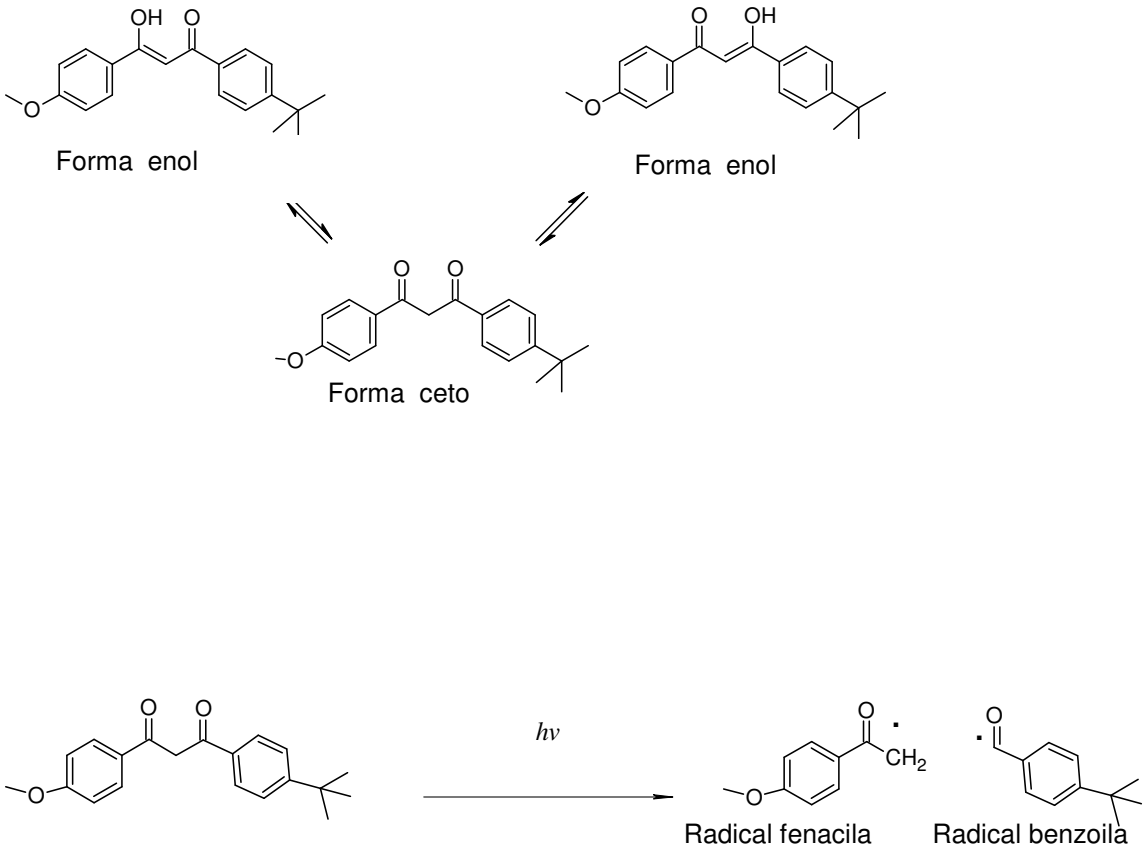
Uma das estratégias para o desenvolvimento de fotoprotetores seguros, nas condições normais e previsíveis de uso, está centrada na redução da concentração de filtros químicos. Tal tendência é ocasionada pelas possíveis reações alérgicas ou irritativas e pela possibilidade de permeação cutânea dos compostos ativos. Trabalhos científicos nessa área têm por objetivo desenvolver novas moléculas ou descobrir potenciais de uso para substâncias não utilizadas para este fim (SCHLUMPF *et al.,* 2004; MAIER; KORTING, 2005).

Dentre os diversos objetos de estudo, que compõe a temática contemporânea da fotoproteção, a fotoestabilidade apresenta grande relevância. Uma vez irradiado, um filtro solar UVA ou UVB ideal deve manter-se inalterado, contudo a maior parte dos compostos disponíveis sofrem fotodegradação. Tal perfil, não só compromete a eficácia fotoprotetora, mas também pode desencadear processos de sensibilização cutânea (KOCKLER *et al.,* 2012; LHIAUBET-VALLET *et al*., 2010).

A avobenzona (*butyl methoxydibenzoylmethane*) é o filtro solar mais representativo, no que tange os aspectos da fotoestabilização de protetores solares de amplo espectro de proteção (KOCKLER *et al,.* 2012; LHIAUBET-VALLET *et al*., 2010; BIN, 1994). Essa *β*-dicetona é um dos filtros UVA mais utilizados no mercado cosmético. Sua concentração máxima permitida em formulações fotoprotetoras, varia entre 3-5%, em função dos aspectos

legislativos vigentes (LAUTENSCHLAGER *et al*., 2007; BRASIL, 2006). A referida cetona aromática mantem-se em equilíbrio químico entre as formas ceto-enol, sendo esse afetado pela radiação ultravioleta, temperatura, solvente e concentração. A **Figura 2** ilustra a estrutura química da avobenzona, bem como seu equilíbrio tautomérico entre as formas ceto-enol e como esse equilíbrio pode ser afetado pela incidência da radiação solar (KOCKLER *et al,.* 2012).

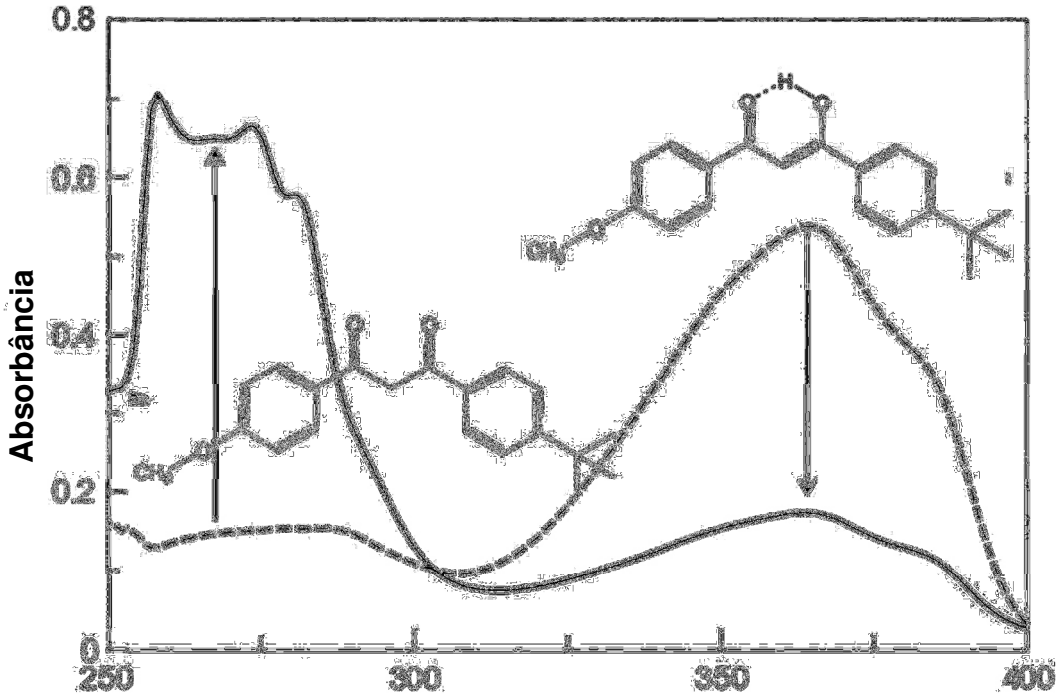
Figura 2. Estrutura química da avobenzona e sua possível fragmentação em radicais fenacila e benzoila após irradiação solar (KOCKLER *et al*,. 2012)



A avobenzona apresenta um espectro de absorção da radição compatível com a faixa do UVA (320-400 nm), com pico máximo de absorção em torno de 360 nm (DMSO). Contudo, após a irradiação, ocorre predominância da forma cetônica, que possui espectro de absorção da

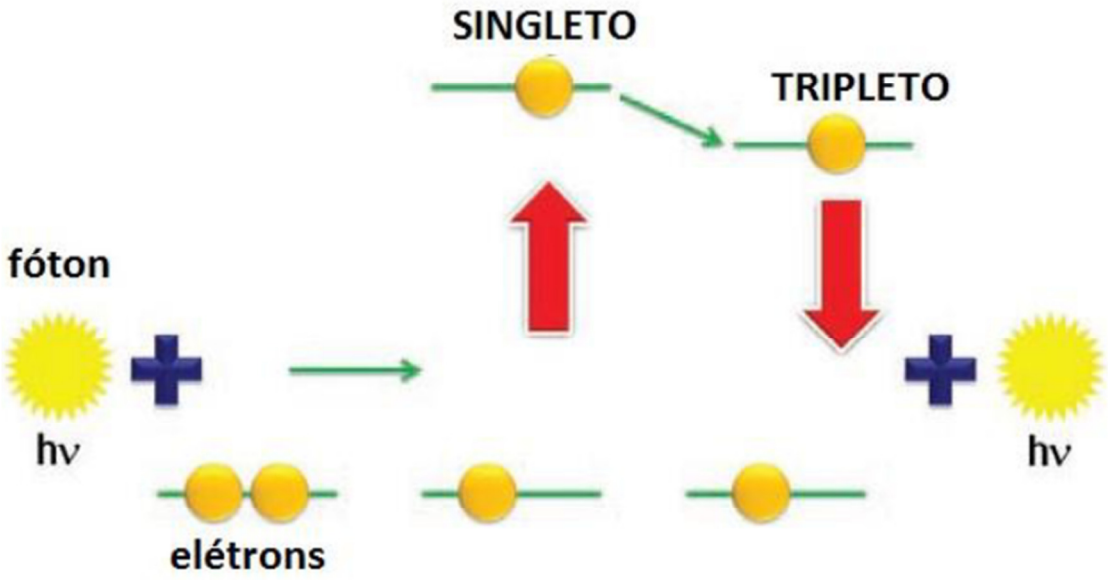
radiação compatível com o UVC. A **Figura 3** ilustra tal fenômeno, solvente-dependente (AFONSO *et al.,* 2014).

Figura 3. Espectro UV da avobenzona em solução (5µg/ml) em DMSO antes (linha pontilhada) e depois da irradiação (linha contínua)(AFONSO *et al*., 2014)



A fotoisomerização da avobenzona é descrita por diversos autores como um fenômeno dependente de oxigênio, que ocorre por meio da excitação ao estado tripleto de energia. A elucidação dos fênomenos que envolvem a excitação e o retorno ao estado fundamental de filtros orgânicos após a irradição é apresentada na **Figura 4** (PINTO, 2014; AFONSO *et al.,* 2014.; KOCKLER *et al,.* 2012; VALLEJO *et al*., 2011).

Figura 4. Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto (PINTO, 2014)



Onde: h = costante de planck (6,626x10-34 j s-1); *v*= frequência de radiação absorvida

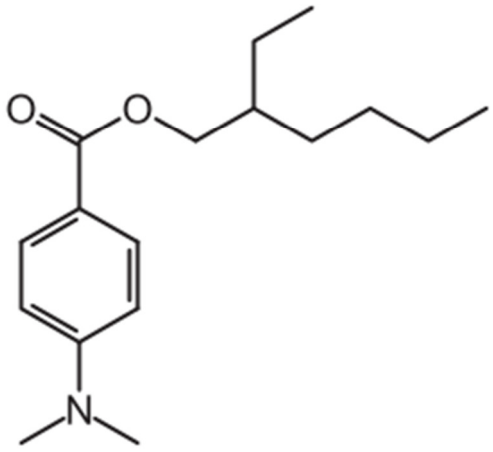
Quando a radiação incide sobre a molécula de um filtro orgânico, ela é promovida ao estado excitado singleto, em que o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original. A partir desse ponto, a molécula pode retornar ao estado fundamental, por meio da emissão de um fóton ou atingir um estado menos excitado de energia, denominado tripleto, em que a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida e o retorno ao estado fundamental ocorre em menor velocidade, **Figura 4** (PINTO, 2014; BONDA, 2008).

O ciclo encerra-se com o retorno ao estado fundamental, contudo, o mecanismo de dissipação de energia nem sempre é completado. Por conseguinte, a ineficiência do processo pode gerar modificações moleculares e inviabilizar a absorção de energia pelo composto orgânico. A cadeia de eventos acima, descreve o processo de fotodegradação da avobenzona. A formação de radicais livres provenientes da clivagem de sua estrutura influencia, não só sua capacidade de proteção UVA, como também, afetam o perfil UVB de demais filtros presentes em protetores solares de amplo espectro, tais como octil

dimetil PABA e *p*-metoxicinamato de octila (PINTO, 2014; BONDA, 2008; KOCKLER *et al,.* 2012; LHIAUBET-VALLET *et al*., 2010).

Octil dimetil PABA é um filtro orgânico que absorve o espectro da radiação UVB, com pico de absorção em torno de 311 nm. Sua concentração máxima permitida em formulações é 8,0% p/p, sendo um consenso entre as legislações internacionais. À temperatura ambiente, apresenta-se como um líquido apolar, solvente para demais filtros orgânicos sintéticos sólidos lipossolúveis. Pertencente a classe dos derivados do ácido *p*-aminobenzóico, sua utilização apresenta vantagens no que tange os aspectos de segurança, considerando-se as frequentes ocorrências de sensibilização cutânea ocasionadas pela molécula percursora (LAUTENSCHLAGER *et al*., 2007; BRASIL, 2006; MANCEBO; HU; WANG, 2014; SAMBANDAN; RATNER, 2011). A **Figura 5** apresenta a estrutura química do referido composto (KOCKLER *et al,.* 2012).

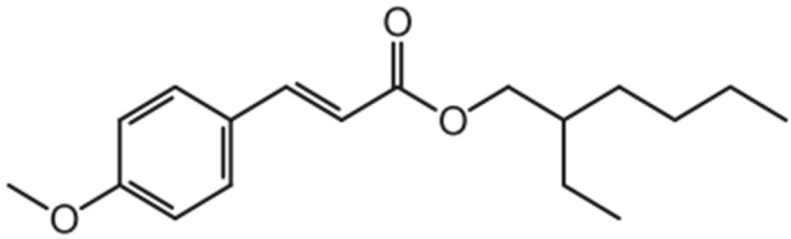
Figura 5. Estrutura química do octil dimetil PABA (KOCKLER *et al*,. 2012)



O *p*-metoxicinamato de octila é uma molécula orgânica amplamente utilizada em preparações tópicas fotoprotetoras, como um filtro UVB, com pico máximo de absorção em 308 nm (metanol). Em 1976, sua utilização foi aprovada pela agência regulatória europeia e após cerca de duas décadas, seu uso foi também permitido nos Estados Unidos. A concentração máxima permitida em protetores solares é 7,5 % p/p, segundo as diretrizes do FDA e

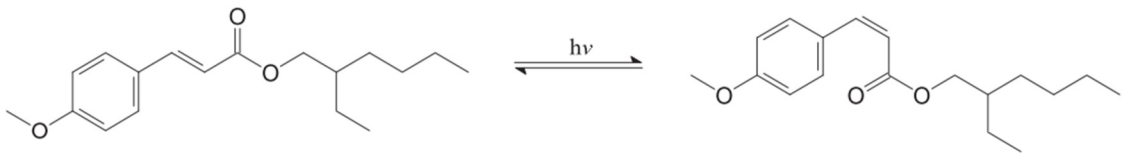
10,0% p/p, para os demais órgãos internacionais (LAUTENSCHLAGER *et al*., 2007; BRASIL, 2006; CARLOTTI *et al,.* 2005). **Figura 6** ilustra a estrutura molecular do referido composto (KOCKLER *et al,.* 2012).

Figura 6. Estrutura química do *p*-metoxicinamato de octila (KOCKLER *et al*,. 2012)



Contudo, sua estrutura pode sofrer transformações fotoquímicas, como a isomerização *trans-cis* da molécula (**Figura 7**). A forma *trans* possui uma absortividade molar superior a forma *cis*, fato que pode alterar seu perfil espectrofotométrico (KOCKLER *et al,.* 2012).

Figura 7. Isomerização trans-cis do p-metoxicinamato de octila (KOCKLER *et al*,. 2012)



trans- p-metoxicinamato de octila

cis- p-metoxicinamato de octila

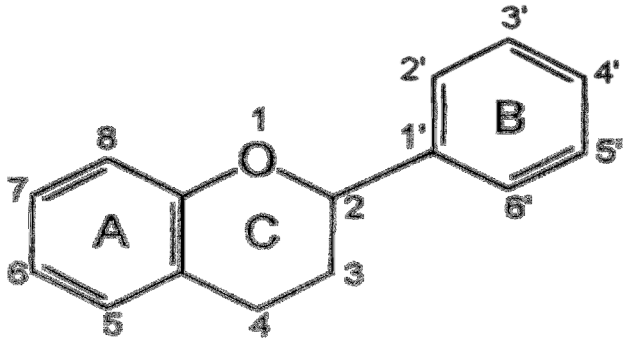
A associação do *p*-metoxicinamato de octila e da avobenzona é um modelo de fotoinstabilidade amplamente estudado. Além das transformações fotoquímicas que cada molécula apresenta, soma-se o fato dos produtos de degradação do filtro UVA, formarem subprodutos de cicloadição com o cinamato, reduzindo drasticamente o perfil amplo espectro da mistura. Por conseguinte, diversos autores tem associado supressores do estado tripleto e singleto da dicetona, como estratégia para fotoestabilização (LHIAUBET-VALLET *et al.,* 2010; CHATELAIN; GABARD, 2001; KOCKLER *et al,.* 2012).

Resgistrou-se na última década avanço na busca por moléculas fotoesbilizadoras multifuncionais. Antioxidantes, por exemplo, são capazes de sequestrar os radicais livres gerados, bem como, agem como supressores do estado excitado da avobenzona. O perfil fotoestabilizador de flavonoides naturais, com alto caráter antioxidante, tais como a quercetina e a rutina, foram descritos recentemente (PINTO, 2014; SCALIA; MEZZENA, 2010; AFONSO *et al,.* 2014).

2.3 *FLAVONOIDES*

Flavonoides são compostos polifenólicos bioativos e são formados por um núcleo comum fundamental benzopirano ou cromano unido a um anel aromático, caracterizado pelo esqueleto de carbono C_6-C_3-C_6, como ilustrado na **Figura 8**. As seguintes atividades biológicas foram relacionadas aos flavonoides: antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antiulcerosa, antineoplásica, anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, anti-hipertensiva, inibitória enzimática e antialergênica, dentre outras (GUARDIA *et al*., 2001; MUNIN; EDWARDS-LÉVY 2011).

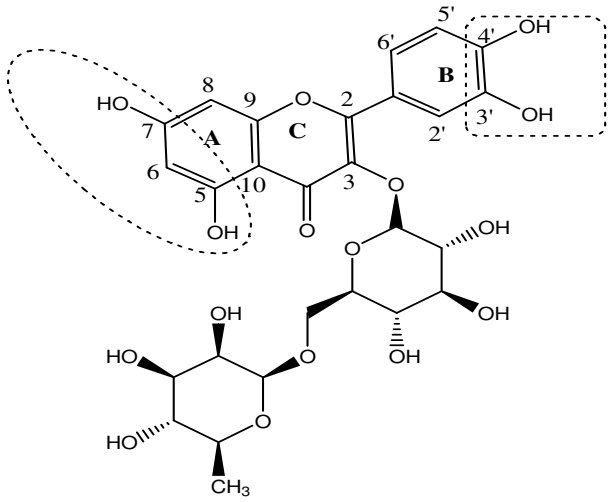
Figura 8. Representação esquemática do núcleo comum fundamental dos flavonoides (estrutura química geral) (PIETTA, 2000).



2.4 *RUTINA*

A rutina (3-*o*-rutinosídeo-quercetina) é um flavonoide da classe dos flavonóis, empregada como potente antioxidante, na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar. Primeiramente foi identificada na *Ruta graveolens* (1842) e posteriormente foi isolada da *Caparis spinosa,* como ácido rutínico. Tal denominação se deve ao fato da rutina apresentar solubilidade em soluções alcalinas. Em 1896, a fórmula molecular definitiva da rutina foi estabelecida ($C_{27}H_{30}O_{16}$), como ilustrado na **Figura 9**, com a descoberta da ligação dos açúcares glicose e ramnose na molécula da quercetina. No Brasil, a rutina é extraída da Fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth). Esta espécie é responsável por 50% da produção mundial de rutina (BABY, 2007; VELASCO *et al*. 2008b).

Figura 9. Estrutura química da rutina (PIETTA, 2000).

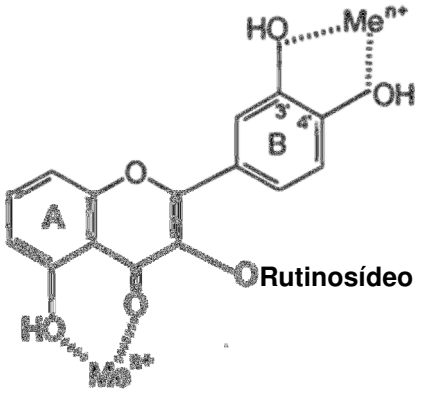


Onde: Os grupamentos hidroxila em destaque são responsáveis pelo sequestro de radicais livres(OLIVEIRA *et al*., 2015).

A grande maioria dos benefícios terapêuticos atribuídos a rutina reside em sua atividade antioxidante e quelante de metais. Tal flavonoide apresenta

em sua estrutura ligações e grupamentos que a habilitam para o sequestro de radicais livres, a saber: *(1)* os dois grupamentos hidroxilas em configuração *orto* no anel B, que conferem alta estabilidade ao radical formado; *(2)* dupla ligação C2-C3 em conjugação com o 4-oxo no anel C, responsável pela deslocalização eletrônica do anel B e *(3)* a presença de hidroxilas na posição 7 e 5 do anel A, requeridas para potencialização máxima da atividade antioxidante (PIETTA, 2000; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Todavia, sua atividade quelante de metais catalizadores de reações de oxidação tais como, Cu^{+} e Fe^{2+}, pode ser explicada majoritariamente pela presença do grupamento catecol no anel B, bem como pelos grupos 4-oxo e 5-OH presentes no anel C e A respectivamente, como indicado na **Figura 10** (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Figura 10. Sítios de ligação de metais (PIETTA, 2000).



Em relação aos grupamentos hidroxila ionizáveis da rutina, seus valores de pKa podem variar de acordo com a literatura, bem como a ordem de desprotonação dos grupamentos em função do valor de pH do meio. Segundo Howard e Wender (1952), a ordem de desprotonação e seus respectivos valores de pka seriam: 7-OH (7,4); 4'-OH (8,7); 3'-OH (12,6); 5-OH (14,0). Dessa forma, a atividade antioxidante e a solubilidade do referido composto variam em função da alcalinização ou acidificação do meio (HOWARD; WENDER, 1952; PEDRIALI *et al.*,2008; PIETTA, 2000).

Adicionalmente, a rutina apresenta limitada solubilidade em meios oleosos (log P ~ - 0,64) e em água (0,125 g/L). Soma-se ainda, sua alta massa

molecular (MM= 610.5175 g/mol), que limita sua capacidade de difusão e permeação em sistemas biológicos. Resultados obtidos pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, a partir de 2007, indicaram que a rutina, não apresentou tendência de penetração cutânea, além de possuir características químicas e funcionais que a torna potencial composto ativo para formulações fotoprotetoras. A capacidade de absorção da radiação UV da rutina está intimamente relacionada com sua estrutura. Flavonoides exibem duas bandas de absorção no espectro UV. A banda I, entre 320-385 nm, é atribuída ao perfil espectral do anel B e a banda II, de 250-285 nm, ao anel A. Demais estudos evidenciaram que o flavonoide apresentou efeito sinérgico, quando associado a filtros físicos e químicos , elevando tanto o FPS estimado, quanto à proteção UVA (BABY, 2007; VELASCO *et al*. 2008b; CHOQUENET *et al.*, 2008; VELASCO,*et al.*, 2008a; PEDRIALI *et al.*, 2008; ROTHWELL *et al.*, 2005).

A partir desse panorama, introduz-se o conceito de Fotoproteção Bioativa. Tal termo se relaciona com a utilização de filtros UV, associados a compostos isolados dos extratos vegetais ou aos extratos propriamente ditos. Apesar dos avanços alcançados recentemente, a baixa solubilidade dos compostos estudados, bem como seu reduzido perfil de permeação cutânea, limitam sua utilização em formulações fotoproteroas multifuncionais (BABY, 2007; VELASCO *et al*. 2008b; CHOQUENET *et al.*, 2008; VELASCO,*et al.*, 2008a; PEDRIALI *et al.*, 2008; PINTO, 2014; OLIVEIRA et al., 2012; VELASCO *et* al., 2012).

Tendo em vista essa pespepectiva, vários pesquisadores tem associado a rutina a plataformas nanotecnológicas com o intuito de aumentar sua incorporação em formulações, ou perfil de permeação cutânea (ALMEIDA *et al.*, 2010; DAS; KALITA, 2014; DHIMAN; SINGH, 2014) .

2.5 *NANOTECNOLOGIA*

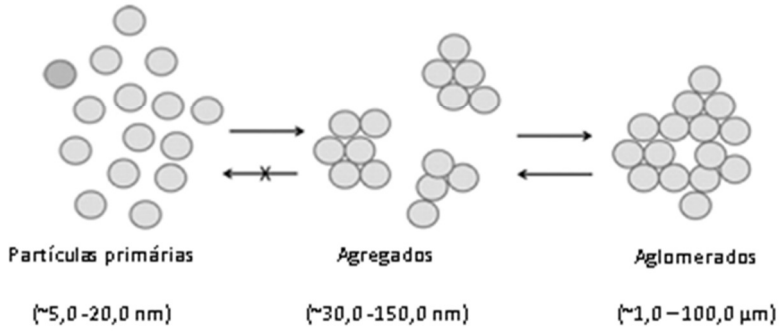
Nanotecnologia (NT) é um termo genérico para as técnicas, materiais, e dispositivos que operam em escala nanométrica. Foi definido como o *design*, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas, que mantém forma e tamanho na escala nanométrica. Representa uma das tecnologias mais promissoras do século XXI e tem sido considerada uma nova revolução industrial (NOHYNEK *et al.,* 2007; PAPAKOSTAS *et al.,* 2011).

2.6 *NANOPARTÍCULAS APLICADAS À FOTOPROTEÇÃO*

O termo partícula deriva do latim *particula,* que significa uma pequena parte. As partículas em escala nanométrica são descritas como nanopartículas (NP). Atualmente, não há definição mundialmente aceita sobre suas dimensões, embora a *British Standards Institution* (BSI) e o FDA, estabeleçam 100,0 nm, como limite superior, e 1,0 nm, como inferior. Entretanto, observam-se na literatura registros diversos de partículas com aplicações biológicas, de diâmetro entre 200,0-400,0 nm, denominadas nanopartículas (BRITISH STANDARDS INSTITUTION, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2010; ZWIOREK, 2006; NAHAR *et al.*, 2008).

Uma das aplicações de NP é a sua utilização em filtros solares no qual o diâmetro é normalmente superior a 10 nm. O TiO_2 e o ZnO existem em escala nanométrica em três diferentes estados: partículas primárias, agregados e aglomerados, como ilustrados na **Figura 11** (WANG; TOOLEY, 2011).

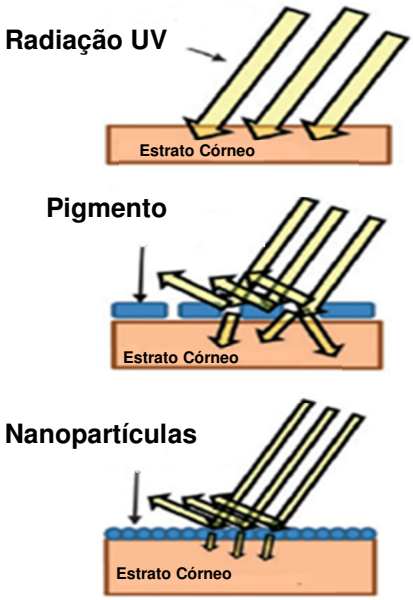
Figura 11. Formação de agregados e aglomerados, a partir de nanopartículas primárias de TiO_2 (WANG; TOOLEY, 2011).



A produção das NP se inicia com partículas primárias que, em consequência, da força de atração entre elas, se unem, formando os agregados. Os agregados podem formar, ainda, aglomerados, devido aos processos de secagem e aquecimento durante sua fabricação. Entretanto, os aglomerados não oferecem a atenuação UV desejada e devem ser redispersos novamente a agregados. No fim da década de 90, as nanopartículas de TiO_2 e ZnO foram incorporadas a fotoprotetores em escala comercial (NOHYNEK *et al.,* 2007; WANG; TOOLEY, 2011; BORM *et al*., 2006).

Pigmentos inorgânicos com elevado índice de refração, tal como TiO_2 e ZnO, refletem a luz UV. NP desses materiais são, geralmente, incorporadas a formulações fotoprotetoras, por possuírem perfil de eficácia superior ao dos pigmentos de maior tamanho no que se refere à absorção e dispersão da radiação UV, como ilustra a **Figura 12.** Partículas de TiO_2 com diâmetro médio de 100,0 nm oferecem proteção de amplo espectro mais efetiva e efeito esbranquiçado inferior (GILBERT *et al*., 2012; MORABITO *et al*., 2011 e NOHYNEK *et al*., 2007; WANG; TOOLEY , 2011; WANG *et al*., 2010).

Figura 12. Efeito dos filtros físicos (pigmentos de maior tamanho e nanopartículas) sobre a radiação UV quando aplicado na pele (MORABITO *et al.*, 2011).



Com o avanço das pesquisas na área da nanotecnologia, novos polímeros e nanoestruturas foram desenvolvidas e aplicadas a produtos cosméticos, em especial, formulações destinadas a proteção da radiação UV (MORABITO *et al*., 2011).

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são um promissor sistema carreador de filtros. Apresentam vantagem em comparação às emulsões convencionais, pois exibem perfil de liberação modificada dos referidos compostos, por conseguinte, o efeito fotoprotetor das formulações pode ser mais duradouro. Embora seu uso, exclusivamente, como filtro UV não seja reconhecido e nem comercialmente disponível, as NLS têm demonstrado efeito sinérgico quando combinado com filtros químicos, como a benzofenona-3 e o *p*-metoxicinamato de octila. Tal vantagem, baseada em sua capacidade de refletir e dispersar a radiação UV incidente, resulta na diminuição da concentração de filtros potencialmente alergênicos sem comprometer o FPS (CARLOTTI *et al*., 2005; WISSING; MÜLLER, 2002).

Semelhante às NLS, as nanopartículas poliméricas são um conhecido sistema de liberação modificada, amplamente utilizado para a encapsulação de fármacos e substâncias ativas. Perugini e colaboradores (2002) demonstraram que nanoencapsulação do *p*-metoxicinamato de octila em poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) gerou aumento da fotoestabilidade em relação a sua forma livre. Similarmente, Lee e colaboradores (2004) indicaram que a microencapsulação de avobenzona (*butyl methoxydibenzoyl methane*) em poli(metil metacrilato) (PMMA) aumentou sua fotoestabilidade. Ambos os sistemas foram promissoras opções para o desenvolvimento de sistemas fotoprotetores estáveis (PERUGINI *et al.,* 2002; LEE *et al*., 2004). Contudo, salienta-se que os ensaios de avaliação de eficácia fotoprotetora citados limitaram-se apenas a análises *in vitro.*

A nanoencapsulação de compostos ativos antioxidantes representa perspectiva futura para o desenvolvimento de ingredientes fotoprotetores inovadores. A incorporação de antioxidantes em protetores solares é uma abordagem vantajosa para combater os radicais livres, gerados pela exposição excessiva à radiação UV. Tais compostos são utilizados na indústria de produtos cosméticos para evitar a formação de novas linhas de expressão e reduzir o fotoenvelhecimento (MORABITO *et al*., 2011).

A utilização de fitossomas e etossomas para potencialização da permeação cutânea de rutina, tem sido descrita por diversos diversos autores (DAS; KALITA, 2014; DHIMAN; SINGH, 2014; PARK *et al*., 2014). Ademais, outros sistemas nanoctenológicos, tais como, nanocapsulas e nanoemulsões foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a estabilidade funcional e química do flavonoide. Almeida e colaboradores (2010) demonstraram a viabilidade de nanocápsulas poliméricas e das nanoemulsões, como sistemas intermediários ou finais, para desenvolvimento de medicamentos contendo rutina. As referidas preparações promoveram prolongamento de sua atividade antioxidante *in vitro* (ALMEIDA *et al*., 2010).

Pelo exposto, considera-se que, a potencialização da atividade fotoprotetora na associação de compostos ativos antioxidantes à filtros químicos deve ser pesquisados na escala nanométrica. Dessa forma, a busca de polímeros biocompatíveis, que agreguem benefícios multifuncionais, é de

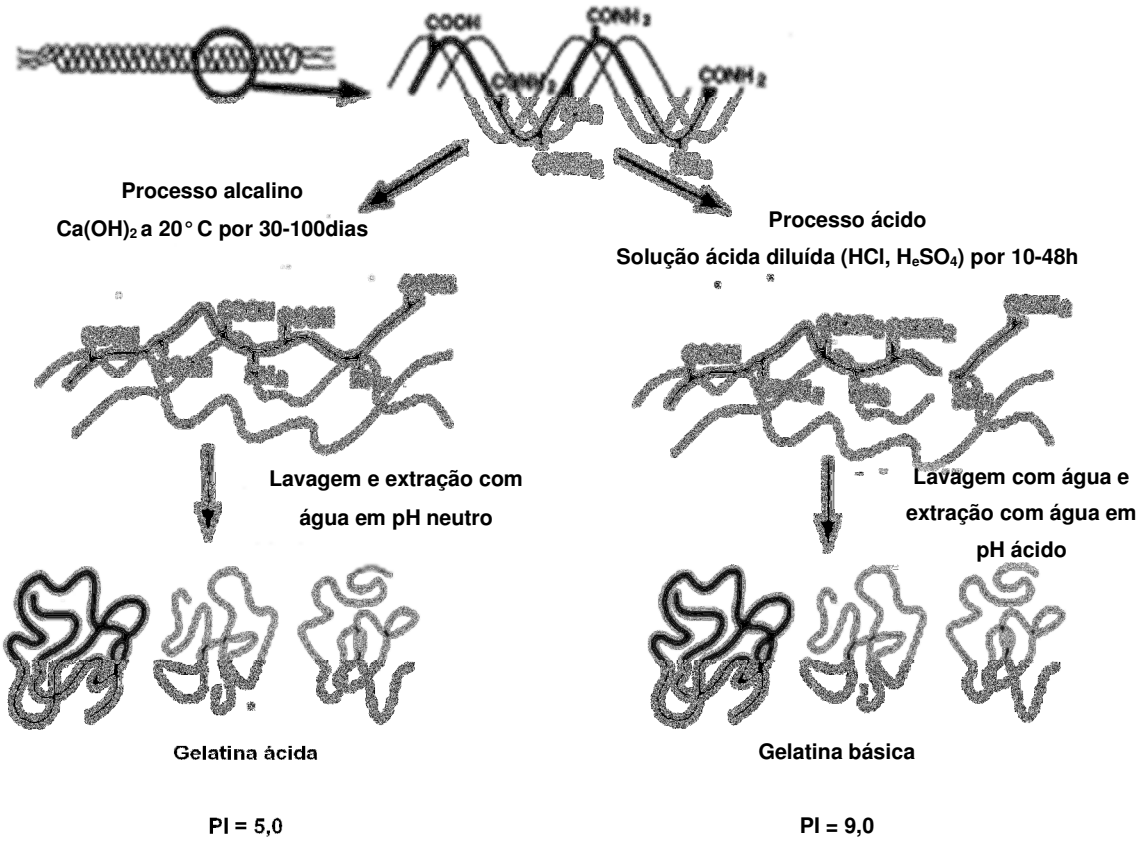
grande interesse para o desenvolvimento dos referidos sistemas nanoparticulados. Nesse sentido, o polímero utilizado para o desenvolvimento da nanopartícula exerce papel de destaque. Dentre os polímeros biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicos de escolha, destaca-se a gelatina (ZWIOREK, 2006).

2.7 *GELATINA*

A gelatina é uma proteína obtida por hidrólise do colágeno, considerada um subproduto da indústria de transformação de carnes, facilmente disponível, que tem sido amplamente utilizada na indústria alimentícia. É conhecida pelas suas propriedades biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicas. Sua longeva e segura utilização nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica garantiu seu reconhecimento como um material GRAS (*generally regarded as safe*) pelo FDA. Mundialmente por ano são produzidas cerca de 350,000 toneladas de gelatina, que movimentam um mercado de dois bilhões de dólares (ZWIOREK, 2006; ELZOGHBY, 2013; BORAN; REGENSTEIN, 2010).

Dois tipos diferentes de gelatina podem ser produzidas dependendo do método de extração utilizado. A gelatina tipo A é obtida a partir da pele de porco, por meio de um pré-tratamento ácido, antes do processo de extração. O tipo B é extraído, por meio da hidrólise básica, de ossos de origem bovina. Durante a extração, os grupamentos amida dos aminoácidos aspargina e glutamina são convertidos em grupamentos carboxila, originando resíduos de aspartato e glutamato. Por conseguinte, a natureza eletrostática do produto é afetada. O maior número de grupamentos carboxila por molécula reduz o ponto isoelétrico (PIE), da gelatina de tipo B, para 5,0. Em contraste, a gelatina tipo A e o colágeno apresentam PIE 9,0 (TABATA; IKADA, 1998; YOUNG *et al*. 2005; ZWIOREK, 2006). A **Figura 13** ilustra o processo de obtenção da gelatina bovina (tipo B) e suína (tipo A).

Figura 13. Processo de obtenção da gelatina ácida e básica (TABATA; IKADA, 1998).

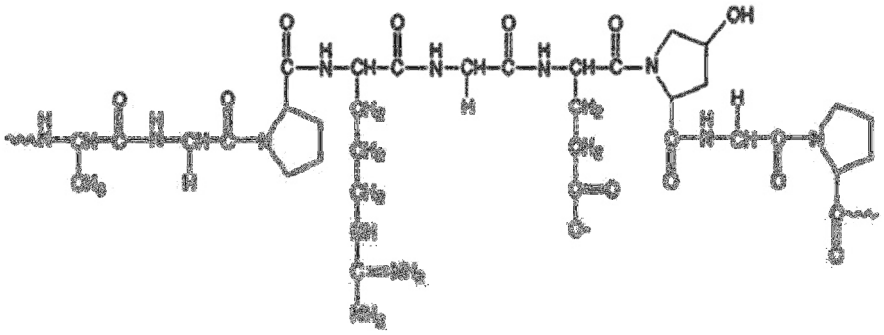


A composição dos aminoácidos do colágeno e, portanto, da gelatina é de cerca de 33% de glicina, 13% de prolina mais 4-hidroxiprolina e 12% de alanina. Os restantes 42% compreendem outros 16 aminoácidos (ZWIOREK, 2006). A composição dos aminoácidos da gelatina bovina é descrita na **Tabela 1**. A representação (Gli-X-Pro)n é responsável pela estrutura da tripla hélice da gelatina, onde X é substituído majoritariamente pelos aminoácidos lisina, arginina, metionina e valina. A **Figura 14** exemplifica a estrutura química básica da gelatina (ELZOGHBY, 2013).

Tabela 1. Composição quali/quantitativa (%) de amino ácidos da gelatina tipo B (ZWIOREK, 2006).

Gelatina Tipo B	
Aminoácidos	**Composição (%)**
Alanina	11,7
Arginina	4,8
Asparagina	0
Ácido Aspartico	4,6
Glutamine	0
Ácido Glutamico	7,2
Glicina	33,5
Histidina	0,4
Hidroxilisina	9,3
Hidroxiproline	0,4
Isoleucina	1,1
Leucina	2,4
Lisina	2,8
Metionina	0,4
Fenilalanina	1,4
Prolina	12,5
Serina	3,4
Treonina	1,8
Tirosina	0,1
Valina	2,2

Figura 14. Estrutura química básica da gelatina (ELZOGHBY, 2013).



Há de destacar-se, ainda, uma fonte alternativa para a obtenção de gelatina, a pele de peixe. Tal gelatina apresenta ponto de fusão inferior a proteína obtida dos mamíferos, fato que pode representar vantagem farmacotécnica no que tange os aspectos sensoriais. Todavia, sua utilização é muito limitada, uma vez que a produção mundial de gelatina de peixe corresponde a cerca de 1% do mercado (BORAN; REGENSTEIN, 2010).

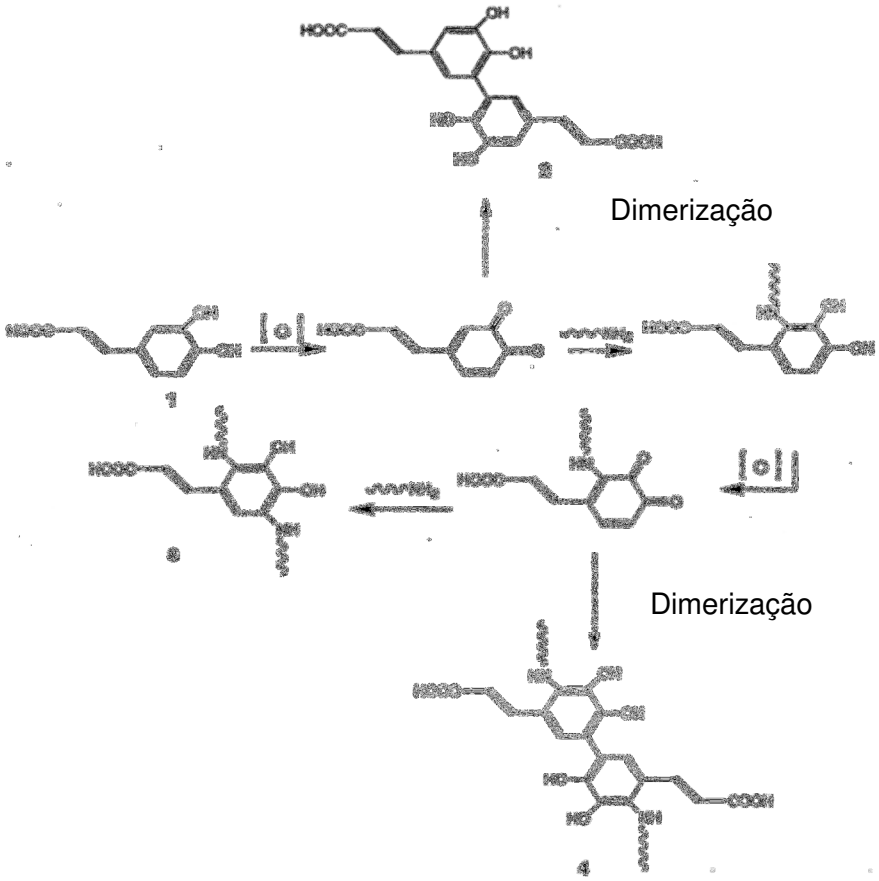
A gelatina apresenta várias vantagens como biomaterial: é um polímero natural que não apresenta antigenicidade, é completamente reabsorvível *in vivo* e, devido à presença de grande número de grupos funcionais na cadeia lateral, pode ser facilmente modificada para formar materiais quimicamente reticulados (CURCIO *et al*., 2010).

O glutaraldeído foi o agente de reticulação selecionado para desenvolvimento do presente trabalho, pois é altamente reativo e eficaz. Técnicas envolvendo o glutaraldeído foram utilizadas para desenvolver microesferas de gelatina utilizadas em sistema de liberação modificada de fármacos. Tais sistemas foram empregados como microcarreadores para crescimento e propagação de fibroblastos, sem efeito adverso sobre o crescimento ou morfologia das células. Estudos demonstraram que o glutaraldeído reticulado à microsferas de caseína implantado por via intramuscular em ratos foram bem tolerados pelo tecido vivo, sem reações adversas observadas histologicamente durante o período de seis meses. Contudo, alguns autores reportaram a diminuição da biocompatibidade de filmes de gelatina reticulados com glutaraldeído (JAYAKRISHNAN; JAMEELA ,1996; ELZOGHBY, 2013).

Por conseguinte, fontes alternativas e seguras de agentes reticulantes tem sido pesquisadas, entre elas, os polifenois. Diversos autores apresentaram indícios de que, sob condições oxidativas, reações de reticulação podem ocorrer entre compostos fenólicos e os grupamentos amino da gelatina, como indicado na **Figura 15**. As ligações covalentes C-N, entre polifenois e matriz proteica alteram propriedades térmicas e mecânicas do material. Tais alterações tornam-se imprescindíveis para a utilização biológica do material, uma vez que sistemas de liberação modificada com aplicações diversas podem

ser desenvolvidos (STRAUSS; GIBSON, 2004; ZHANG *et al*., 2010a; ZHANG *et al*., 2010b).

Figura 15. Reações químicas entre polifenois e grupamentos amino de cadeias polipepitídicas



Nanopartículas desenvolvidas a partir de polímeros biodegradáveis, como proteínas, têm sido utilizadas para o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos e genes, bem como, carreadores de fármaco a sítios-alvo específicos do organismo, como o pulmão. Não há registro na literatura de sua utilização em veículos de aplicação tópica, com aplicação cosmética (ZWIOREK, 2006; NAHAR *et al*., 2008; ELZOGHBY, 2013).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Este projeto de pesquisa envolveu, como objetivo geral, o desenvolvimento e a aplicação de partículas de gelatina, contendo ou não rutina, em preparações dermocosméticas fotoprotetoras.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos estão descritos a seguir:

- Obtenção das partículas de gelatina.
- Caracterização física, físico-química e térmica das partículas.
- Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos sistemas.
- Avaliação da penetração/permeação cutânea *in vitro* da rutina presente nas nanopartículas.
- Identificação *in vitro* das propriedades funcionais (atividade antioxidante e eficácia fotoprotetora estimada) das nanoestruturas.
- Desenvolvimento e análise (física, físico-química e funcional *in vitro*) das formulações dermocosméticas fotoprotetoras para incorporação das nanopartículas de gelatina (NPGs).
- Avaliação da segurança *in vivo* das preparações de melhor desempenho, por meio dos ensaios clínicos de irritação cutânea primária e acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação cutânea e fotossensibilização dérmica.
- Determinação da eficácia clínica das formulações dermocosméticas fotoprotetoras de melhor desempenho por meio da obtenção do fator de proteção solar (FPS) estático.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os equipamentos (aparatos e dispositivos, entre outros) empregados na presente pesquisa estão descritos a seguir:

i. Agitador mecânico RW 20n (IKA®).
ii. Balanças semianalíticas BG 4000 (Gehaka®) e ARD 110 (OHAUS®).
iii. Balança analítica AUY220 (Shimadzu®).
iv. Banho ultrassônico Ultrasonic Cleaner (Unique®).
v. Banho termostatizado N480 (Nova Ética®).
vi. Bomba de vácuo (FISHER®).
vii. Calorímetro de varredura DSC 7020 (Exstar, SII Nano Technology Inc)
viii. Câmara de fotoestabilidade CPS+ (Atlas Suntest®).
ix. Células de difusão vertical área 0,95 cm^2, volume de 4,0 mL.
x. Centrífuga RX2 (Hitachi®).
xi. Coluna de fase reversa C-8, CLC-C8(M), com 4,6mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5µm (Shimadzu®).
xii. Cromatógrafo líquido de alta eficiência, detector espectrofotométrico de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, equipado com programa LC solution (Shimadzu®).
xiii. Espectrômetro de autocorrelação *laser* Zetasizer Nanoseries ZEN 3600 (Malvern Instruments®) equipado com o programa Malvern Zetasizer e com cubeta descartável de poliestireno e cubeta de quartzo, com caminho ótico de 1,0 cm.
xiv. Espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere® UV2000S *Ultraviolet Transmittance Analyzer*) equipado com o programa UV-2000S.
xv. Espectrofotômetro UV-VIS Evolution® 600 (Thermo Scientific®) com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm.

xvi. Espectrofotômetro (leitor de placas) Multiskan FC (Thermo Scientific®).
xvii. Fitas adesivas Scotch Magic TM Tape (3M®).
xviii. Laser Doppler PeriFlux System 5000 (PERIMED®).
xix. Membrana filtrante com abertura 0,45 µm (Milipore ®).
xx. Microcentrífuga refrigerada de alta velocidade CF16RX II (Hitachi®).
xxi. Microscópio confocal invertido de fluorescência TCS SP5 (Leica®).
xxii. Microscópio eletrônico de varredura Quanta 600 FEG (FEI®)
xxiii. Micropipeta monocanal 20,0-200,0µL (DIGIPET®).
xxiv. Micropipetas monocanal 10,0-100,0 µL e 100,0-1.000,0 µL (Eppendorf®).
xxv. Peagômetro Q400AS (Quimis®).
xxvi. Placas de polimetilmetacrilato (PMMA) HD 6 (HelioScreen® Helioplate).
xxvii. Refrigerador Frost Free 60 (Consul®).
xxviii. Simulador solar UVA Mini (ProLumina®).
xxix. Simulador solar UVB Solar Light Co. Inc. (Multiport® 601).
xxx. Sistema purificador de água Simplicity UV (Merck Millipore® Mili-Q®).
xxxi. Placas aquecedoras em cerâmica com Agitação HS10 e HS7 (IKA®).
xxxii. Placa de agitação submersível Multipoint 15 (Thermo Scientific®).
xxxiii. Seringa hipodérmica de 1,0 mL (SR®).
xxxiv. Rotaevaporador RV10 digital, com banho de aquecimento (IKA®).
xxxv. Termobalança TG/DTA 7200 (Exstar, SII Nano Technology Inc.).
xxxvi. Unidade de ultrafiltração e centrifugação Ultrafree-MC 10000 (Millipore®).
xxxvii. Vortex Genius 3 (IKA®).

Os reagentes e solventes apresentaram grau de pureza cromatográfico, ou outro, especificado, como segue:

i. Acetonitrila grau cromatogáfico (Merck®).
ii. Ácido fórmico PA (LabSynth®).
iii. Ácido clorídrico PA (LabSynth®).
iv. Álcool etílico absoluto 99,5% PA (LabSynth®).
v. 2,2-Difenil-1-picrilidrazila (Sigma - Aldrich®).
vi. Água purificada

vii. Acetona PA (LabSynth®).
viii. Nicotinato de etila (Sigma - Aldrich®).
ix. Hidróxido de sódio PA (Henrifarma®).
x. Metanol grau cromatogáfico (Merck®).

A substância química de referência utilizada na validação analítica apresenta descrição a seguir:

i. Rutina trihidratada padrão de referência primário, de pureza 97,1%, sem purificação prévia (Sigma - Aldrich®).

As matérias-primas empregadas no desenvolvimento das nanopartículas apresentaram grau de pureza farmacêutico e, especificamente, estão mencionadas as de grau de pureza analítico (PA) ou grau alimentício.

i. Gelatina alimentícia tipo B (Gelita®):
   - Bloom: 180
   - Granulometria: 30 mesh (CERTIFICADO DE ANÁLISE, s.d.)
ii. Glutaraldeído solução aquosa 25,0% grau I (Sigma - Aldrich®).
iii. Rutina PA (FAGRON®):
   - Lote: 300400849#5
   - Prazo de validade: Outubro de 2013
   - Aspecto: pó fino amarelo esverdeado a castanho inodoro
   - Perda por dessecação: 7,70%
   - Teor: 95,6%
   - Teor de quercetina: 0,37%
   - Teor de pigmentos vermelhos: 0,0007%
   - Teor de clorofila: 0,00035% (CERTIFICADO DE ANÁLISE, s.d.)

As matérias-primas empregadas no desenvolvimento das formulações cosméticas, estão descritas na **Tabela 2**, e apresentaram grau de pureza cosmético ou farmacêutico.

Tabela 2. Matérias-primas utilizadas no desenvolvimento das formulações cosméticas

Nomenclatura INCI	**Matéria-prima *(nome comercial ou químico)***	**Fornecedor**
Butyl methoxydibenzoylmethane	**Avobenzona**	Fagron®
Cyclomethicone	**Ciclopentassiloxano**	PharmaSpecial®
Butilenoglicol cocoate	**Cocoato de butilenoglicol**	Brasquim®
BHT	**BHT**	PharmaSpecial®
Disodium EDTA	**EDTA dissódico**	PharmaSpecial®
Ethylhexyl methoxycinnamate	**p-metoxicinamato de octila**	Fagron®
Ethylhexyl dimethyl PABA	**Octil dimetil PABA**	Fagron®
Cyclomethicone (and) dimethicone crosspolymer	**Crospolímero de dimeticona**	Fagron®
Glycerin	**Glicerina**	Fagron®
Isopropyl miristate	**Miristato de isopropila**	PharmaSpecial®
Acrylates / C_{10-30} Alkyl Acrylate Crosspolymer	**Pemulen® TR1**	Fagron®
Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) ethylparaben (and) propylparaben (and) butylparaben	**Phenonip®**	PharmaSpecial®
Hydroxyethyl acrylate / sodium acryloyldimethyl taurate copolymer (and) isohexadecane (and) polysorbate 60	**Simulgel® INS 100**	Seppic®

Legenda: Nomenclatura conforme INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients).*

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das partículas de gelatina contendo rutina

As partículas de gelatina foram obtidas por meio da técnica de dessolvatação em dois passos, com modificações, segundo Nahar e colaboradores (2008). Alíquota de 2,0 g de gelatina bovina (180 Bloom/ 30 mesh) foi dissolvida em 26,0 mL de água Mili-Q sob agitação magnética de 500,0 rpm e aquecimento constante (40,0 ± 1,0 °C). Acetona (aproximadamente 29,0 mL) foi adicionada à solução de gelatina, como agente de dessolvatação, para precipitar a fração de alto peso molecular. O sobrenadante foi descartado e a gelatina de alto peso molecular foi redissolvida por adição de 26,0 mL de água Mili-Q, agitação e aquecimento constantes, anteriormente descritos. Posteriormente, o valor de pH da solução de gelatina foi ajustado (11,0) com solução de 0,1 M de NaOH.

Com o intuito de favorecer a incorporação do flavonoide (130,0 mg) no sistema, a rutina foi triturada para redução do tamanho de partícula com auxílio de almofariz e pistilo de vidro e, em seguida o flavonoide foi disperso em água (10,0 mL). A dispersão aquosa do flavonoide foi adicionada ao sistema seguido da adição de acetona. Ao final do processo, o glutaraldeído (200,0 µL) foi empregado como agente de reticulação. O sistema foi mantindo sob agitação de 500,0 rpm e aquecimento (40,0 ± 1,0 °C) por quatro horas. Por fim, removeu-se a acetona residual com uso do evaporador rotativo, até obter volume final de 20,0 mL. Foram desenvolvidas duas preparações em pH alcalino, a partícula branca (**B-NC**), sem rutina em sua composição, e a partícula **R-NC**, com concentração teórica de rutina igual a 6,5 mg/mL. Por fim, o valor de pH das amostras foi ajustado, com a solução 0,1 M de HCl, com o intuito de obter nanopartículas com valor de pH biocompatível com o da pele (NAHAR *et al.*; 2008) Todas as preparações foram desenvolvidas em triplicata e, posteriormente, submetidas para as análises de caracterização subsequentes.

Com intuito de analisar a estabilidade de **R-NC** em geladeira a determinação do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersividade e

potencial zeta foi realizada durante 90 dias. As análises foram conduzidas em triplicata e as leituras foram realizadas no T0 (24 após o prepararo), T30, T60 e T90 (BRASIL, 2004).

4.2.2 Determinação do valor de pH

O valor do pH foi determinado em peagômetro pela imersão direta do eletrodo na dispersão à temperatura ambiente (24,0 ± 2,0°C). As análises foram conduzidas em triplicata (SIQUEIRA, 2008).

4.2.3 Determinação do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersividade e potencial zeta

O diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das partículas foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (Zetasizer Nanoseries ZEN 3600®). Para análise, alíquota de 200,0 µL da dispersão das partículas foi diluída em 1,0 mL de água Mili-Q e, em seguida, registrou-se leitura dos referidos parâmetros. A análise de diâmetro foi realizada utilizando-se cubeta de poliestireno de 1,0 cm de caminho ótico. O potencial zeta foi determinado em célula capilar descartável. Devido à concentração reduzida das amostras, as nanopartículas não influenciaram na viscosidade da dispersão, de modo a que a viscosidade foi definida como a da água (0,8872 cP a 25°C). As análises foram conduzidas em triplicata (SIQUEIRA, 2008).

4.2.4 Microscopia confocal de fluorescência dos sistemas nanoparticulados

As imagens foram obtidas com o microscópio confocal invertido de fluorescência Leica TCS SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany). As imagens foram obtidas no Instituto Superior Técnico, Centro de Química-Física Molecular, *Institute of Nanoscience and Nanotechnology,* em Lisboa.

As amostras foram diluídas em água (1:100) e posicionadas em lâminas. A fluorescência das amostras foi excitada com um fóton a 458,0 nm e a emissão foi recolhida entre 475,0-700,0 nm. A intensidade do *laser* utilizada foi de 80% para as nanopartículas brancas (**B-NC**) e 30% para as nanoparticulas de gelatina contendo rutina (**R-NC**). Foi utilizada objetiva de imersão de 63x com amplitude numérica de 1,2, o que lhe conferiu de resolução de 366,0 nm (R=0,61*720/1,2). As imagens foram obtidas com taxa de varredura de 400 Hz por quadro.

4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura dos sistemas nanoparticulados (MEV)

A morfologia das nanopartículas de gelatina, sem adição do flavonoide (**B-NC**) e com rutina (**R-NC**), foi avaliada por meio de microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 600 FEG®). As amostras foram tratadas com platina para a obtenção de uma película superficial fina. Fotomicrografias foram obtidas em alto vácuo, com detector de elétrons secundários ETD, aceleração de 10 kV, WD de 10,0-10,4 mm e aumento de 30.000 vezes (NAHAR *et al*., 2008).

4.2.6 Caracterização Térmica

Para a obtenção das curvas de TG/DTG aproximadamente, 5,0 mg das amostras foram acondicionadas em cadinho de platina. O ensaio foi realizado utilizando-se razão de aquecimento de 10ºC/min, atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL/min e intervalo de temperatura de 25 a 600°C.

Para a caracterização por DSC aproximadamente, 2,0 mg das amostras foram pesadas em recipientes selados de alumínio e submetidos à razão de aquecimento de 20 ºC/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100,0 mL/min com variação de temperatura de 25 a 220°C, após tratamento térmico. O tratamento térmico consistiu em aquecimento de 20°C/min até 150°C, seguido de resfriamento até a temperatura ambiente. A célula do DSC

foi previamente calibrada com índio metálico (ponto de fusão: 156,60°C; ΔHfus = 28,62 J/g) e zinco (ponto de fusão: 419,53°C; ΔHfus = 108,09 J/g). As amostras submetidas à análise térmica foram: gelatina pura tipo B (G), rutina (R), mistura física (MF) de rutina e gelatina pura tipo B (na mesma proporção das nanopartículas **R-NC**), nanopartícula branca (**B-NC**) e nanopartícula de rutina (**R-NC**)(BASU *et al*. 2011; PEÑA *et al*., 2010).

4.2.7 Validação de método analítico para determinação da taxa/eficiência de associação do flavonoide nas nanoestruturas

4.2.7.1 Linearidade

A linearidade é o parâmetro utilizado para demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, no intervalo estudado. Uma vez constatada a relação linear, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos adequados (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005).

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Shimadzu® Prominence, composto por detector espectrofotométrico de arranjo de diodos modelo SPD-M20A e forno de colunas modelo CTO-20A foi utilizado para a quantificação (µg/mL) do flavonoide associado à nanopartícula. Os dados obtidos foram analisados pelo programa LC-Solution Multi-PDA. A fase móvel empregada foi constituída por solução aquosa de ácido fórmico 0,3%: acetonitrila (80:20, v/v) e vazão de 1,2 mL/min. Utilizou-se coluna de fase reversa C-18 (4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5,0 µm- modelo Shim-pack CLC-C8(M) - Shimatzu®). A detecção foi obtida em 350,0 nm, à temperatura de 40,0 ± 1,0°C (DUBBER; KANFER, 2004).

Foram preparadas soluções do flavonoide rutina, trihidratada padrão de referência primário, de pureza 97,1%, sem purificação prévia. Solução estoque de rutina (1.000,0 µg/mL) foi preparada pela solubilização de 10,0 mg do flavonoide em 10,0 mL de metanol. Para a obtenção da curva analítica, soluções metanólicas de concentrações distintas (5,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µg/mL) foram obtidas a partir da solução estoque. As amostras foram filtradas

em membrana de 0,45 µm (Milipore®) e, em seguida, injetadas (10,0 µL) no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), em triplicata. A curva analítica do flavonoide foi construída a partir dos valores da concentração em função da área do pico. O cálculo da equação da reta da curva analítica foi realizada por meio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003; BABY, 2007; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005; SHABIR, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

4.2.7.2 Limite de detecção

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

O limite de detecção foi calculado segundo a **Equação 1** (SHABIR, 2003), descrita a seguir:

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

Equação 1. Limite de detecção

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

4.2.7.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração da substância analisada que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Os valores limites de precisão e exatidão adequados apresentam-se referendados pela literatura (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

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

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

Equação 2. Limite de quantificação

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

4.2.7.4 Especificidade e pesquisa de interferentes

Ribani e colaboradores (2004), descreveram a especificidade de um método instrumental como a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa.

A especificidade foi obtida pela comparação dos cromatogramas da solução de concentração de 20,0 µg/mL do flavonoide rutina, padrão de referência primário (T = 97,1%), e da amostra comercial do composto (T = 95,0%). As soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Milipore®) e injetadas (10,0 µL) no cromatógrafo, em réplicas de três (BABY, 2007).

Com intuito de pesquisar possíveis interferentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz proteica, foram utilizadas amostras das nanopartículas de gelatina sem adição do flavonoide. As amostras foram centrifugadas (Hitachi® CS-120GXII - 21.400 G) e filtradas (Ultrafree - MC Milipore® 10000). Alíquotas do sobrenadante (200,0 µL) foram diluídas em um balão volumétrico de 10,0 mL, acrescido de metanol, filtradas em membrana de 0,45 µm (Milipore®) e injetadas (10,0 µL) no cromatógrafo, em réplicas de três. Os cromatogramas foram analisados visualmente (ALMEIDA, 2010; BABY, 2007).

4.2.7.5 Precisão

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas. Foram considerados dois níveis da precisão:

repetibilidade (precisão intracorrida), a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação; e precisão intermediária (precisão intercorridas), que representa a concordância entre os resultados obtidos em dias distintos de análise (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013)

A determinação da precisão intracorrida e intercorridas foi realizada pelo preparo de soluções de rutina, padrão de referência primário, em três concentrações distintas (25,0; 50,0 e 75,0 µg/mL). As amostras foram previamente filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas (10,0 µL) no cromatógrafo, em réplicas de três, no mesmo dia e em dias diferentes. A precisão foi calculada como desvio padrão relativo (DPR, %) (BRASIL, 2003; BABY, 2007; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005).

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

Equação 3. Precisão, calculada como desvio padrão relativo (DPR, %)
Legenda. DP é desvio padrão e C é a média das concentrações

4.2.7.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor considerado verdadeiro. A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação, que consiste em adicionar o padrão da substância à matriz isenta da substância (BRASIL, 2003).

Alíquotas de 3,0 mL de concentrações conhecidas (25,0; 50,0 e 75,0 µg/mL) de solução metanólica de rutina, padrão de referência primário, foram adicionadas a 1,0 mL de partículas de gelatina sem adição de rutina, previamente destruídas por degradação enzimática, descrita a seguir: uma alíquota de 500,0 µL de nanopartículas foi adicionada a 5,5 mL de solução aquosa de tripisina (0,4 mg/mL). A mistura foi mantida sob agitação magnética de 500 rpm e aquecimento constante (35,0 ± 1,0℃) durante 24 horas, até obtenção de solução límpida. Alíquotas das soluções foram filtradas em

membrana de 0,45 µm (Milipore®) e injetadas (10,0 µL) no cromatógrafo. A exatidão (%) foi realizada em réplicas de três, envolvendo ensaios intra e interdias (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

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

Equação 4. Exatidão (%)

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

4.2.8 Determinação da concentração total do flavonoide

A determinação da concentração total do flavonoide foi obtida pela degradação enzimática das nanopartículas de gelatina contendo rutina. Uma alíquota de 500,0 µL de nanopartículas foi adicionada a 5,5 mL de solução aquosa de tripisina (0,4 mg/mL). A mistura foi mantida sob agitação magnética de 500 rpm e aquecimento constante (35,0 ± 1,0℃) durante 24 horas, até obtenção de solução límpida, a qual indicou completa degradação das nanopartículas e liberação da rutina associada à matriz proteica. Em seguida, uma alíquota de 2,3 mL da solução foi transferida para balão volumétrico de 25,0 mL e completou-se o volume com metanol. A solução foi posteriormente filtrada (0,45 µm Milipore®) e injetada (10,0 µL) no cromatógrafo, em triplicata. O método analítico para a quantificação do flavonoide utilizado está descrito no item **4.2.7.1** (OFOKANSI *et al.*, 2010; NAHAR *et al.*, 2008; LEO *et al*. 1997).

4.2.9 Taxa/eficiência de associação do flavonoide nas nanopartículas

A quantidade do flavonoide associado (µg/mL) à nanopartícula foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como descrito no item **4.2.7.1**. O método analítico para a quantificação do flavonoide foi validado quanto aos parâmetros: linearidade, limites de detecção e

quantificação, especificidade e pesquisa de interferentes, precisão (intra e interdias) e exatidão (inter e intradias), anteriormente descritos (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005).

A determinação da taxa/eficiência de associação do flavonoide no sistema nanoestruturado foi realizada pelo método supracitado, anteriormente validado. A concentração de rutina livre foi obtida no filtrado após separação por ultracentrifugação (Hitachi® CS-120GXII - 21.400 G) e filtração (Ultrafree - MC Milipore® 10000). Alíquota de 500,0 µL da amostra foi transferida para o dispositivo de filtração, em seguida a alíquota filtrada foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL e seu volume foi completado com metanol. Posteriormente, 1,0 mL da solução metanólica foi diluída, em balão volumétrico de 5,0 mL, filtrada (0,45 µm Milipore®) e injetada no cromatógrafo (10,0 µL). Tal operação foi realizada em triplicata. A concentração do flavonoide associado ao sistema nanoestruturado foi calculada por meio da diferença entre a concentração do flavonoide total e livre estimada (ALMEIDA, 2010; WU *et al*., 2008), segundo a **Equação 5**.

$$\text{Taxa (\%)} = \frac{M(t)-M(l)}{M(t)}\ x100$$

Equação 5. Taxa de associação do flavonoide (%) com os sistemas nanoestruturados
Legenda. M(t) é a massa total do flavonoide nas partículas de gelatina; M(t) é a massa do flavoide livre na dispersão das nanopartículas

4.2.10 Avaliação da citotoxicidade dos sistemas nanoparticulados

Queratinócitos humanos (linhagem de células HaCaT espontaneamente imortalizadas) foram obtidos do Centro de Investigação em Ciências e Tecnologias da Saúde (CBIOS), Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal.

Células HaCaT (passagens de número 45 a 51), manipuladas em câmara de fluxo laminar Airstream® ESCO Class II BSC, foram cultivadas em meio de

cultura DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium, Sigma®) suplementado com 10,0% v/v de soro fetal bovino (SFB) (Sigma®), 1,0% v/v de solução de estreptomicina e penicilina (Pen-Strep Gilco®) em atmosfera umidificada de incubadora a 5,0% de CO^2 e à 37°C (CO2 Incubater LEEC®). As células, ao atingirem confluência entre 70-85%, foram tripsinizadas (Trypsin 10x Solution, Sigma®) e subcultivadas em frasco estéril de 25 cm^2 (T-Flask, treated, vented cap, sterile, VWR® Tissue Culture Flask) (etapa denominada de "passagem", necessária para manutenção da cultura) ou microplaca de 96 poços (Orange Scientific® Tissue Culture Testplates) (ensaio de citotoxicidade), capacidade de 200,0 µL/poço (PSOTOVA *et al*. 2006; KONTARGIRIS *et al*. 2012).

As células destinadas para o ensaio da citotoxicidade foram transferidas para microplaca na densidade celular igual a 5,0 x 103,0 células/poço e mantiveram-se em cultivo por 24 h nas condições anteriormente descritas. Após, as amostras **B-NC** e **R-NC** foram adicionadas às células nas proporções seguintes: 10,0; 20,0; e 40,0% v/v. Similarmente, o glutaraldeído (GTA) (Sigma®) foi adicionado em demais poços nas seguintes proporções: 0,025; 0,05; e 0,1% p/p. Previamente à adição das nanoestruturas e do GTA, as amostras foram dispersas mecanicamente com emprego de vórtex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries®). Como controles positivo e negativo, utilizaram-se DMSO (40,0 µL/poço) (Sigma®) e água esterilizada (10,0 µL/poço), respectivamente. Os tempos de contato das células com as amostras (e controles) foram 3 e 24 h.

Concluído o período de exposição, o meio de cultura foi removido; novo meio contendo o reagente MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma®) a 0,5 mg/mL adicionado; e realizou-se incubação por 2:30 h (5,0% CO^2 a 37,0°C). Os cristais de formazan, quando obtidos, foram dissolvidos em 200,0 µL de DMSO. Os poços das microplacas foram homogeneizados com auxílio de micropipeta multicanal (Gilson®) e obteve-se a leitura espectrofotométrica das amostras a 595,0 nm por meio de espectrofotômetro (leitor de placas) (Multiskan FC, Thermo Scientific®). Os ensaios foram realizados em triplicatas (ALARIFI *et al.* 2013).

4.2.11 Avaliação da penetração/permeação cutânea *in vitro*

A avaliação da penetração/permeação *in vitro* das nanopartículas de rutina foi realizada no do Centro de Investigação em Ciências e Tecnologias da Saúde (CBIOS), Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal. Foram utilizas amostras de pele de orelhas de porco como modelo de membrana. As amostras de pele foram obtidas de animais recém sacrificados (Raporal S.A, Lisboa, Portugal). A pele foi, em seguida, lavada em água corrente. As amostras não íntegras foram eliminadas. Após a coleta, as amostras de pele foram limpas, removendo-se os pelos e cartilagem, com auxílio de bisturi, e posteriormente estocadas sob refrigeração (- 20,0 ºC) até a utilização nos ensaios (VALLET *et al*. 2007; VICIOLLE *et al*. 2012).

Os estudos de penetração/permeação *in vitro* foram conduzidos utilizando células de difusão verticais do tipo Franz (n=5), possuindo compartimento receptor com capacidade em torno de 4,0 mL e área de difusão média de 0,95 cm^2. A pele foi cortada em tamanhos apropriados e posicionada nas células de Franz. Como meio receptor, foi utilizada solução de etanol: tampão fosfato (20:80), mantida a 37,0 ºC (± 1,0 ºC), e sob agitação constante com barra magnética (130 rpm). Um mililitro de uma solução aquosa de nanopartículas (~1mg/mL) e 1,0 mL de uma solução de rutina (etanol: propilenoglicol; 70:30) de mesma concentração foram aplicados nos compartimentos dadores. A evaporação das fases doadora e receptora foi prevenida pela utilização de aparatos oclusivos. Após 3, 6, 9,12 e 24 horas foram recolhidas alíquotas da solução receptora que, seguidamente, foi reposta com o mesmo volume. Após filtração, as amostras foram submetidas à análise por CLAE a 355,0 nm, por método previamente descrito no item **4.2.7.1** (PARK *et al*., 2014).

Após 24h de estudo, cada área exposta ao produto foi lavada cuidadosamente com tampão fosfato (3 vezes). As camadas do estrato córneo foram retiradas aderindo à fita adesiva na área exposta ao produto. Para tanto, foram utilizados 20 pedaços de fita adesiva Scoth® 3M, medindo 15,0 mm x 20,0 mm. A substância ativa retida nas fitas adesivas foi extraída com metanol.

Estas foram colocadas em tubos de ensaio contendo o solvente (3,0 mL) e submetidas à agitação com agitador de tubo (vórtex) por 2 minutos, e posteriormente levadas ao banho de ultrassom durante 15 minutos. As amostras foram, então, filtradas através de membrana com porosidade 0,45 µm e posteriormente submetidas ao doseamento por CLAE.

Após a remoção do estrato córneo por *tape stripping*, a pele restante foi triturada e colocada em tubos de ensaio contendo o solvente extrator (metanol). As amostras foram, então, submetidas à agitação em vórtex por 2 minutos, e posteriormente levadas ao banho de ultrassom durante 15 minutos. As amostras foram filtradas através de membrana com porosidade 0,45 µm, e o filtrado submetido à doseamento por CLAE (PARK *et al*., 2014; VICIOLLE *et al*., 2012).

Com o intuito de realizar os cálculos do balanço de massa, uma alíquota das nanopartículas de rutina, bem como da solução foi retirada do compartimento doador ao fim do estudo e quantificada por CLAE.

4.2.12 Avaliação da atividade antirradicalar e fotoestabilidade funcional das nanopartículas

A atividade antirradicalar foi determinada empregando-se amostras das nanopartículas de rutina (R-NC) na presença da solução de 70,0 µM do 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH•) à temperatura ambiente (24,0 ± 2,0ºC) em comparação com solução metanol: água (10:90) do flavonoide no estado livre (RL). O potencial antirradicalar foi expresso como a % de sequestro de radicais livres por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV- VIS Evolution 600® com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm) na região da radiação visível, a 517,0 nm. As amostras de rutina livre e nanopartículas de rutina foram comparadas a 100,0 µg/mL antes e após a irradiação com simulador solar (Suntest® CPS +, Atlas, Alemanha). As amostras foram irradiadas durante 6 hora por um simulador solar equipado com lâmpada de xenônio, filtro ótico para eliminar comprimentos de onda inferiores a 290,0 nm e filtro infravermelho para eliminar os efeitos térmicos. A emissão da radiação foi mantida a 580,08 W/m^2,

correspondendo a uma radiação no UV de 55 W/m^2 (dose de irradiação, 1.189 KJ/m^2). O teor do flavonoide na nanopartícula e na solução de rutina livre foi quantificado por CLAE, em método anteriormente descrito no item **4.2.7.1**. As leituras espectrofotométricas foram obtidas em triplicata, empregando 0,1 mL das soluções das amostras e 3,9 mL da solução 70,0 µM do DPPH•, após 30 minutos de reação (protegida da luz). O controle foi realizado por meio da determinação do decaimento da absorbância das amostras ($Ab_{samostra}$) correlacionado com o controle negativo ($Abs_{controle}$), constituído por álcool metílico absoluto 99,5% PA. e solução 70,0 µM de DPPH•, na proporção indicada. A porcentagem de sequestro de radicais (%SRL) livres foi expressa de acordo com a **Equação 6** (BONDET *et al*.,1997; SCALIA; MEZZENA, 2010; VELASCO *et al*., 2012).

$$\%SRL = [(Abs_{controle} – Abs_{amostra}) \times 100]/Abs_{controle}$$

Equação 6. Equação determinante da porcentagem de sequestro de radicais livres
Lengenda: %SRL: Porcentagem de radicais livres sequestrados; $Abs_{controle}$: Absorbância da amostra controle negativo; $Abs_{amostra}$: Absorbância das amostras

4.2.13 Preparo das formulações dermocosméticas

Formulações fotoprotetoras foram desenvolvidas com a finalidade de se obter produtos macroscopicamente estáveis, partindo-se da associação das partículas de gelatina com filtros solares orgânicos, de classes químicas distintas, para obtenção de produtos de amplo espectro de atuação. Mediante emprego disseminado em produtos de mercado e eficácia e segurança estabelecidas, os filtros selecionados foram a avobenzona (*butyl methoxydibenzoyl methane*), como filtro UVA, *p*-metoxicinamato de octila (*ethylhexyl methoxycinnamate*) e octil dimetil PABA (*ethylhexyl dimethyl* PABA), como filtros UVB.

Os filtros solares, em suas máximas concentrações permitidas pela legislação vigente (3,0 % avobenzona; 7,5% p-metoxicinamato de octila e 8,0% octil dimetil PABA), foram combinados a 40% das nanopartículas. A **Tabela 3** apresenta as matérias-primas empregadas no preparo em escala laboratorial das formulações do presente estudo, assim como suas concentrações e classe cosmética. O desenvolvimento das formulações envolveu a elaboração de formas cosméticas semissólidas. Amostras foram subsequentemente submetidas à avaliação preliminar da estabilidade e em seguida, para o teste de estabilidade acelerada e caracterizadas quanto as propriedades organolépticas, ao valor de pH e à viscosidade aparente (cP) (BRASIL, 2006; LAUTENSCHLAGER; WULF; PITTELKOW, 2007; UNITED STATES, 1999).

Tabela 3. Composição qualitativa e quantitativa (% p/p) das formulações fotoprotetoras

Composição (nome químico ou comercial)		Função (BRANDÃO, 2009)	Proporção (% p/p)		
			F1	F2	F3
Fase Oleosa	Avobenzona	Filtro solar UVA	3,0	3,0	3,0
	p-metoxicinamato de octila	Filtro solar UVB	7,5	7,5	7,5
	Octil dimetil PABA	Filtro solar UVB	8,0	8,0	8,0
	BHT	Antioxidante	0,1	0,1	0,1
	Cocoato de butilinoglicol	Emoliente e estabilizante	3,0	3,0	3,0
	Simulgel® INS 100	Base autoemulsionante	4,00	4,00	4,00
	Ciclopentassiloxano	Emoliente (formador de filme)	3,0	3,0	3,0
	Crospolímero de dimeticona	Espessante (formador de filme)	2,0	2,0	2,0
Fase Aquosa	Glicerina	Umectante e hidratante	5,00	5,00	5,00
	Phenonip®	Sistema conservante	0,75	0,75	0,75
	EDTA dissódico	Sequestrante	0,30	0,30	0,30
	Pemulen® TR1	Co-emulsificante e Doador de Cosnsitência	0,10	0,10	0,10
	B-NC	Nanopartícula de gelatina branca	-	40,0	-
	R-NC	Nanopartícula de gelatina com rutina	-	-	40,0
	Água purificada	Veículo	63,25	23,25	23,25
	Trietanolamina	Corretor do valor de pH	q.s.	q.s.	q.s.

Legenda. q.s.: quantidade suficiente; (**-**) : Simulgel® INS 100: Hydroxyethyl acrylate / sodium acryloyldimethyl taurate copolymer (and) isohexadecane (and) polysorbate 60; Phenonip®: Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) ethylparaben (and) propylparaben (and) butylparaben; Pemulen® TR1: Acrylates / C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer.- matéria-prima não adicionada. Nomenclatura INCI foi descrita na Tabela 2.

O modo de preparo das formulações está descrito a seguir:

Fase Oleosa:

A) Solubilização dos filtros solares: Em béquer, os filtros solares foram solubilizados nos emolientes selecionados, sob aquecimento a 70 °C. Após a solubilização, permitiu-se o resfriamento da mistura, à temperatura ambiente.

B) Preparo da mistura de silicones: Em béquer, o crospolímero de dimeticona foi disperso no ciclopentassiloxano, com agitação manual com auxílio de bastão de vidro, até a obtenção de mistura homogênea.

C) Preparo da Fase Oleosa final: A base autoemulsionante e a mistura de silicones foram adicionadas ao béquer contendo os filtros solares solubilizados, com agitação manual para a completa homogeneização.

Fase Aquosa:

A) Preparo da Fase Aquosa : Em um béquer, todos os componentes da fase aquosa foram adicionados, com exceção das nanopartículas, sob agitação mecânica (hélice modelo *dissolver*) com velocidade de 1500 rpm. A agitação foi mantida até a completa hidratação do polímero Pemulen® TR1. Ao final da mistura, o valor de pH do sistema foi ajustado para 7,0.

Processo de emulsificação a frio:

A emulsão foi preparada vertendo-se rapidamente a **Fase Aquosa** sob a **Fase Oleosa**, sob agitação mecânica (hélice modelo *dissolver*) com velocidade de 1500 rpm. Após a formação da emulsão, a agitação foi mantida por três minutos. Ao final do processo houve adição lenta das nanopartículas (formulações **F2** e **F3**), sob agitação manual.

4.2.14 Avaliação preliminar da estabilidade (APE)

4.2.14.1 Teste de Centrifugação

Foram pesados 5,0 g das formulações em tubos de centrífuga. O teste foi realizado, em réplicas de três, nas seguintes condições experimentais: temperatura ambiente (25,0 + 2,0 ºC); velocidade de rotação de 3.000 rpm (210 G); tempo de teste de 30 minutos (BABY, 2007).

Após o ensaio, as formulações foram analisadas macroscopicamente quanto ao aspecto e classificadas como segue:

i.(M) para modificada;

ii.(N) para normal, sem alteração quanto ao aspecto

4.2.14.2 Teste de Estresse Térmico

Cerca de 5,0 g das formulações foram pesados em tubos de ensaio. As amostras, em réplicas de três, foram submetidas ao estresse térmico, em banho-maria termostatizado, no intervalo de temperatura controlada entre 40 – 80ºC, com progressão de elevação de 10ºC/30 minutos. As formulações foram avaliadas ao término de 80,0 ºC, após atingirem a temperatura ambiente (25,0 ± 2,0 ºC). Após o ensaio, as formulações foram classificadas como descrito no item **4.2.14.1** (BABY, 2007)

As formulações classificadas como normal (N) para ambos os ensaios foram consideradas aptas para serem submetidas seqüencialmente ao teste de estabilidade acelarada.

4.2.15 Teste de estabilidade acelerada (TEA)

No presente ensaio, as amostras foram acondicionadas em bisnagas de polipropileno, ocupando cerca de 2/3 do volume total declarado do frasco para avaliação de possíveis trocas gasosas. Visando acelerar o surgimento de

possíveis sinais de instabilidade, as formulações (réplicas de três) foram submetidas às condições de estresse descritas abaixo (BRASIL, 2004):

- **ciclos de 24 horas a -10,0 ± 2,0 °C e 24 horas 40,0 ± 2,0 °C** durante 12 dias (6 ciclos). Análises no T0 (24 após o prepararo) e T12 (ao final do ciclo).

  As amostras foram avaliadas quanto aos seguintes parâmetros:

- **Organolépticos –** foram avaliadas visualmente as características de aspecto, cor e odor.
- **Físico-químico –** o valor de pH foi determinado, como descrito no item **4.2.2**.
- **Físico -** foram pesadas cerca de 10,0 g das formulações e transferidos para dispositivo (compartimento) destinado à análise de amostras de massa reduzida. As condições do viscosímetro *ViscoStar* (R) foram definidas quanto à agulha (TR11) e à velocidade de agitação (10,0 rpm). O valor da viscosidade aparente (cP, *centiPoise*) foi registrado após 3 minutos de agitação à temperatura ambiente de (24,0 $\pm$ 2,0ºC).

As formulações ficaram em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente (24,0 ± 2,0 °C), após retirada da sua condição de armazenamento, a fim de realizar as análises em condições equilibradas de temperatura da amostra e ambiente. As amostras foram avaliadas visualmente após o período de climatização com a temperatura local.

Os critérios adotados para a aprovação ou rejeição das amostras avaliadas seguem abaixo:

- **Aspecto –** a formulação pode apresentar pequenas alterações em relação ao aspecto inicial;
- **Cor e odor –** leves modificações foram aceitas;
- **Valor de pH –** deve manter-se biocompatível;

- **Viscosidade aparente -** os limites de aceitação foram definidos pelo formulador considerando-se a percepção visual e sensorial decorridas de alterações.

Ao final da etapa de preparo, que englobou a Avaliação Preliminar da Estabilidade e Teste de Estabilidade Acelerada as preparações foram subsequentemente submetidas à avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* (BRASIL, 2004; BABY, 2007).

4.2.16 Atividade fotoprotetora *in vitro*: fator de proteção solar (FPS) e amplo espectro

A espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração (*Labsphere® UV2000S Ultraviolet Transmittance Analyzer*) foi utilizada para a avaliação da eficácia *in vitro* frente à proteção UVA e UVB das nanopartículas, solução aquosa de rutina (pH ~7,0) e das formulações fotoprotetoras posteriormente desenvolvidas

Amostras (1,3 mg/cm^2) foram aplicadas uniformemente sobre o substrato (PMMA), na forma de filme fino, em movimentos circulares sobre a superfície da placa. Os registros dos valores espectrofotométricos das amostras aplicadas sobre o substrato, compreendendo o intervalo de comprimento de onda (λ) entre 290,0 e 400,0 nm e registros a cada 1,0 nm, determinaram os valores do FPS, razão UVA/UVB e comprimentos de onda crítico (λ_c), por meio do programa UV-2000S®. Para cada amostra, réplicas de três foram analisadas e, no mínimo, cinco registros de transmitância (SPRINGSTEEN *et al.* 1999; VELASCO *et al*., 2008b; WANG; LIM, 2011, 2011;UNITED STATES, 2011; COSMETICS EUROPE, 2011).

O FPS estimado *in vitro* foi obtido por meio da **Equação 7** (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

$$FPS = \frac{\int_{290nm}^{400nm} E\lambda S\lambda d\lambda}{\int_{290nm}^{400nm} E\lambda S\lambda T\lambda d\lambda}$$

Equação 7. Fator de Proteção Solar in vitro (FPS estimado)

Legenda. *Eλ* = eficácia eritematógena espectral da CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*); *Sλ* = irradiância solar espectral; *Tλ* = transmitância espectral da amostra; *dλ* = intervalo dos comprimentos de onda.

O comprimento de onda crítico estimado das amostras foi determinado pela **Equação 8** (UNITED STATES, 2011).

$$\int_{290}^{\lambda c} A(\lambda)d\lambda = 0.9 \int_{290}^{400} A(\lambda)d\lambda$$

Equação 8. Comprimento de onda crítico in vitro.

Legenda. *A(λ)* = absorbância espectral da amostra; *d(λ)* = intervalo dos comprimentos de onda.

4.2.17 Avaliação *in vitro* da fotoestabilidade das formulações fotoprotetoras

Após realização do ensaio da atividade fotoprotetora *in vitro*, as placas de PMMA contendo as formulações fotoprotetoras foram irradiadas por 1 h, como descrito anteriormente no item **4.2.12**. A irradiância foi mantida a 580,08 W/m^2 (300-800 nm), o que corresponde a irradiância no UV de 55 W/m2 (Dose = 198 kJ/m2). Os parâmetros FPS e comprimento de onda crítico pós-irradiação foram analisados e comparados com os valores obtidos pré-irradiação. Para cada amostra, réplicas de três foram analisadas e, no mínimo, cinco registros de transmitância (SCALIA; MEZZENA, 2010).

4.2.18 Ensaios *in vivo* – aspectos legais e éticos

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em função da realização dos ensaios *in vivo* em humanos. Este estudo foi realizado após a obtenção da aprovação do CEP, regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Para cada participante da pesquisa que manifestasse interesse em participar, foram dadas as informações e esclarecimentos necessários (objetivos, possíveis riscos ou desconforto), fornecendo o seu consentimento, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A pesquisa manteve o anonimato do voluntário e sua saída do estudo, voluntariamente, foi garantida a qualquer tempo (BRASIL, 2012b).

Primeiramente, os participantes foram entrevistados e avaliados por profissional habilitado, considerando os critérios de inclusão e exclusão, listados a seguir:

Critérios de Inclusão:

> **(i)** participantes saudáveis; **(ii)** ambos os sexos; **(iii)** idade entre 18 e 60 anos; **(iv)** pele íntegra na região de teste; e **(v)** concordância em aderir aos procedimentos do estudo, do TCLE.

Critérios de exclusão:

> **(i)** gestação ou lactação; **(ii)** histórico de reações fototóxicas, fotoalérgicas ou patologias fotoinduzidas; **(iii)** histórico pessoal ou familiar de câncer de pele; **(iv)** uso de medicações anti-inflamatórias, imunossupressoras ou fotossensibilizantes - tópicas ou sistêmicas - até um mês antes do início do estudo; **(v)** presença de queimadura solar ou bronzeado no local dos testes; **(vi)** tom de pele desigual na região do estudo; **(vii)** presença de dermatoses inflamatórias, lesões névicas, manchas, queratose seborréica, patologias ativas ou excesso de pelos no local do teste; e **(viii)** alergias conhecidas a qualquer componente das formulações (BRASIL, 2012b; COSMETICS EUROPE, 1997).

Adicionalmente aos critérios elencados, foram considerados potenciais participantes para o estudo da comprovação do valor do FPS aqueles que apresentaram fototipo de pele entre I e III de acordo com classificação de Fitzpatrick (UNITED STATES, 2011).

Com intuito de garantir a segurança dos participantes da pesquisa, as formulações empregadas nos ensaios *in vivo* foram, ainda, avaliadas com relação ao seu perfil microbiano (contagem total de bactérias aeróbias, contagem total de fungos e leveduras e ausência dos patógenos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) (BRASIL, 2010).

4.2.19 Ensaios de segurança das formulações

Os ensaios de segurança das formulações foi realizado pela empresa IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada. As formulações fotoprotetoras de melhor desempenho foram avaliadas com relação à sua segurança por meio dos ensaios de Irritação Cutânea Primária, Irritação Cutânea Acumulada, Sensibilização Dérmica, Fotoirritação e Fotossensibilização. Como controle negativo dos ensaios de segurança, foi utilizada água purificada.

No primeiro dia de cada teste, os participantes foram submetidos a avaliação clínica da pele, tendo em vista a verificação dos critérios de inclusão / exclusão em cada estudo. As possíveis reações de irritação e sensibilização, decorrentes da aplicação das formulações fotoprotetoras, foram avaliadas por médico dermatologista durante e após o período de estudo. Os resultados foram interpretados de acordo com a escala de Draize, que avalia a presença de eritema ou edema nas áreas de teste, conforme a **Tabela 4** (DRAIZE; WOODWARD; CALVERY, 1944; COSMETICS EUROPE, 1997; PERES, 2015).

Tabela 4. Escala de Draize para avaliação do grau de irritação cutânea

Parâmetros	Respostas da pele	Escala
Formação de eritemas	Ausência de eritema	0
	Eritema leve	1
	Eritema bem definido	2
	Eritema moderado a severo	3
	Eritema grave, com formação de escaras	4
Formação de Edemas	Ausência de edema	0
	Edema leve (apenas visível)	1
	Eritema leve (contornos nítidos)	2
	Eritema moderado (espessura inferior a 1 mm)	3
	Eritema grave (espessura superior a 1 mm)	4

4.2.19.1 Irritação cutânea primária e Irritação cutânea acumulada

Nos ensaios de irritação cutânea foi realizada aplicação única (irritação cutânea primária) e repetida (irritação cutânea acumulada) das formulações testadas, visando atestar ausência de irritação nos indivíduos estudados.

Dessa forma, foi realizada aplicação de 0,1 g das formulações e do controle negativo, de maneira oclusiva, no dorso (região infra-escapular) de 55 participantes do estudo. O tempo de contato das formulações com a pele foi de 48 horas para o ensaio de irritação cutânea primária e três semanas (com troca do apósito contendo as formulações e o controle negativo a cada 48 horas) para o ensaio de irritação cutânea acumulada. Após cada troca do apósito, e ao final dos ensaios, a pele dos participantes foi avaliada com relação à possíveis reações de irritação (BRASIL, 2012c; COSMETICS EUROPE, 1997).

4.2.19.2 Sensibilização dérmica

O presente teste foi realizado em simultâneo aos demais ensaios de irritação cutânea (*item* **4.2.19.1**), utilizando os mesmos participantes e amostras. Após o período de três semanas de contato das formulações e do controle negativo com a pele, durante o ensaio de irritação cutânea acumulada (período de indução), os participantes ficaram em período de repouso de duas semanas, sem contato com as formulações em teste (período de repouso).

Em seguida, um novo apósito contendo as mesmas quantidades das formulações e do controle negativo foi aplicado no dorso (região infra-escapular) dos participantes, em área onde nenhum apósito havia sido aplicado anteriormente (período de desafio). Após dois dias, o apósito foi retirado, com avaliação das áreas referentes ao teste de desafio com relação a possíveis reações de sensibilização (BRASIL, 2012c; COSMETICS EUROPE, 1997; KLIGMAN; WOODING, 1967; MARZULLI; MAIBACH, 1975).

4.2.19.3 Fotoirritação cutânea

O referido ensaio foi efetuado por meio de aplicação de 0,1 g das formulações e do controle negativo, de maneira oclusiva, no dorso (região infra-escapular) de 27 participantes do estudo. Após 24 horas, o apósito foi removido e as regiões de aplicação foram avaliados e submetidos a radiação ultravioleta A em simulador solar (ProLumina®), com irradiância de 10 mW/cm^2 e dose de 4 J/cm^2, equivalente a tempo de exposição de 6 minutos e 40 segundos.

Após 24 horas da irradiação, a pele dos participantes foi avaliada com relação a possíveis reações de irritação induzidas pela radiação UV (BRASIL, 2012c, COSMETICS EUROPE, 1997;STOTT *et al*., 1970).

4.2.19.4 Fotossensibilização dérmica

O referido estudo foi realizado em simultâneo ao ensaio de fotoirritação (item **4.2.19.3**), utilizando os mesmos sujeitos e formulações. Durante o

período de indução (três semanas), as formulações e o controle negativo foram aplicados de maneira oclusiva, no dorso (região infra-escapular) dos participantes do estudo, duas vezes por semana. Após 24 horas de cada aplicação, o apósito foi retirado e os sítios de aplicação foram avaliados e submetidos à radiação UVA em simulador solar, com irradiância de 10 mW/cm^2 e dose de 4,0 J/cm^2, equivalente a tempo de exposição de 6 minutos e 40 segundos.

Após o período de indução, iniciou-se o período de repouso (duas semanas), em que não houve aplicação de formulações ou etapa de irradiação. Seguidamente, iniciou-se o período desafio, em que um novo apósito contendo as formulações e o controle negativo foi aplicado no dorso dos participantes, em área onde nenhum apósito havia sido aplicado anteriormente. Após 24 horas, o apósito foi removido e a área foi avaliada e submetida à radiação UVA com as mesmas especificações utilizadas na fase de indução. Por fim, após 24 horas da irradiação, as áreas referentes ao teste de desafio foram avaliadas com relação a possíveis reações de fotossensibilização (BRASIL, 2012c; COSMETICS EUROPE, 1997).

4.2.20 Determinação do FPS (estático)

O FPS pode ser definido como o quociente entre a dose eritematógena mínima (DEM) na pele de voluntários humanos protegida com o fotoprotetor em análise e a DEM na pele ausente de proteção. O DEM é a quantidade de energia efetiva, expressa em J/cm^2, requerida para a produção da primeira reação eritematógena perceptível e com bordas claramente definidas (SHEU *et al.*, 2003).

Este ensaio visa avaliar o nível de proteção solar de um produto destinado à proteção da pele por meio cálculo do FPS embasado na reação eritematógena frente à radiação UV emitida por fonte artificial, sob condições controladas de potência, tempo, temperatura e umidade.

Alíquotas de 2,0 mg/cm^2 das formulações em estudo e do padrão (formulação com FPS conhecido, contendo 7,0% p/p de *ethylhexyl dimethyl* PABA e 3,0 % p/p de *benzophenone-3*).foram aplicadas uniformemente no dorso

(região infra-escapular) de 10 participantes, em áreas previamente delimitadas. Após 15 minutos de secagem, as áreas de aplicação foram submetidas a irradiação artificial (Multiport® 601 UV Solar Simulator), considerando a DEM individual de cada participante e o FPS estimado do produto.

A identificação da DEM foi avaliada no decorrer do período de 24 h após exposição e sua determinação na pele não-protegida (DEMn) e protegida (DEMp) foi realizada visual e simultaneamente sob fonte de iluminação padrão. A eficácia do produto foi determinada por meio de acompanhamento do Investigador/Pesquisador validado quanto ao teste e o cálculo do FPS *in vivo* foi realizado conforme a **Equação 9** (BRASIL, 2012a; UNITED STATES, 2011).

$$\mathrm{FPS} = \frac{\mathrm{DEMp}}{\mathrm{DEMnp}}$$

Equação 9. Fator de proteção solar in vivo

Legenda. *DEMp* = dose eritematógena mínima na pele protegida pela amostra ou formulação padrão; *DEMnp* = dose eritematógena mínima na pele não protegida.

4.2.21 Fator de Proteção UVA (FPUVA)

A determinação do fator de proteção UVA e do comprimento de onda crítico foi realizada de acordo com protocolo internacionalmente reconhecido (COSMETICS EUROPE, 2011). Este método requer a irradiação das amostras em câmara de fotoestabilidade previamente à leitura em espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração (BRASIL, 2012a; COSMETICS EUROPE, 2011).

O ensaio utilizou as mesmas condições analíticas e substratos empregados nas análises de eficácia fotoprotetora estimada *in vitro* (item ***4.1.16***), com a etapa adicional de irradiação em câmara de fotoestabilidade com temperatura controlada e irradiância de 55 W/m^2.

O coeficiente de variação para os valores obtidos individualmente, após a irradiação das amostras não excedeu 20%, conforme recomendação da

agência reguladora. As análises foram conduzidas em triplicata. As amostras foram submetidas a doses de radiação específicas, calculadas conforme a **Equação 10** (COSMETICS EUROPE, 2011).

$$D = UVAPF_0 \times D_0$$

Equação 10. Dose de radiação (D) aplicada às formulações fotoprotetoras

Legenda: *$UVAPF_0$* = fator de proteção UVA previamente à etapa de irradiação; *D_0* = fator de correção entre os resultados de UVA-PF *in vitro* e valor de PPD *in vivo* (D_0 = 1,2 J/cm^2)

Os resultados de absorbância das amostras foram tratados pelo programa UV-2000®, em intervalo de comprimento de onda de 290 e 400 nm e taxa de progressão de 1,0 nm, com conversão dos dados em valores de FPUVA. Foram empregadas, no mínimo, cinco leituras de transmitância por placa avaliada. O valor de FPUVA foi obtido por meio da **Equação 8** (COSMETICS EUROPE, 2011).

$$FPUVA = \frac{\int_{\lambda=320nm}^{\lambda=400nm} P(\lambda) * I(\lambda) * d\lambda}{\int_{\lambda=320nm}^{\lambda=400nm} P(\lambda) * I(\lambda) * 10^{-A(\lambda)*C} * d\lambda}$$

Equação 11. Fator de Proteção UVA

Legenda. *P(λ)* = eficácia pigmentógena espectral da CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*); *I(λ)* = irradiância solar espectral; *dλ* = intervalo dos comprimentos de onda; *A(λ)* = absorbância espectral da amostra (após a etapa de irradiação); *C* = coeficiente de ajuste entre os valores de FPS *in vivo* e *in vitro,* calculado pelo espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração

4.2.22 Forma de análise de resultados

Uma vez contemplada as condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de comparação de médias, os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) seguida

do teste de Tukey para determinar diferenças inter e intragrupos. Para comparação entre dois grupos, foi utilizado o Teste t para duas médias. Utilizou-se o *software* MiniTab® versão 16.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

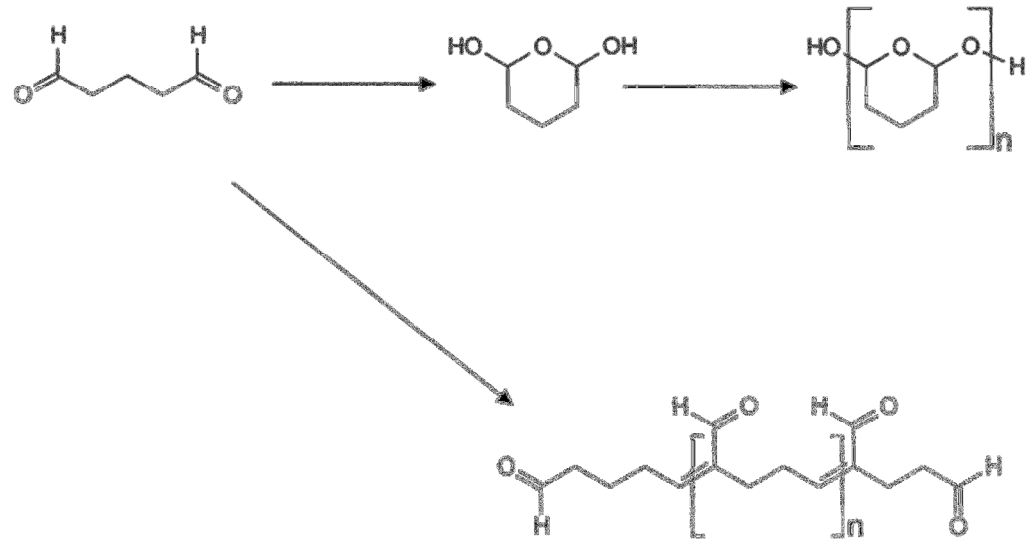
5.1 OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS DE GELATINA CONTENDO RUTINA

Durante a extração do colágeno, ligações covalentes responsáveis pela sua estabilidade e insolubilidade são clivadas. Tal processo gera material proteico heterogêneo com gama ampla de moléculas com diferentes pesos moleculares. Devido à heterogeneidade molecular da gelatina, a preparação de nanopartículas torna-se um desafio para a pequisa. A técnica de dessolvatação em dois passos oferece alternativa para o desenvolvimento desses sistemas, uma vez que, nesse processo, fração de gelatina de alto peso molecular é separada da fração de baixo peso molecular no primeiro passo da dessolvatação. Essa etapa permite a produção de partículas homogêneas de gelatina (COESTER *et al.*, 2000; ZWIOREK, 2006).

A influência de parâmetros como temperatura, valor de pH e tipo de gelatina na obtenção das nanopartículas foi estudada por diversos autores. Nahar e colaboradores (2008) demonstraram que o aumento da concentração do agente de reticulação (glutaraldeído) causou diminuição no tamanho de partícula de NPGs contendo anfotericina B. Tal fato pode ser atribuído à reticulação dos grupamentos amino livres na superfície da nanopartícula, o que causou o enrijecimento e redução de tamanho (ELZOGHBY, 2013; FUCHS, 2010; NAHAR et al., 2008; ZHAI, 2013).

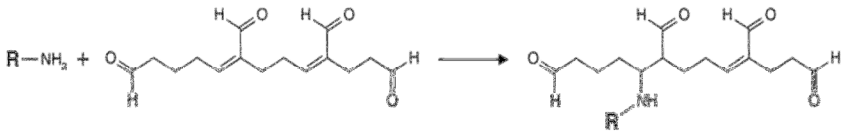
Em solução aquosa, o glutaraldeído pode apresentar-se na forma monomérica ou na forma dos polímeros hemiacetal e α,β insaturados (**Figura 16**). A taxa de polimerização do glutaraldeído em solução aquosa depende de parâmetros, como o valor de pH, concentração e a temperatura. Estudos revelaram que, em solução alcalina, o glutaraldeído forma polímeros insaturados que podem reagir na presença de nucleófilos, especialmente aminas primárias. Sua reação com proteínas resulta em alquilação dos grupamentos amino disponíveis, resultando em aminas secundárias estáveis, como ilustra a **Figura 17**. (HERMANSON, 2008; JAYAKRISHNAN; JAMEELA, 1996)

Figura 16. Polimerização do glutaraldeído em solução ácida e alcalina(HERMANSON, 2008)



.

Figura 17. Reação do glutaraldeído com aminas primárias (HERMANSON, 2008)



Durante o processo de obtenção das partículas de gelatina, a reação de reticulação deve ser realizada para que essas se mantenham estáveis após a evaporação da acetona. Entretanto, em contraposição à sua alta eficiência na reticulação de proteínas, há relatos de diminuição da biocompatilidade cutânea de biofilmes de gelatina reticulados com glutaraldeído. Pelo exposto, optou-se nesse trabalho por estabelecer uma concentração fixa de glutaraldeído em consonância com a legislação vigente, tendo em vista os estudos clínicos propostos (BRASIL, 2012d; ELZOGHBY, 2013).

Em relação à temperatura, estima-se que 40,0℃ é a temperatura mínima e ideal para obtenção de NPGs com distribuição de tamanho homogêneo, em função da alta viscosidade do biopolímero a temperatura ambiente. A possível razão para este efeito é a estrutura em tripla hélice da gelatina que sofre desnaturação parcial à medida que a temperatura sobe gradativamente. A temperaturas mais elevadas (50,0 ou 60,0℃), a desnaturação torna-se completa na estrutura tridimensional do polímero e tal efeito gera influência sobre o aumento do diâmetro médio das nanopartículas (ELZOGHBY, 2013; NAHAR *et al*., 2008).

Adicionalmente, considera-se que o valor de pH da segunda etapa de dessolvatação exerce impacto relevante sobre o diâmetro médio e o índice de poliderpersividade das NPGs. Destaca-se que o pH igual a 11,0 é ideal para a gelatina tipo B, tendo em vista as interações eletroestáticas. O comportamento pH-depende do biopolímero é atribuído à sua natureza polieletrolítica que, em função da acidificação ou alcalinazação do meio, apresenta predominância de grupamentos NH_3^+ ou COO^-. O perfil anfotérico da gelatina tipo B é também ideal para o flavonoide de escolha, a rutina. A alcalinização do meio favorece a solubilidade do composto, tendo em vista os valores de pka da molécula (ELZOGHBY, 2013; HOWARD; WENDER, 1952; PEDRIALI *et al*., 2008; PIETTA, 2000; STEEDEN *et al*., 1994).

Por conseguinte, para a obtenção das nanopartículas optou-se por fixar os parâmetros supracitados, com intuito de otimizar a obtenção do sistema particulado. Dessa forma, foram obtidas duas preparações. A **Tabela 5** apresenta duas preparações desenvolvidas em meio alcalino, a partícula branca (**B-NC**), sem rutina, e a partícula **R-NC**, com concentração de rutina teórica igual a 6,5 mg/mL. As preparações apresentaram-se macroscopicamente homogêneas. A amostra **B-NC** apresentou aspecto leitoso levemente rosado e, a amostra **R-NC,** aspecto leitoso e amarelado.

Tabela 5. Nanopartículas preparadas em meio alcalino

Preparação	Concentração teórica de rutina (mg/mL)	Aspecto	Volume final (mL)
B-NC	-		20,0
R-NC	6,5		20,0

Legenda. B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula de rutina

O aspecto leitoso observado para ambas amostras é característico de uma dispersão coloidal de nanopartículas de gelatina (BRASIL, 2010; ELZOGHBY, 2013). Entretanto, a coloração descrita para a amostra **B-NC** é explicada pela reação de reticulação do glutaldeído com a gelatina, formando ligações aldimina (-CH = N-) entre os grupos amino livres dos resíduos de lisina ou hidroxilisina (DAMINK *et al*., 1995; JEONG; PARK, 2014).

Para a amostra **R-NC**, sua coloração amarelada é reflexo da presença do flavonoide rutina. O polifenol pode estar aprisionado a matriz proteica ou adsorvido na superfície da nanopartícula. Salienta-se ainda, que o flavonoide pode também agir como um agente de reticulação. Mais especificamente, a rutina, pode alterar a estrutura helicoidal da gelatina, rompendo as ligações de hidrogênio. Ligações covalentes são formadas a partir dos grupamentos fenólicos do flavonoide e dos grupamento amino do polímero (PEÑA *et al*., 2010; ZHANG *et al*., 2010b).

5.2 DETERMINAÇÃO DO VALOR DE PH

A carga líquida de polieletrólitos, tais como a gelatina em solução, é fortemente influenciada pelas condições de valor de pH prevalentes. Assim, sua alteração pode ocasionar modificações no tamanho de partícula final, pois as forças de repulsão eletroestáticas dificultam a agregação intermolecular (ZWIOREK, 2006).

O valor de pH (11,0) utilizado durante o desenvolvimento das nanopartículas foi selecionado em função do PIE da gelatina tipo B. Valores de pH próximos ao PIE tendem a gerar agregação e precipitação da gelatina durante o processo do desenvolvimento. Nessas condições, a carga da gelatina no meio reacional é insuficiente para impedir que nanopartículas se estabilizem. Os valores de pH obtidos durante o final do processo (n=3) indicaram que **B-NC** e **R-NC** foram estatisticamente diferentes para esse parâmetro ($p<0,05$), como observado na **Tabela 6** (ZWIOREK, 2006).

Tabela 6. Valores de pH das nanopartículas preparadas em meio alcalino(em valores médios ± desvio padrão; n=3)

Preparação	Valores de pH
B-NC	$9,53 \pm 0,31^{a}$
R-NC	$10,05 \pm 0,25^{b}$

Legenda. B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula de rutina. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos($p<0,05$)

Apesar de apresentarem valores de pH diferentes , as amostras **B-NC** e **R-NC** mantiveram perfil alcalino muito similar ao final do processo.

Visando desenvolver nanopartículas com o valor de pH biocompatível e estáveis, o valor de pH das amostras **B-NC** e **R-NC** foi ajustado para 7,0 e submetido às demais etapas de caracterização.

5.3 *DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS, ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE E POTENCIAL ZETA*

A alteração das propriedades de um material ao atingir a escala nanométrica se deve à combinação de alguns fatores. Observa-se que quanto menor o tamanho da amostra, mais evidentes se tornam os efeitos de superfície, pelo aumento da proporção entre sua área e seu volume. Outro aspecto relevante se relaciona aos chamados efeitos de superfície, devido ao aumento da razão entre o número de átomos que estão em sua superfície relativamente àqueles dispersos por seu volume (PIMENTA; MELO, 2004).

A determinação dos referidos parâmetros foi realizada pela técnica do espalhamento dinâmico de luz, que detecta o movimento Browniano dos analitos dispersos, por meio da medição da distribuição angular da luz difusa em relação às flutuações de concentração. A partir das flutuações, uma função de autocorrelação é derivada e invertida para determinar o coeficiente de difusão da amostra analisada. O coeficiente de difusão, por sua vez, representa a velocidade do movimento Browniano do analito. O tamanho de partícula é, então, calculado a partir da velocidade medida, em relação a dois fatores, viscosidade e temperatura (ZWIOREK, 2006).

Assim, o diâmetro hidrodinâmico, d(H), é calculado pela **Equação 12** de Stokes-Einstein:

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

Equação 12. Diâmetro hidrodinâmico

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

Os resultados são apresentados como médias de tamanhos, entretanto, não esclarecem suas distribuições. Para esse efeito, um segundo valor de referência, o índice de polidispersividade (IP) é utilizado. O IP pode ter valores de 0 a 1 e é equivalente à variância da distribuição (ZWIOREK, 2006).

Os valores de diâmetro médio (n=3) de **B-NC** e **R-NC** foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), como descrito na **Tabela 7**. A adição do

flavonoide ao sistema particulado favoreceu a elevação de seus diâmetros médios, no entanto, sem comprometer a homogeneidade de distribuição das mesmas (índice de polidispersividade < 0,2) (SIQUEIRA, 2008).

Tabela 7. Caracterização física das partículas: Diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta (em valores médios ± desvio padrão; n=3)

Parâmetros	**Amostras**	
	B-NC	**R-NC**
Valor de pH	7,0	7,0
Tamanho de partícula (nm)	318,9 ± 6,9 [a]	442,8 ± 4,9[b]
Índice de Polidispersividade	0,06 ± 0,03[c]	0,12 ± 0,01[c]
Potencial Zeta (mV)	-28,5 ± 0,9[d]	-26,6 ± 0,5[d]
Concentração teórica de rutina (mg/mL)	-	6,5

Legenda. B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula de rutina. Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos($p<0,05$)

A análise do diâmetro médio das partículas foi compatível com os dados relatados na literatura para NPGs. Diversos autores descreveram a obtenção de NPGs para aplicação farmacêutica, com diâmetro médio superior a 250,0 nm (COESTER *et al*., 2000; FUCHS, 2010; NAHAR *et al*., 2008; ZHAI, 2013).

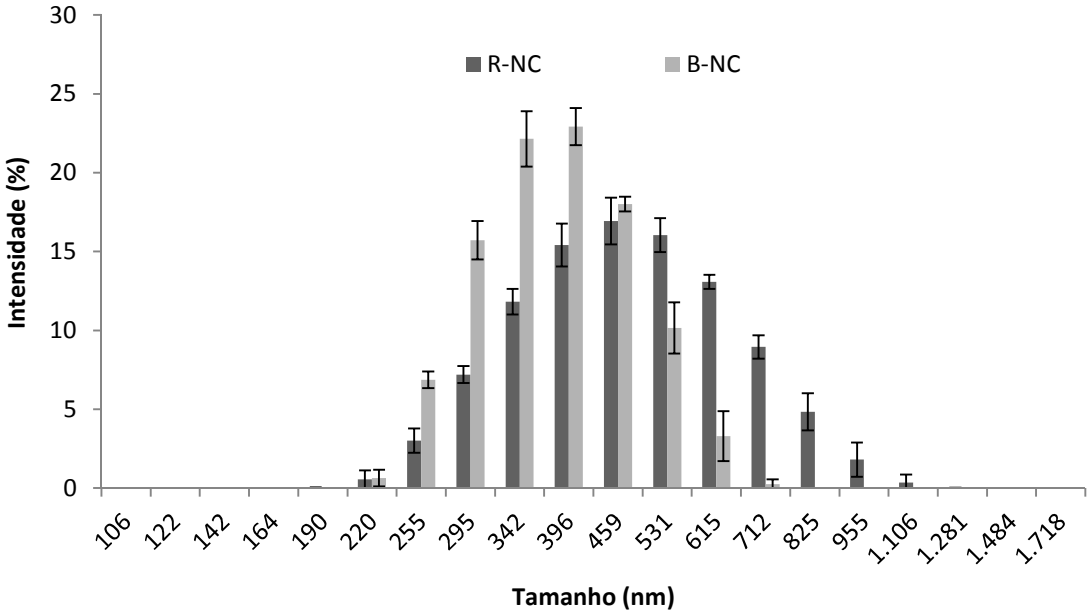
Em geral, os sistemas particulados apresentam diferentes mecanismos para penetração cutânea, a saber, a via intercelular, a via transcelular e através de folículos pilosos (PROW *et al*., 2011). O estrato córneo representa a primeira principal barreira física contra a penetração cutânea de agentes patogênicos e produtos químicos. Assim, apenas pequenas moléculas são capazes de mover-se livremente através dessa camada. No entanto, tem sido relatado que a livre circulação de pequenas partículas, com dimensões que variam de 0,4 a 100nm, pode ser fisicamente viável e restrita a fendas entre os corneócitos. Partículas muito pequenas apresentam a tendência de aderir a superfícies, facilitando dessa forma, a permeação de compostos ativos (CEVC, 2004; VOGT *et al*., 2006; ZHAI, 2013).

Pelo exposto, a obtenção de nanopartículas com diâmetro médio acima de 300,0 nm e índice de polidispersividade inferior a 0,2 apresenta perfil ideal para aplicação em formulação fotoprotetoras, tanto nos aspectos que tangem a eficácia como a segurança dos referidos produtos (SIQUEIRA, 2008).

A técnica de espalhamento dinâmico de luz, apesar de ser uma ferramenta acessível, é também conhecida por ter vários inconvenientes, que são, principalmente, inerentes aos princípios da técnica. O tamanho de partícula é determinada a partir de flutuações na intensidade da luz dispersa devido ao movimento Browniano das partículas. Por conseguinte, tal técnica é muito sensível à presença de partículas grandes. Isto pode ser uma vantagem se o objetivo é detectar pequenas quantidades de partículas grandes, mas pode ser uma desvantagem para a determinação do tamanho preciso. Partículas de poeira ou pequenas quantidades de grandes agregados pode dificultar a determinação do tamanho se o componente principal exibe tamanho nitidamente menor. À vista disso, torna-se fundamental realizar análises completares de caracterização física e morfológica de nanopartículas (BOYD; PICHAIMUTHU; CUENAT, 2011; FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010).

A **Figura 18** apresenta a distribuição de tamanho das amostras **B-NC** e **R-NC** por intensidade de espalhamento de luz. Adicionalmente, os valores de índice de polidispersividade (n=3) das amostras não apresentaram diferença estatística, como descrito na **Tabela 7**. Ainda que a técnica de espalhamento dinâmico de luz não apresente exímia precisão para amostras polidispersas, estima-se que valores de índice de polidispersividade inferiores a 0,15 indicam distribuição monomodal das partículas. Todavia, apesar do comportamento monomodal observado para as amostras **B-NC** e **R-NC**, a presença de poucas partículas de diâmetro elevado na amostra **R-NC**, deslocou o valor médio de IP para um valor superior a 0,1 (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010; FUCHS, 2010).

Figura 18. Intensidade de espalhamento de luz em função da distribuição de tamanho



O potencial zeta, indicativo do potencial de superfície das partículas, além de ser utilizado para o controle da estabilidade de suspensões coloidais, é fator relevante para o entendimento dos fenômenos de dispersão e de agregação. A maioria das partículas em suspensão possuem carga de superfície, em função da ionização de grupos funcionais, ou até mesmo, pela adsorção de íons na sua superfície. A medição do potencial zeta é realizada por meio da aplicação de um campo elétrico sobre a suspenção coloidal. Dessa forma, as partículas migram em direção ao eletrodo de carga oposta em uma velocidade constante (mobilidade eletroforética). O potencial zeta é, então, calculado através da mobilidade eletroforética das partículas, pela equação de Henry. Valores em módulo mais elevados tendem a tornar os sistemas mais estáveis, pois, devido à repulsão eletrostática entre as partículas, a barreira de energia para agregação é superior (SIQUEIRA, 2008; ZHAI, 2013).

A **Tabela 7** descreve os valores de potencial zeta das preparações **B-NC** e **R-NC**. Os valores de potencial zeta não apresentaram diferença estatística. A carga de superfície negatica é explicada pelo processo de obtenção realizado em meio alcalino (11,0), acima do PIE da gelatina tipo B. De maneira geral,

suspensões coloidais que apresentam valores de potencial zeta superiores a 30,0 mV, em módulo, apresentam estabilidade física. Apesar dos valores obtidos para ambas as amostras estarem ligeramente abaixo de 30,0 mV, encontram-se compatíveis com valores obtidos, para NPGs, por diversos autores (COESTER *et al*., 2000; FUCHS, 2010; LEO *et al*., 1997; NAHAR *et al*., 2008; ZHAI, 2013; ZWIOREK, 2006).

Leo e colaboradores (1997), observaram que nanopartículas de gelatina reticuladas com glutalreído permaneciam fisicamente estáveis quando armazenadas em geladeira (2,0 – 8,0°C) por cerca de dez meses. No presente trabalho, optou-se por realizar a estabalidade física da amostra **R-NC**, tendo em vista seu diâmetro médio mais elevado e IP superior a 0,1. Somente o armezenamento em geladeira (5,0 ± 2,0 °C) foi selecionado para o presente estudo. Optou-se somente analizar o armazenamento em geladeira, tendo em vista a dificuldade de estabelecer a estabilidade microbiológica das NPGs sem adição adicional de conservantes. Salienta-se que os valores de pH mantiveram-se próximos a 7,0 durante o período de análise (ELZOGHBY, 2013; ZHAI, 2013).

Os resultados da avaliação da estabilidade física da amostra **R-NC** durante 90 dias em geladeira (5,0 ± 2,0 °C) são apresentados na **Tabela 8**. Observou-se que após 30 dias de armazenamento, a amostra **R-NC** conservou as características físicas da condição T0, exceto pelo aumento do potencial zeta. A partir de 60 dias de armazenamento foi possível observar aumento do diâmetro médio das partículas, que foi seguido pelo aumento do IP. Entretanto, não atribuiu-se esse aumento, a formação de aglomerados, e sim a sensibilidade da técnica a partículas maiores. Constatou-se ainda que o potencial zeta apresentou flutuações constantes ao longo dos 90 dias de análise, com aumento ao longo do tempo, perfil que favoreceu a estabilidade a longo prazo do sistema coloidal. A avaliação da estabilidade da nanopartícula de gelatina contendo rutina evidenciou, ainda, a compatibilidade do flavonoide com o biopolímero. Ao longo do período estudado, **R-NC** manteve-se macroscopicamente estável, sem a formação de precitados. Tal fato reforçou o pressuposto de que a interação da rutina com polímero ocorreu por vários mecanismos, a saber: aprisionamento à matriz proteica, adsorção à superfície

da nanopartícula, ou mesmo, reticulação das estruturas (ELZOGHBY, 2013; FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010; LEO *et al*., 1997; PEÑA *et al*., 2010; ZHAI, 2013; ZHANG *et al*., 2010b).

Tabela 8. Avaliação da estabilidade física da amostra **R-NC** durante 90 dias em geladeira(5,0 ± 2,0 ℃)

	Tamanho de partícula (nm)	**Índice de Polidispersividade**	**Potencial Zeta (mV)**
Geladeira $_{(T0)}$	442,8 ± 4,9^{a}	0,12 ± 0,1^{c}	-26,5 ± 0,5^{e}
Geladeira $_{(T30)}$	451,8 ± 3,4^{a}	0,15 ± 0,3^{c}	-32,2 ± 0,6^{f}
Geladeira $_{(T60)}$	495,9 ± 16,0^{b}	0,22 ± 0,1^{d}	-26,8 ± 0,1^{e}
Geladeira $_{(T90)}$	493,9 ± 3,9^{b}	0,21 ± 0,1^{d}	-34,2 ±1,1^{g}

Legenda. R-NC: nanopartícula de rutina. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos($p<0,05$,n=3)

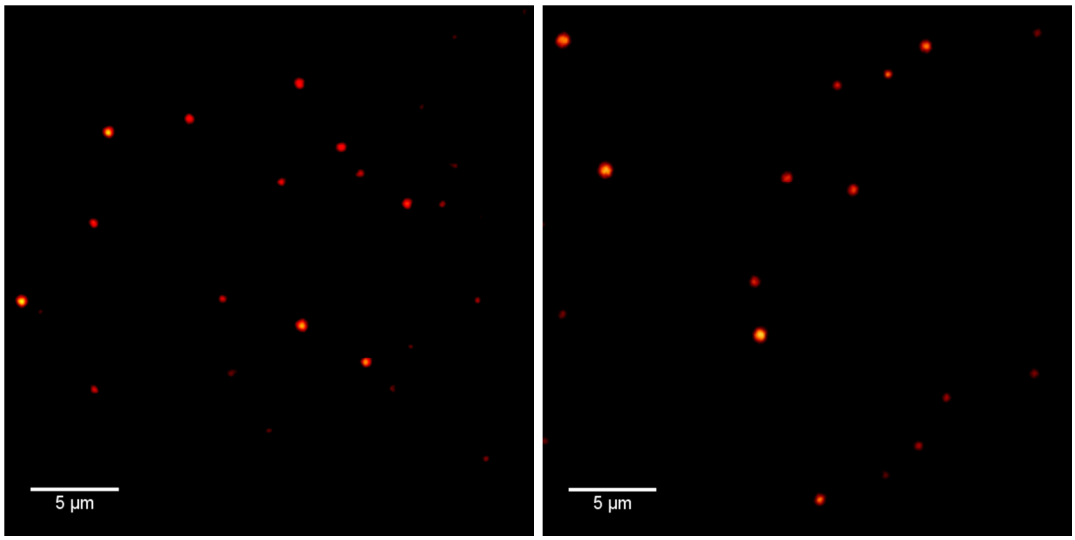
5.4 MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS

Em contraposição às microscopias óticas convencionais, a confocal de fluorescência apresenta vantagens, como por exemplo, permitir a obtenção de imagens com foco em pequenos componentes fluorescentes em alta resolução (AMOS; WHITE, 2003; BECHTEL *et al*., 2014).

O objetivo do emprego desta técnica foi identificar a localização da rutina na nanopartícula, de maneira a esclarecer os mecanismos de interação entre o flavonoide e o polímero.

A **Figura 19** ilustra as fotomicrografias das nanopartículas de gelatina contendo ou não rutina. As imagens indicaram que partículas apresentaram florescência e formato esférico, além de boa dispersão em meio aquoso, sem presença de aglomerados. Adicionalmente, o fundo preto das imagens sugeriu que não houveram demais partículas presentes no meio aquoso.

Figura 19. Fotomicrografias de **R-NC** (esquerda) e **B-NC** (direita). As imagens confocais foram obtidas com excitação a 458,0 nm, com 30% de intensidade de laser para **R-NC** e 80% para **B-NC**. A emissão da flurescência foi recolhida na faixa de 475,0-700,0 nm



Legenda. B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula de rutina

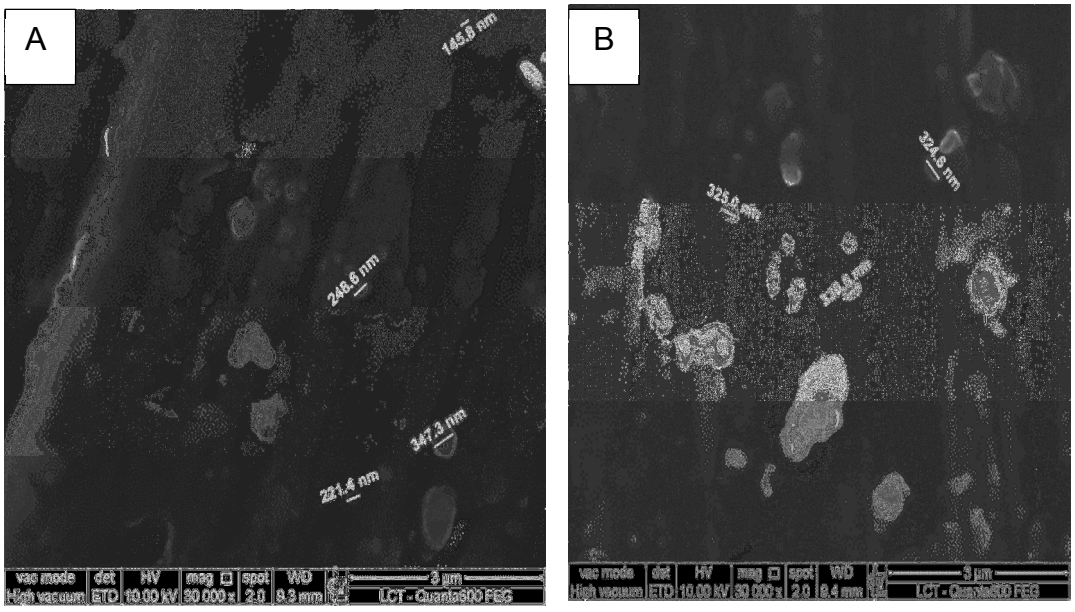
Uma vez que a rutina é um flavonoide que apresenta fluorescência, foi possível inferir que ela estava localizada ao redor ou no interior das nanopartículas, tendo em vista o brilho uniforme, homogeneamente distribuído nas imagens (BONDAREV; KNYUKSHTO, 2013). Observou-se ainda que, as nanopartículas brancas também emitiram fluorescência, entretanto, somente quando excitadas com alta intensidade de *laser.* Essa fraca fluorescência emitida por **B-NC** foi atribuída à presença dos aminoácidos tirosina e fenilalanina. A fenilalanina não é excitável na maioria dos casos de modo que a emissão desse resíduo não é relevante. Dessa forma, a fluorescência da amostra **B-NC** resultou majoritariamente dos resíduos de tirosina da gelatina (LIU *et al.*, 2000). A presença da rutina no interior das nanopartículas indicou uma forte interação entre a proteína e o flavonoide, já evidenciada nos estudos de estabilidade (ELZOGHBY, 2013).

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS

A forma ou morfologia de nanopartículas desempenha um papel importante na sua toxicidade. Na forma aglomerada, por exemplo, nanopartículas comportam-se como partículas maiores. Por conseguinte, evidencia-se que a aglomeração de nanopartículas, juntamente com as análises de caracterização de forma e tamanho, devem ser consideradas no que tange os aspectos relacionados à segurança e o impacto ambiental de novos materiais (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

Uma desvantagem da MEV é a possível mudança nas propriedades das amostras durante o preparo e obtenção das imagens. O aspecto das nanopartículas de gelatina é apresentado na **Figura 20**. Não foi possível observar diferenças morfológicas entre as amostras. Ambas as nanoestruturas apresentaram aspecto esférico, como descrito na literatura. A ausência de aglomerados foi constatada pela análise conjunta das imagens de MEV, microscopia confocal de fluorescência, bem como, a caracterização física das partículas (BOOTZ *et al*., 2004; ELZOGHBY, 2013; NAHAR et al., 2008; ZHAI, 2013).

Figura 20. Fotomicrografia por MEV das nanopartículas **B-NC** (A) e **R-NC** (B) em aumentos de 30.000 vezes



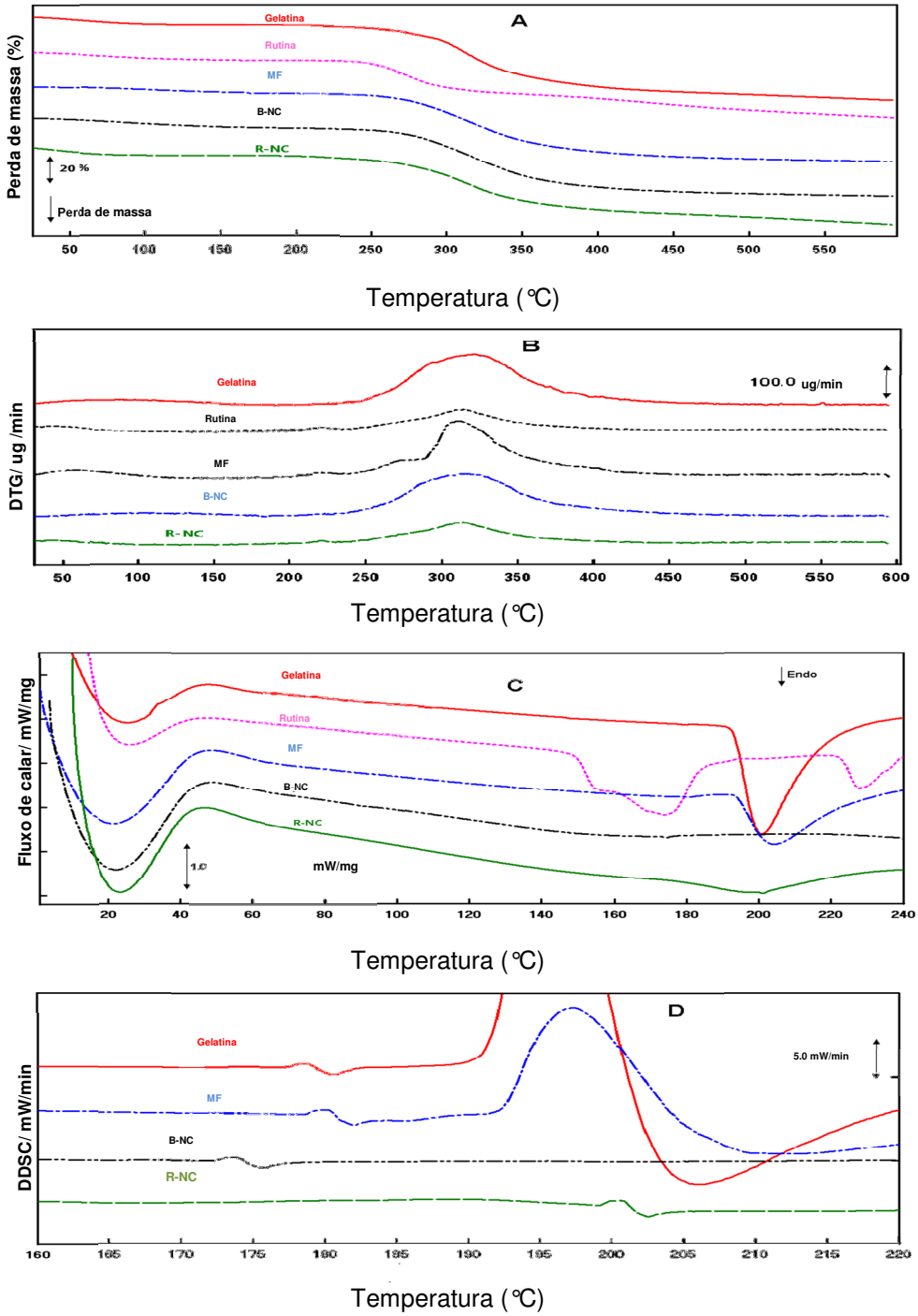
5.6 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA

As curvas de TG/DTG e DSC/DDSC das matérias primas, mistura física dos componentes, bem como das nanopartículas são apresentadas na **Figura 21.** Os dados termogravimétricos, obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, da rutina, da gelatina tipo B, da mistura física de rutina e gelatina tipo B (**MF**), nanopartícula branca (**B-NC**) e da nanopartícula de rutina (**R-NC**) estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Dados termogravimétricos das matérias primas, mistura física dos componentes e NPGs

Amostra / Parâmetro	**Etapa da decomposição**		
	Primeira	**Segunda**	**Terceira**
Rutina			
Faixa de temperatura (°C)	25-150	200-350	350-600
Perdade massa (%)	7,0	32,1	22,1
DTG_{pico} (°C)	65,0	275,0	437,0
Gelatina			
Faixa de temperatura (°C)	25-200	200-600	-
Perdade massa (%)	9,5	64,7	-
DTG_{pico} (°C)	85,9	324,2	-
Mistura Física			
Faixa de temperatura (°C)	25-200	200-600	-
Perdade massa (%)	6,0	64,5	-
DTG_{pico} (°C)	104,5	318,5	-
B-NC			
Faixa de temperatura (°C)	25-150	200-230	240-600
Perdade massa (%)	7,8	2,7	69,1
DTG_{pico} (°C)	57,2	218,7	312,8
R-NC			
Faixa de temperatura (°C)	25-150	170-230	230-600
Perdade massa (%)	7,8	3,0	62,5
DTG_{pico} (°C)	41,2	220,4	314,8

Figura 21. Perfil Termoanalítico das matérias primas, mistura física dos componentes e das NPGs obtidos sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL /min): TG: curva A; DTG curva B ; DSC curva C; DDSC curva D



Legenda. MF: mistura física de rutina e gelatina pura tipo B na mesma proporção das nanopartículas R-NC; B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula de rutina

As curvas de TG/DTG da gelatina tipo B, indicaram duas etapas de perda de massa. A primeira etapa ocorreu entre 25 e 200°C, correspondendo a uma perda de massa de aproximadamente 9,5%, que foi atribuída à perda de água adsorvida tanto por centros de alta energia (dentro da estrutura helicoidal) como por grupos polares da gelatina (água estrutural, ou seja, fora da hélice) (KOZLOV; BURDYGINA, 1981).

A segunda etapa de perda de massa, ocorrida entre 200 e 600°C (Δm_2 = 74,3%), esteve associada à quebra da cadeia proteica (estrutura helicoidal) e ruptura das ligações peptídicas, bem como a degradação térmica da gelatina (CORREIA *et al*., 2013). A curva de TG/DTG da rutina, indicou três etapas de perda de massa entre 25 e 600°C. A primeira etapa, entre 25 e 150°C, correspondeu a uma perda de massa de 7,9%, atribuída a conversão da rutina para a forma anidra. Adicionalmente, a curva TG/DTG indicou que o referido flavonoide apresentou estabilidade térmica até 200°C e sofreu rápida decomposição entre 200 e 350°C, com perda de massa de aproximadamente 32,4%. A partir de 350°C, a perda de massa ocorreu de maneira gradativa até 600°C, temperatura em que a decomposição da porção glicosídica ocorreu e houve parcial eliminação do material carbonáceo formado nas etapas anteriores de decomposição (FILHO *et al*., 2002).

A curva TG da mistura física (**MF**) mostrou-se similar a gelatina pura, com duas etapas de decomposição, mesma magnitude de perda de massa e faixa de temperatura, indicando não haver interação entre rutina e gelatina.

As curvas de TG/DTG das nanopartículas, **B-NC** e **R-NC**, indicaram que a decomposição térmica ocorreu em três etapas (**Tabela 9**) e que a estabilidade térmica das NPGs foi menor, principalmente da nanopartícula de rutina. Após a etapa de perda de água, a segunda etapa da perda de massa iniciou-se a 197°C (T_{onset}) e 188°C para **B-NC** e **R-NC**, respectivamente. Em contrapartida, as amostras **MF** e gelatina pura apresentaram T_{onset} acima de 260°C, na segunda etapa da decomposição. Adicionalmente, as curvas de DTG das amostras **B-NC** e **R-NC** revelaram um segundo evento (perda de massa ~3%), que não foi observado na gelatina pura ou na mistura física, indicando mudanças significativas nas propriedades da gelatina. Tal fato pode ser atribuído às mudanças estruturais causadas pela reticulação química,

resultante do método de obtenção das nanopartículas de gelatina (KOZLOV; BURDYGINA, 1981). Mais especificamente, a rutina, pode alterar a estrutura helicoidal da gelatina, rompendo as ligações de hidrogênio. Ligações covalentes são formadas a partir dos grupamentos fenólicos do flavonoide e dos grupamento amino do polímero (PEÑA *et al*., 2010; ZHANG *et al*., 2010b).

As nanopartículas de gelatina e seus componentes isolados foram submetidos a tratamento térmico com intuito de avaliar mudanças na estrutura interna e garantir uma história térmica equivalente para todas as amostras. Tal abordagem tem o objetivo de minimizar a influência da umidade no comportamento térmico das amostras. O segundo aquecimento das curvas de DSC da gelatina pura e da mistura física foram similares, apresentando um pico endotérmico relacionado à transição conformacional hélice-espiral da gelatina, na faixa de 180 a 240°C (CORREIA *et al*., 2013; PEÑA *et al*., 2010) e o início da decomposição térmica, de acordo com as curvas TG/DTG. Esse evento foi dificilmente observado na curva DSC da amostra **R-NC** e totalmente suprimido na curva de **B-NC**. Em geral, a reticulação química não exerce efeito sobre a resistência térmica ou a formação da estrutura helicoidal (CORREIA *et al*., 2013; KOZLOV; BURDYGINA, 1981).

A derivada primeira da curva de DSC (DDSC) foi utilizada para verificar a presença de transição vítrea, que é mostrada na **Figura 21**. Em valores inferiores à temperatura de transição vítrea as cadeias poliméricas apresentam pouca mobilidade. Quando o material é aquecido, as cadeias adquirem certo grau de mobilidade e movimento provocando mudança em sua capacidade calorífica. O perfil das curvas de gelatina pura e da mistura física (**MF**) do DDSC foram similares e apresentaram temperatura de transição vítrea (T_g) na faixa de 178 a 182°C. O mesmo evento, com padrão de curva muito similar foi observado para as amostras **B-NC** e **R-NC** a 172°C e 201°C, respectivamente. Em geral, a diminuição da T_g observada para a nanopartícula branca pode ser atribuída a um aumento da mobilidade estrutural do polímero (BURDYGINA; FALINA; KOZLOV, 1980; CORREIA *et al*., 2013; FILHO *et al*., 2002). Além disso, as alterações no comportamento térmico observado na região de transição conformacional de ambas as nanopartículas, corroboradas pelas curvas de TG / DTG, sugeriram claramente que o método de preparação das

nanopartículas teve impacto sobre a estrutura conformacional, e possivelmente, sobre as propriedades do biopolímero. No entanto, o aumento acentuado da temperatura para a T_g da nanopartículas **R-NC** indicou baixa mobilidade das redes de gelatina e confirmou a presença de interações rutina-gelatina. Tal aumento foi também observado na temperatura T_g para filmes gelatina reticulados com taninos (PEÑA et al., 2010).

5.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DA TAXA/EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DO FLAVONOIDE NAS NANOESTRUTURAS

5.7.1 Linearidade

O método analítico proporcionou linearidade de resposta da área do pico em função da concentração para as soluções da rutina padrão de referência primário (T = 97,1%), no intervalo de concentrações entre 5,0 e 100,0 µg/mL.

Na **Tabela 10** estão descritos os resultados experimentais para a construção da curva analítica da substância química de referência, representada pelo gráfico na **Figura 23.** O coeficiente de correlação e a equação da reta estão apresentados na **Tabela 11.**

O coeficiente de correlação (R^2) foi 0,9997. Tal fato permitiu constatar que a curva analítica apresentou características de linearidade, em consonância com as determinações normativas (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005).

Tabela 10. Dados para a construção da curva analítica das diluições do flavonoide rutina padrão de referência primário (T = 97,1%)

Concentração teórica de rutina padrão de referência primário (μg/mL)	**Concentração Experimental**			
	A_1	**A_2**	**A_3**	**$A_{Média}$± dp**
5,0	45.167	45.652	45.484	45.484 ± 246
25,0	248.284	246.085	247.782	247.782 ± 1.152
50,0	509.607	510.243	508.777	508.777 ± 735
75,0	757.714	763.337	766.758	766.758 ± 4.566
100,0	1.039.461	1.044.308	1.046.453	104.6453 ± 3.581

Legenda. A_1-A_3: réplicas das áreas dos picos; **$A_{Média}$± dp**: média ± desvio padrão das áreas dos picos, (n=3)

Figura 23. Curva analítica do flavonoide rutina padrão de referência primário (T = 97,1%). As concentrações da substância química de referência foram 5,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna Shimadzu® de fase reversa C-18 4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5,0 µm; fase móvel solução aquosa de ácido fórmico 0,3%: acetonitrila (80:20), vazão: 1,2 mL/min; volume de injeção 10,0 µL; detecção 350,0 nm, temperatura: 40° C.

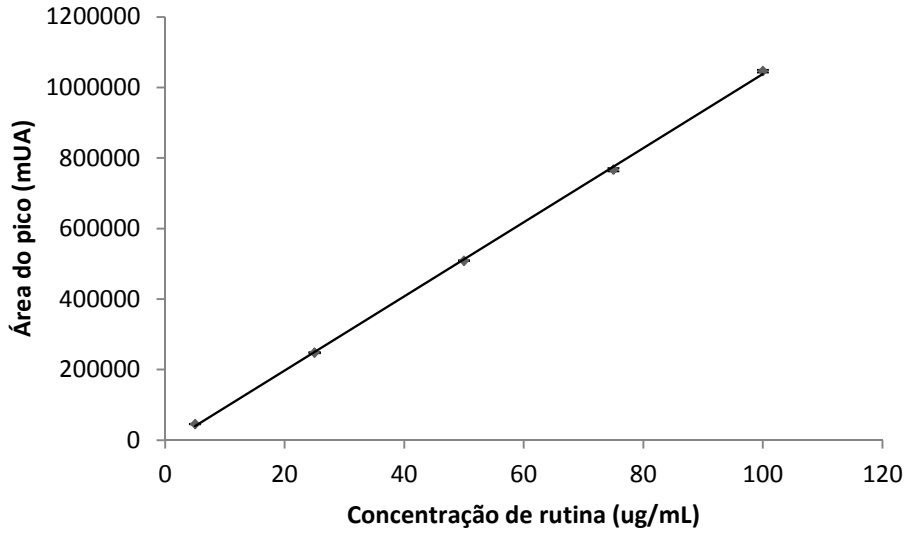


Tabela 11. Análise de regressão na avaliação da linearidade da curva analítica do flavonide rutina padrão de referência primário (T = 97,1%)

	Análise da regressão linear
Equação da reta	Área do pico = +10509 (Concentração de rutina µg/mL) – 12891
Coeficiente de correlação linear (R^2)	0,9997

5.7.2 Limite de detecção

Pela utilização da **Equação 1** e das informações apresentadas na **Tabela 11**, o limite de detecção estimado do flavonoide rutina padrão de

referência primário foi **0,65 µg/mL**. O referido resultado foi compatível com os dados descritos na literatura para métodos de quantificação do flavonoide rutina por CLAE (BRASIL, 2003; DUBBER; KANFER, 2004).

5.7.3 Limite de quantificação

O LQ estimado foi **1,96 µg/mL** para o flavonoide rutina padrão de referência primário, por conseguinte, assumiu-se que valores de concentração superior ao obtido são quantificados com precisão e exatidão aceitáveis pelo método empregado, demonstrando sua sensibilidade (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013). A **Tabela 11** apresenta as informações para os cálculos dos limites de quantificação estimados, utilizando a **Equação 2**.

5.7.4 Especificidade e pesquisa de interferentes

Para a avaliação da especificidade e pesquisa de interferentes do referido método analítico optou-se por realizar a comparação dos cromatogramas da solução do flavonoide rutina padrão primário (T = 97,11%) e da solução do flavonoide rutina amostra comercial (T = 95,11%), **Figuras 24** e **25**, respectivamente. A análise dos cromatogramas indicou que o flavonoide rutina apresentou o tempo de retenção de **5,9 minutos** para ambas as amostras analisadas. Contatou-se, adicionalmente, a presença de um pico de isoquercetina (**7,2 minutos**) em ambas as amostras analisadas, entretanto, a presença de tal componente não interferiu na identificação e quantificação da rutina (SHABIR, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013; WANG *et al*., 2013) .

A **Figura 26** representa o cromatograma da amostra de nanopartícula sem adição de rutina (**B-NC**). Observou-se que a matriz isenta da substância de interesse não apresentou interferente que eluísse no tempo de retenção da rutina. Por conseguinte, o método pode ser utilizado para identificação e quantificação do flavonoide no sistema nanoparticulado (RIBANI *et al*., 2004; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Figura 24. Cromatrograma referente ao flavonoide rutina, padrão de referência primário (97,1%; 20 µg/mL). Condições cromatográficas: Coluna Shimadzu® de fase reversa C-18 4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5,0 µm; fase móvel solução aquosa de ácido fórmico 0,3%: acetonitrila (80:20), vazão: 1,2 mL/min; volume de injeção 10,0 µL; detecção 350,0 nm, temperatura: 40° C.

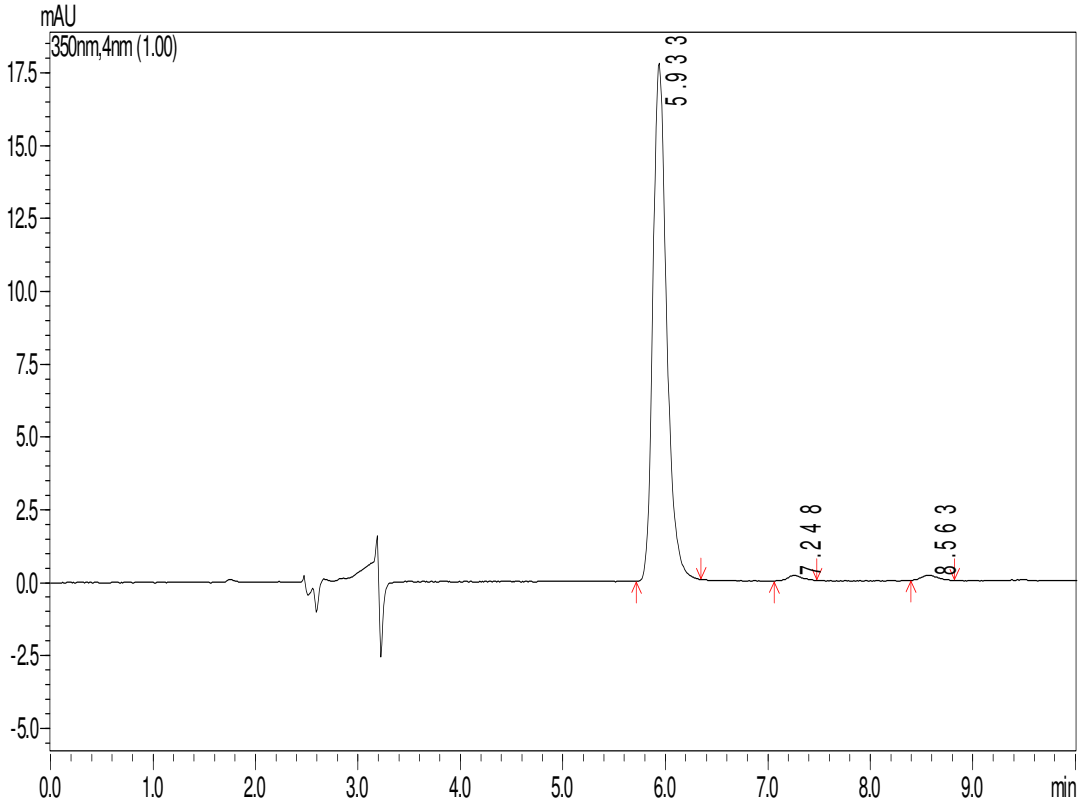


Figura 25. Cromatrograma referente ao flavonoide rutina, amostra comercial (95,0%; 20 µg/mL). Condições cromatográficas: Coluna Shimadzu® de fase reversa C-18 4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5,0 µm; fase móvel solução aquosa de ácido fórmico 0,3%: acetonitrila (80:20), vazão: 1,2 mL/min; volume de injeção 10,0 µL; detecção 350,0 nm, temperatura: 40° C.

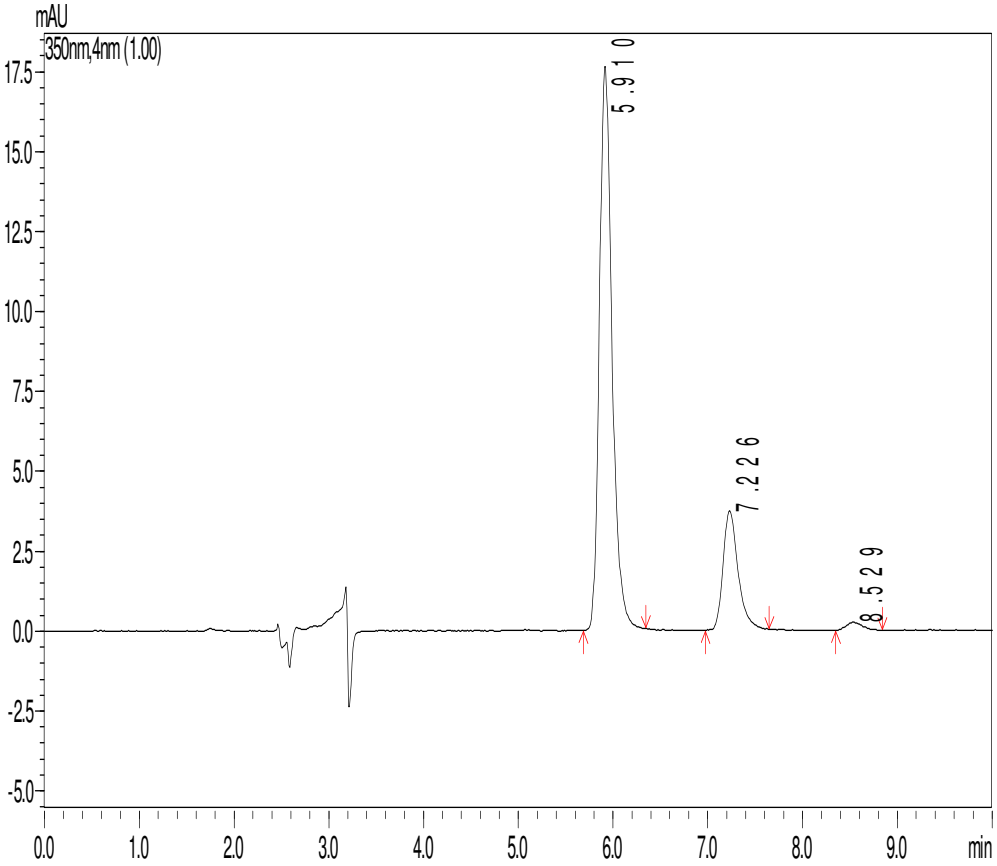
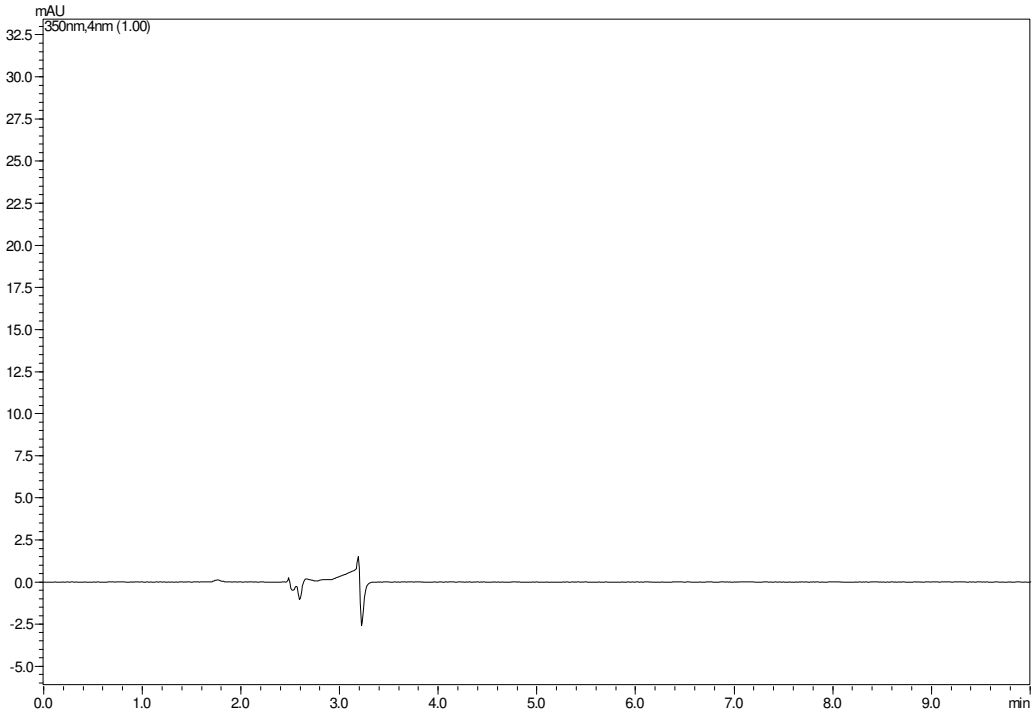


Figura 26. Cromatograma referente a amostra de nanopartícula sem adição do flavonoide. Condições cromatográficas: Coluna Shimadzu® de fase reversa C-18 4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5,0 µm; fase móvel solução aquosa de ácido fórmico 0,3%: acetonitrila (80:20), vazão: 1,2 mL/min; volume de injeção 10,0 µL; detecção 350,0 nm, temperatura: 40° C



5.7.5 Precisão

As **Tabelas 12** e **13** apresentam, respectivamente, os cálculos da precisão intra e interdias, como desvio padrão relativo (DPR, %), para três concentrações distintas (25,0; 50,0 e 75,0 µg/mL) do flavonoide rutina padrão de referência primário. Os valores de desvio padrão obtidos foram inferiores a 5,0%, para o ensaio intra e interdias. Por conseguinte, o método desenvolvido está em consonância com a normativa brasileira (BRASIL, 2003).

Tabela 12. Precisão intradia das soluções de rutina padrão de referência primário (T=97,1%)

Concentração teórica de rutina padrão de referência primário (μg/mL)	Concentração Experimental				
	C_1	C_2	C_3	$C_{Média}$ ± dp	DPR(%)
25,0	24,9	24,6	24,8	24,8 ± 0,09	0,36
50,0	49,7	49,8	49,6	49,7 ± 0,06	0,11
75,0	73,3	73,9	74,2	73,8 ± 0,35	0,48

Legenda. Concentrações teóricas: concentração teórica das diluições do flavonoide rutina (μg/mL); C1 a C3: réplicas das concentrações calculadas (μg/mL) a partir dos resultados experimentais; Cmédia + dp: média + desvio padrão das concentrações calculadas do flavonoide rutina (μg/mL); DPR (%): precisão calculada como desvio padrão relativo (%). As concentrações calculadas do flavonoide rutina (μg/mL) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação Área do pico = +10509 (Concentração de rutina μg/mL) – 12891

Tabela 13. Precisão interdia das soluções de rutina padrão de referência primário (T=97,1%)

Concentração teórica de rutina padrão de referência primário (μg/mL)	Concentração Experimental							
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	$C_{Média}$ ± dp	DPR (%)
25,0	24,9	24,6	24,8	26,0	25,9	26,0	25,4 ± 0,7	2,6
50,0	49,7	49,8	49,6	46,2	46,4	46,2	48,0 ± 1,9	3,9
75,0	73,3	73,9	74,2	73,5	74,1	73,5	73,7 ± 0,4	0,5

Legenda. Concentrações teóricas: concentração teórica das diluições do flavonoide rutina (μg/mL); C1 a C6: réplicas das concentrações calculadas (μg/mL) a partir dos resultados experimentais; Cmédia + dp: média + desvio padrão das concentrações calculadas do flavonoide rutina (μg/mL); DPR (%): precisão calculada como desvio padrão relativo (%). As concentrações calculadas do flavonoide rutina (μg/mL) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação Área do pico = +10509 (Concentração de rutina μg/mL) – 12891

5.7.6 Exatidão

As **Tabelas 14** e **15** apresentam, respectivamente, os cálculos da exatidão intra e interdias, a partir do ensaio de recuperação do padrão. Observou-se boa dispersão nos resultados, obtendo-se valores entre 95 e 105% para recuperação do flavonoide rutina, nos ensaios intra e interdias. Com base nos resultados, afirma-se que o método pode ser aplicado no ensaio de eficiência de associação de rutina nas nanopartículas de gelatina (BRASIL, 2003).

Tabela 14. Exatidão intradia a partir do ensaio de recuperação do padrão de referência primário (T=97,1%) na presença da preparação de nanopartículas de gelatina sem adição de rutina

Concentração teórica de rutina padrão de referência primário (μg/mL)	**Concentração Experimental**				
	C_1	**C_2**	**C_3**	**$C_{Média}$± dp**	**E (%)**
18,75	18,0	17,9	17,9	17,9 ± 0,03	95,7
37,5	37,2	37,3	37,2	37,2 ± 0,07	99,3
56,25	58,8	58,9	58,8	58,8 ± 0,04	104,6

Legenda: Concentrações teóricas: concentração teórica das diluições do flavonoide rutina (μg/mL); C1 a C3: réplicas das concentrações calculadas (μg/mL) a partir dos resultados experimentais; Cmédia + dp: média + desvio padrão das concentrações calculadas do flavonoide rutina (μg/mL); partir dos resultados experimentais; E (%): exatidão (%). As concentrações calculadas do flavonoide rutina (μg/mL) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação Área do pico = +10509 (Concentração de rutina μg/mL) – 12891

Tabela 15. Exatidão interdia a partir do ensaio de recuperação do padrão de referência primário (T=97,1%) na presença da preparação de nanopartículas de gelatina sem adição de rutina

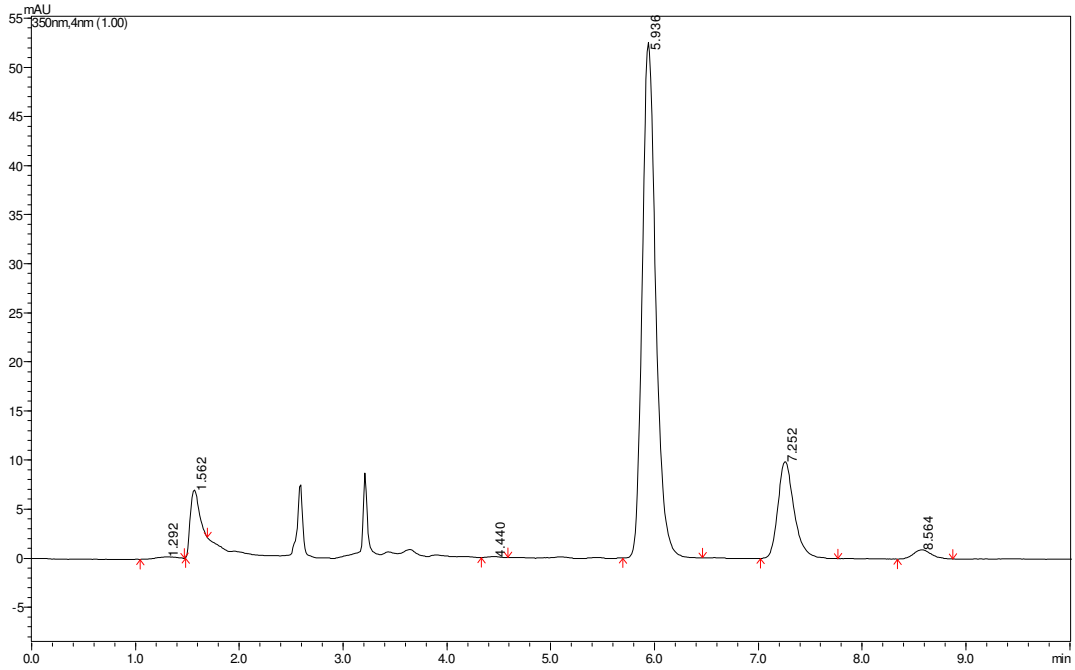
Concentração teórica de rutina padrão de referência primário (μg/mL)	Concentração Experimental							
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	$C_{Média}$ ± dp	E(%)
18,75	18,0	17,9	17,9	18,7	18,7	18,6	18,3 ± 0,4	97,6
37,5	37,2	37,3	37,2	35,7	35,8	35,8	36,5 ± 0,8	97,4
56,25	58,8	58,9	58,8	56,2	56,5	56,4	57,6 ± 1,3	102,4

Legenda. Concentrações teóricas: concentração teórica das diluições do flavonoide rutina (μg/mL); C1 a C6: réplicas das concentrações calculadas (μg/mL) a partir dos resultados experimentais; Cmédia + dp: média + desvio padrão das concentrações calculadas do flavonoide rutina (μg/mL); partir dos resultados experimentais; E (%): exatidão (%). As concentrações calculadas do flavonoide rutina (μg/mL) tiveram seus valores obtidos empregando-se a equação Área do pico = +10509 (Concentração de rutina μg/mL) – 12891

5.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DO FLAVONOIDE

A **Figura 27** ilustra o cromatograma referente à quantificação de rutina total após digestão enzimática. O resultado obtido foi **6,06 mg/mL** e tal valor foi utilizado para o cálculo da eficiência de associação do flavonoide ao sistema nanoestruturado, por meio da **Equação 5**. Tal valor difere da concentração teórica de rutina, **6,5 mg/mL**. Entretanto, atribui-se a diferença de cerca de 7,0%, a perdas durante o processo de obtenção das nanopartículas (NAHAR *et al*., 2008).

Figura 27. Cromatrograma referente à quantificação de rutina total. Condições cromatográficas: Coluna Shimadzu® de fase reversa C-18 4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5,0 µm; fase móvel solução aquosa de ácido fórmico 0,3%: acetonitrila (80:20), vazão: 1,2mL/min; volume de injeção 10,0 µL; detecção 350,0 nm, temperatura: 40° C.



5.9 TAXA/EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DO FLAVONOIDE NAS NANOPARTÍCULAS

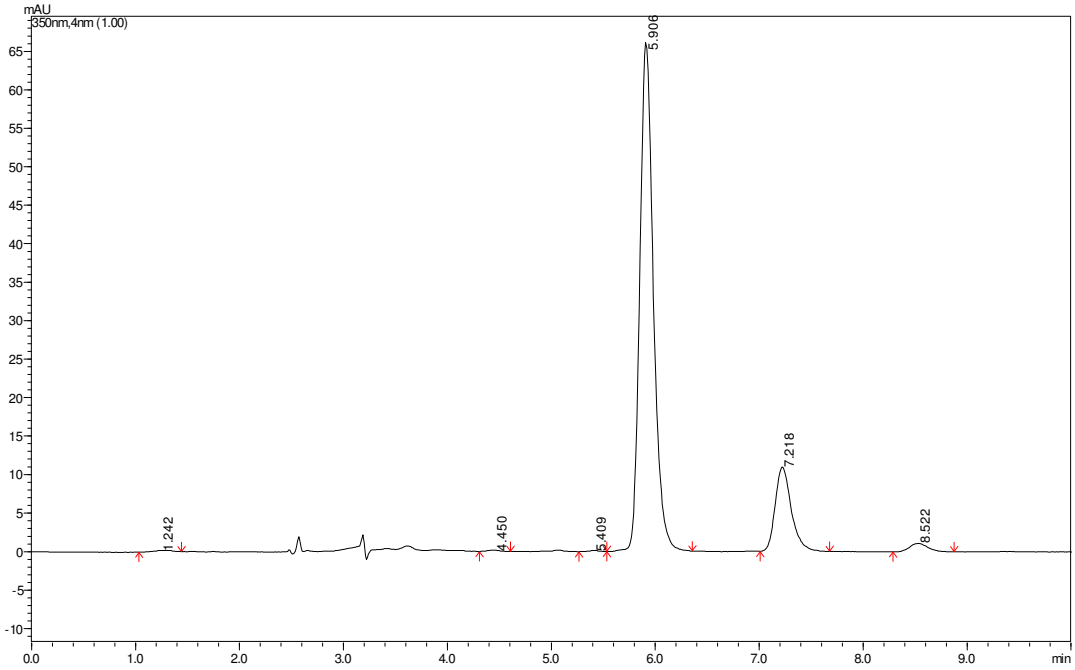
A **Tabela 16** descreve os dados experimentais referentes à concentração de rutina livre (não associada ao sistema nanoparticulado). A **Figura 28** refere-se ao cromatograma obtido no ensaio de quantificação de rutina livre. Os resultados foram utilizados para o cálculo da eficiência de associação do flavonoide ao sistema nanoparticulado, conforme a **Equação 5**.

Tabela 16. Eficiência de associação do flavonoide rutina ao sistema nanoparticulado de gelatina

Preparações Analisadas	C_1	C_2	C_3	$C_{média}$±dp	EA(%)	$EA_{média}$ ± dp (%)
R-NC- Lote 1	60,3	60,6	60,8	60,6 ±0,3	50,0	**51,8 ± 1,4**
R-NC -Lote 2	58,7	58,8	58,4	58,6 ± 0,2	51,6	
R-NC - Lote 3	58,3	57,9	58,4	58,2 ± 0,3	52,0	
R- NC- Lote 4	56,2	56,8	56,3	56,4 ± 0,3	53,4	

Legenda. R-NC: nanopartícula de rutina; C1 a C3: réplicas das concentrações calculadas (µg/mL) a partir dos resultados experimentais; Cmédia + dp: média + desvio padrão das concentrações calculadas do flavonóide rutina (µg/mL). EA (%): eficiência de associação do flavonoide ao sistema nanoparticulado de gelatina; EAmédia + dp (%): média + desvio padrão da eficiência de associação do flavonoide ao sistema nanoparticulado de gelatina.

Figura 28. Cromatrograma referente à quantificação de rutina livre. Condições cromatográficas: Coluna Shimadzu® de fase reversa C-18 4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5,0 µm; fase móvel solução aquosa de ácido fórmico 0,3%: acetonitrila (80:20), vazão: 1,2mL/min; volume de injeção 10,0 µL; detecção 350,0 nm, temperatura: 40° C.



A eficiência de associação média do flavonoide rutina descrita no presente trabalho foi de **51,8 ± 1,4 %** e difere dos valores encontrados na literatura. Nahar e colaboradores, 2008, utilizaram a técnica de dessolvatação em duas etapas para a obtenção de nanopartículas carreadoras de anfotericina B, utilizando a gelatina tipo B. O referido grupo obteve valores de eficiência de associação média, por CLAE, que variaram entre **17,9 ± 0,8** e **24,4 ± 1,9%**, após realizar a alteração de vários parâmetros, como temperatura, concentração do agente de reticulação e valor de pH durante a obtenção das nanopartículas.

O mecanismo de associação da rutina as nanopartículas pode ser explicado tendo em vista a localização preferencial do flavonoide no exterior da partícula, que é mais hidrofílico. O interior, contrariamente, apresenta perfil menos hidrofílico, em função da etapa de dessolvatação, que reduz seu

conteúdo hídrico. Contudo, as etapas anteriores de caracterização, principalmente a microscopia confocal de fluorescência, indicaram a presença da rutina na superfície e, também, no interior da partícula (ELZOGHBY, 2013; NAHAR *et al*., 2008).

O índice elevado de eficiência de associação do flavonoide rutina encontrado no presente trabalho foi corroborado pela capacidade dos polifenóis reagirem, sob condições oxidantes, com grupos amino da cadeia lateral de proteinas, desenvolvendo reação de reticulação (STRAUSS & GIBSON, 2004). Tal fato explica a vantagem da obtenção das nanopartículas de gelatina contendo rutina em meio alcalino em detrimento do meio ácido. Elevados valores de pH são favoráveis para a solubilização do flavonoide, bem como, contribuem na reação de reticulação do flavonoide e do glutaraldeído com a gelatina (HERMANSON, 2008).

Estima-se entretanto, que os valores de eficiência de associação alcançados poderiam ser otimizados pela redução do diâmetro médio das partículas. Quanto menor o tamanho da partícula, maior a relação superfície volume, por conseguinte, maior a área para adsorção da rutina no exterior das nanoestruturas. Ressalta-se entretanto que, o tamanho de partícula obtido para amostra **R-NC** apresentou-se ideal para a aplicação proposta, tendo em vista os aspectos de eficácia e principalmente, segurança de produtos cosméticos (ELZOGHBY, 2013; NAHAR *et al*., 2008; ZHAI, 2013).

5.10 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS

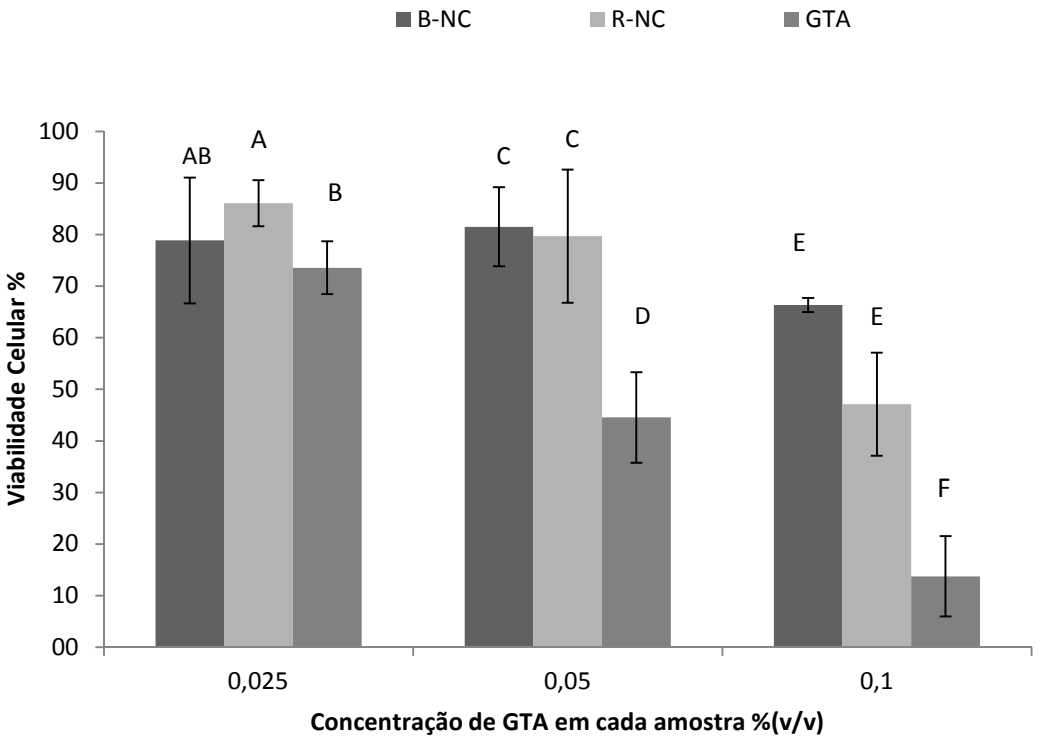
Segundo levantamento realizado pela ANVISA em 2014, cerca de 94% dos produtos registrados, que fazem menção ao uso de nanotecnologia, são produtos cosméticos. Por representar tema ainda na fronteira da ciência, os aspectos regulatórios acerca da nanotecnologia são debatidos de maneira intensa e gradativa à medida que novas informações sobre nanomateriais e seus impactos sobre a saúde dos usuários são apresentados à comunidade científica (BRASIL, 2014).

Tendo em vista o panorama que comtempla a crescente presença de nanotecnologia em produtos cosméticos e de higiene pessoal, a agência regulatória americana, FDA, publicou em 2014, um guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos contendo nanomateriais. Dentre os parâmetros a serem avaliados elencados pela agência, detacam-se os ensaios de citotoxicidade (UNITED STATES, 2014).

Metodolgias *in vitro* simples e reprodutíveis são desejáveis para estimar-se o potencial de irritação cutânea de novos ingredientes cosméticos. As culturas *in vitro* de monocamadas de queratinócitos epidérmicos ou fibroblastos dérmicos primários tem sido utilizadas, com sucesso, em frequentes estudos de avaliação do perfil de irritação cutânea (LEE *et al*., 2000; WILHELM; BOTTJER; SIEGERS, 2001).

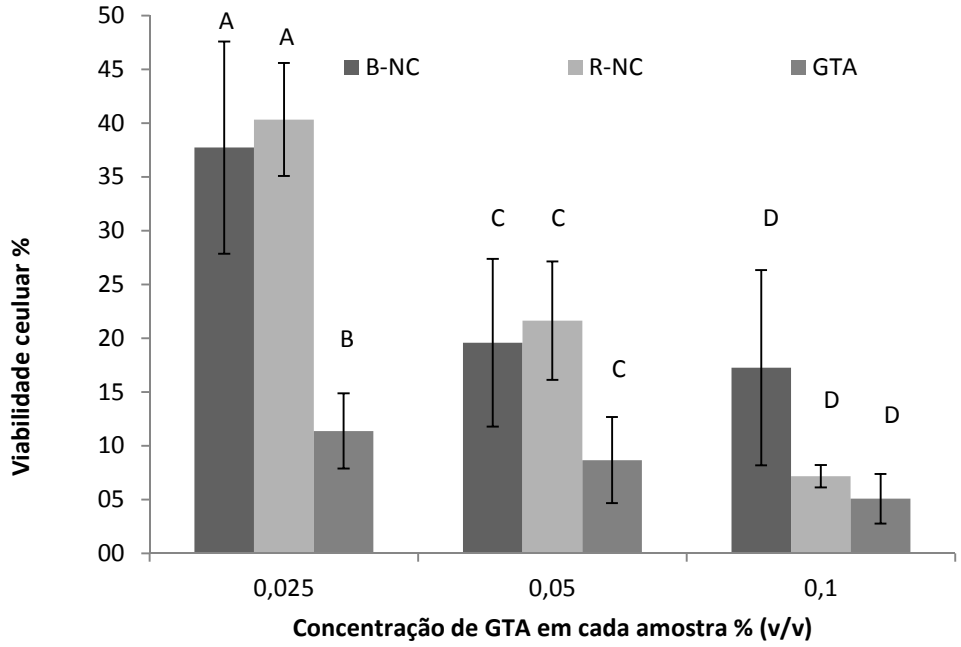
Os resultados dos ensaios de citotoxicidade dos sistemas nanoparticulados em linhagem de células HaCaT de queratinócitos imortalizadas indicaram que **B-NC** e **R-NC** reduziram a viabilidade da linhagem HaCaT de modo concentração-dependente. Houve decréscimo significativo da viabilidade celular quando **B-NC** e **R-NC** estavam a 40,0% (equivalente a 0,1% de glutaraldeído em sua composição), após 3 h contato, no entanto, entre as amostras, os resultados não foram estatisticamente distintos, como indicado na **Figura 29**. Após 24 horas de incubação o decréscimo da viabilidade celular tornou-se mais pronunciado e também demostrou perfil concentração dependente (**Figura 30**).

Figura 29. Perfil da citotoxicidade de queratinócitos humanos *in vitro* após 3 horas de incubação. As concentrações apresentadas estão representadas em % equivalente de glutataldeído em sua composição



Legenda. B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula de rutina; GTA: glutaraldeído. Letras diferentes no mesmo grupo representam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$)

Figura 30. Perfil da citotoxicidade de queratinócitos humanos *in vitro* após 24 horas de incubação. As concentrações apresentadas estão representadas em % equivalente de glutataldeído em sua composição



Legenda. B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula de rutina; GTA: glutaraldeído. Letras diferentes no mesmo grupo representam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$)

A incubação da linhagem HaCaT durante 3 horas demonstrou manutenção da viabilidade celular superior. Independentemente do tempo de contato e da concentração, o glutaraldeído promoveu redução significativa da viabilidade das células, no entanto, quando reticulado às nanoestruturas, constatou-se redução da sua citotoxicidade. Ressalta-se que, segundo as prerrogativas da legislação brasileira, o GTA é permitido para uso em preparações cosméticas na qualidade de conservante, assim, foi permitido assumir que as amostras **B-NC** e **R-NC** apresentaram propriedades citotóxicas compatíveis para emprego em produtos cosméticos (BRASIL, 2012d).

Apesar do potencial de irritação cutânea descrito para o glutaraldeído, é sabido que seus efeitos irritantes manifestam-se em um perfil concentração dependente. Em concentração igual ou inferior a 0,1% não é relatada a presença de reações inflamatórias *in vivo* (BALLANTYNE; JORDAN, 2001).

Adicionalmente, além da correlação entre o potencial irritante e redução da viabilidade celular, existem outros fatores importantes que devem ser estudados *in vivo* para avaliações de segurança. Oliveira e colaboradores (no prelo) concluíram que ambas as nanopartículas **B-NC** e **R-NC** apresentaram bom desempenho nos ensaios de compatibilidade cutânea *in vivo*. Após 24 horas de contato com a pele dos participantes da pesquisa, nenhum eritema foi detectado, de acordo com o controle negativo. Ademais, tanto **B-NC** quanto **R-NC** não influenciaram nos parâmetros de hidratação da pele. Por conseguinte, os autores concluíram que **R-NC** e **B-NC** não interferiram na função barreira do estrato córneo, bem como, não causaram reações inflamatórias nos indivíduos estudados (OLIVEIRA *et al*.,no prelo).

5.11 AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO/PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

A função primária da pele é proteger o corpo da perda de água e possível penetração de micro-organismos, substâncias potencialmente tóxicas, alergênicas e irritantes. A pele humana é composta de três camadas principais: a epiderme (não vascularizada), derme (altamente vascularizada) e o tecido subcutâneo. A derme é adjacente à epiderme e garante suporte mecânico à pele. A epiderme viável é formada pela camada basal, espinhosa e granulosa, além de ser responsável pela formação da camada córnea. A epiderme é dinâmica e encontra-se em constante renovação e diferenciação celular, a esse processo dá-se o nome de queratinização. A camada córnea ou estrato córneo (EC) representa a maior barreira para a permeação de compostos ativos presentes em preparações cosméticas e/ou farmacêuticas. O EC é composto por uma fusão compacta de células queratinizadas circundadas por uma matriz lipídica extracelular, dispostos a maneira de “tijolos e argamassa”. Os “tijolos” são compostos pelos queratinócitos e a “argamassa” pelo conteúdo expelido dos grânulos lamelares, incluindo lipídeos e proteínas. A excepcional composição lipídica do EC o diferencia de qualquer membrana biológica e o caracteriza como uma excelente barreira contra compostos hidrófilos, ao passo que a epiderme viável é mais resistente aos compostos altamente lipofílicos(BABY, 2007; NATARAJAN *et al*., 2014; WATKINSON *et al*., 2013).

Pelo exposto, os termos penetração, permeação e absorção cutânea, possuem diferenças conceituais, sendo:

i. Penetração: passagem de substâncias ativas somente através do estrato córneo,
ii. Permeação: passagem de substâncias ativas através da epiderme, atingindo a epiderme viável ou a derme,
iii. Absorção: processo pelo qual o ingrediente atinge a corrente circulatória através da via cutânea(BABY, 2007; BRASIL, 2012c).

A penetração de nanopartículas intactas através da pele humana é um tema controverso, que tem atraído muito interesse, tanto da indústria farmacêutica como da indústria cosméstica e de produtos de higiene. As possíveis implicações e riscos da exposição cutânea aos nanomateriais são extensamente debatidos e, continuamente, novos dados são apresentados para a apreciação da comunidade científica e órgãos reguladores. Guias para avaliação de segurança de produtos cosméticos recomendam, por conseguinte, a realização do ensaio de avaliação da permeação cutânea *in vitro* como ferramenta preditiva do impacto do nanomaterial sobre a saúde dos usuários (BRASIL, 2012c; UNITED STATES, 2014; WATKINSON *et al*., 2013).

As nanoparticulas apresentam diferentes mecanismos para permeação cutânea, a saber, a via intercelular, a via transcelular e através de folículos pilosos (PROW *et al*., 2011; VOGT *et al*., 2006). Watkinson e colabores (2013) concluíram, por meio de um modelo teórico, que nanopartículas não permeiam a pele por difusão passiva. Segundo os autores, nanopartículas lipídicas sólidas e lipossomas, por exemplo, aumentam o perfil de permeação cutânea de determinados ativos por formar uma camada oclusiva na pele, aumentando sua hidratação.

Diversos nanocarreadores foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a permeação cutânea e fotoestabilidade da rutina. Das e Kalita (2014) desenvolveram fitossomas de rutina e observaram um perfil de permeação quase três vezes superior ao do fármaco isolado. Park e colaboradores (2014) obtiveram etossomas de rutina e concluíram que as formulações nanoestrutudas com 0,03% de rutina melhoraram a penetração do flavonoide na pele. Entretanto, ambos os estudos elencados utilizaram como

membrana biológica para o estudo de permeação a pele de rato, que é três a cinco mais permeável que a pele humana. Por conseguinte, recomenda-se a utilização da pele humana ou de porco para os ensaios de permeação cutânea, envolvendo produtos cosméticos (BARTOSOVA; BAJGAR, 2012; BRASIL, 2012c; UNITED STATES, 2014).

O ensaio de permeação cutânea das nanopartículas de rutina indicou que a nanoencapsulação do ativo não influenciou sua permeação. Após 24 horas, 1,1 ± 0,09 mg (recuperação: 106,0 ± 8,5%) e 1,3 ± 0,08 mg (recuperação: 114,5 ± 6,9%) do flavonoide foram quantificados no compartimento doador das nanopartículas de rutina e da solução de rutina respectivamente. Adicionalmente, não foi possível realizar a quantificação do flavonoide com precisão e exatidão adequados no estrato córneo, epiderme viável e derme e finalmente, no compartimento receptor (BRASIL, 2003).

Para princípios ativos exercerem sua atividade biológica, eles devem atingir o local de ação em concentrações suficientes para sua atuação. Portanto, a rutina, composto bioativo de estabilidade adequada (BABY *et al*., 2007), quando veiculada nas diversas formas cosméticas, deve ser passível de estar disponível na superfície cutânea, seu tecido alvo para exercer satisfatoriamente seus efeitos protetores frente à radiação UV (OLIVEIRA et al., 2015).

O alto peso molecular da rutina (610 Da), bem como sua baixa lipofilicidade podem explicar a tendência das nanopartículas de rutina permanecerem na superfície da pele. Sabe-se que, em geral, substâncias com peso molecular acima de 500,0 Da não penetram a pele. A lipofilia de substâncias ativas, como por exemplo aquelas submetidas aos ensaios de difusão, pode ser expressa como coeficiente de partição, uma constante de equilíbrio que correlaciona o modo no qual um soluto partilha entre ambientes apolares e polares. A substância ativa penetrante deve apresentar coeficiente de partição entre 1 e 3. Entretanto, a rutina apresenta coeficiente de partição octanol/água (log *P*) igual a –0.64 ± 0.05 (BABY, 2007; BARTOSOVA; BAJGAR, 2012; ROTHWELL; DAY; MORGAN, 2005).

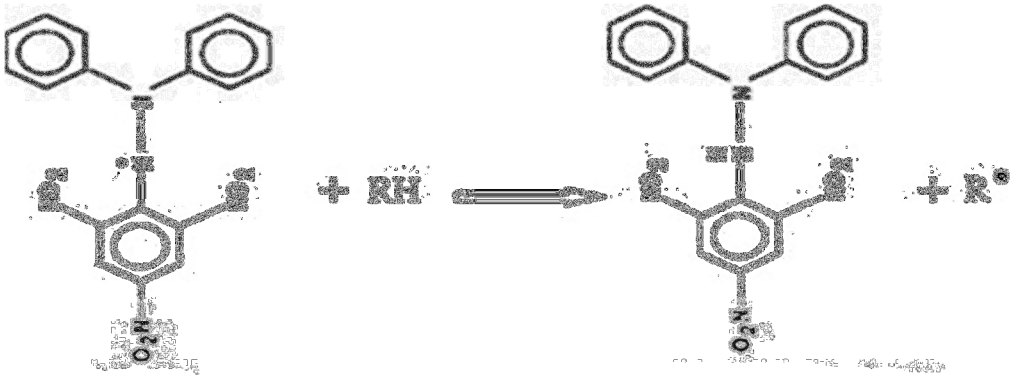
Demais fatores contribuem para permanência das nanopartículas na superfície da pele, tais como elevado diâmetro médio (442,8 ± 4,9) e sua carga

de superfície. A carga negativa das nanopartículas, por exemplo, reforça essa tendência, tendo em vista que o EC representa uma barreira para moléculas carregadas. Tal fato é um aspecto positivo para a aplicação das referidas nanoestruturas em preparações cosméticas, tendo em vista que o aspecto biodegradável da gelatina favorece a seguranças dos sistemas desenvolvidos (HONARY; ZAHIR, 2013; ROTHWELL; DAY; MORGAN, 2005).

5.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR E FOTOESTABILIDADE FUNCIONAL DAS NANOPARTÍCULAS

O DPPH• é um radical livre estável que possui um elétron desemparelhado em um átomo da ligação de hidrogênio. Na sua forma oxidada, em solução, possui absorbância máxima no intervalo de 515,0 a 520,0 nm. Quando a solução do DPPH é misturada com substância capaz de doar um átomo de hidrogênio (**Figura 31**), sofre redução, com a perda da cor violeta. O fundamento do ensaio antirradicalar com DPPH• é a inibição dessa espécie reativa estável (MARUNO, 2009; MOLYNEUX, 2004).

Figura 31. Representação molecular da reação de redução do DPPH•



A literatura faz referência à interferência de parâmetros como valor de pH e o solvente na resposta obtida. Quanto ao solvente a ser utilizado, o método parece funcionar igualmente bem com metanol ou etanol, dos quais nenhum parece interferir com a reação. A utilização de outros sistemas de

solventes, tais como água ou acetona, parece interferir nos valores IR_{50}. Em relação ao valor de pH, sugere-se que o valor seja mantido entre 5,0 e 7,0, pois a alteração desse pode promover decaimento dos valores de abosorbância do radical livre a 517,0 nm (MOLYNEUX, 2004; OZCELIK; LEE; MIN, 2003)

A literatura indica a rutina, flavonoide com notória atividade antioxidante, como responsável pela prevenção dos danos induzidos pela radiação UV prolongada para uma grande variedade de plantas. A absorção da radiação UV evita a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente dano direto ao DNA. A rutina age como sequestrador de radicais livres por três mecanismos bem estabelecidos: (1) a estrutura de *o*-dihidroxi no anel B que confere maior estabilidade a forma radical e participa deslocalização de elétrons; (2) a dupla ligação 2,3 em conjugação com a função 4-oxo no anel C responsável pela deslocalização de elétrons do anel B e, (3) a presença de hidroxilas na posição 7 e 5 do anel A conferem máximo potencial de sequestro de radicais livre para a molécula. O mecanismo fotoprotetor, associado ao caráter multifuncional do flavonoide o credenciaram como ingrediente em formulações cosméticas bioativas (ACKER *et al*., 1996; OLIVEIRA *et al*., 2015; ZVEZDANOVIC *et al*., 2012)

Zvezdanovic e colaboradores (2012) apresentaram os produtos de degradação da rutina, frente à radiação UVC. Seus resultados indicam que a escolha do solvente influencia a taxa de degradação da rutina. O metanol, ao contrário da água, demonstrou potencializar a fotodegradação do flavonoide, em função da alta solubilidade do oxigênio em meio metanólico, bem como a menor viscosidade do solvente em comparação com a água.

O objetivo do presente ensaio foi verificar a fotoestabilidade da rutina em função da associação do flavonoide a nanopartículas de gelatina. A **Tabela 17** apresenta os resultados da %SRL das amostras **RL** (solução metanol: água, 10:90, do flavonoide) e **R-NC** antes e após irradiação. Os resultados obtidos indicaram que não houve perda da atividade antioxidante de ambas as amostras após a irradiação nas condições experimentais realizadas. Tal fato corrobora a alta fotoestabilidade do flavonoide, amplamente descrita, bem como justifica sua utilização em formulações fotoprotetoras multifuncionais(OLIVEIRA *et al*., 2015; VELASCO *et al*., 2008b).

Tabela 17. Porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL) da rutina e das nanopartículas de gelatina antes e depois da irradiação

Amostras	%SRL antes da irradiação	%SRL depois da irradiação
RL	$22,9 \pm 4,2^{a}$	$20,0 \pm 1,5^{a}$
R-NC	$39,2 \pm 0,6^{b}$	$35,4 \pm 4,7^{b}$
B-NC	$12,3 \pm 0,6^{c}$	-

Legenda. B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula de rutina; RL: solução metanol: água (10:90) do flavonoide. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$)

Adicionalmente, observou-se que **R-NC** apresentou %SRL 74% superior a **RL** e que a amostra **B-NC,** nanopartícula sem adição do flavonoide, apresentou significativa atividade antirradicalar. Essa evidência justifica-se pela composição da gelatina, biopolímero associado ao flavonoide nas nanopartículas. A equência peptídica His-Gli-Pro-Leu-Gli-Pro-Leu (797 Da), presente na gelatina, é descrita como potente sequestradora de radicais livres e capaz de impedir a peroxidação lipídica. Por conseguinte, observa-se que a amostra **R-NC** apresenta a % SRL equivalente ao somatório das amostras **B-NC** e **RL**. O presente resultado indicou que a escolha do polímero potencializou as características multifuncionais da nanopartícula desenvolvida (ELZOGHBY, 2013; MENDIS; RAJAPAKSE; KIM, 2005).

5.13 PREPARO DAS FORMULAÇÕES DERMOCOSMÉTICAS

Na presente pesquisa, avaliou-se a associação das nanopartículas de gelatina, com o sistema de filtros químicos avobenzona, como filtro UVA, *p*-metoxicinamato de octila e octil dimetil PABA, como filtros UVB, em relação à eficácia funcional das formulações fotoprotetoras. Foram desenvolvidas três emulsões (**F1** a **F3**) do tipo óleo em água (O/A), macroscopicamente estáveis,

biocompatíveis, com viscosidade aparente e características organolépticas (aspecto, cor e odor) adequadas (BRASIL, 2004).

Tendo em vista a solubilidade limitada da rutina em veículos cosméticos não foi possível desenvolver uma amostra macroscopicamente estável, com a mesma concentração do flavonoide (0,24% p/p) presente nas formulações contendo a nanopartícula **R-NC**. Tal fato salienta a importância do desenvolvimentos das nanopartículas de gelatina contendo rutina, pois introduz a possibilidade da incorporação do flavonoide à formulações fotoprotetoras em concentrações superiores as descritas em estudos anteriores (OLIVEIRA *et al.*, 2015; PEDRIALI *et al*., 2011; PERES *et al*., no prelo; VELASCO *et al*., 2008b).

5.14 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE (APE)

Emulsões O/A são a forma cosmética mais popular para veiculação de fotoprotetores. Dentre os fenômenos de instabilidade de emulsões pode-se citar: *(1)* floculação, em que as gotículas se agregam em aglomerados frouxos, dentro da emulsão;*(2)* coalescência, larga distribuição de tamanho das gotículas, resultando na separação de fases de forma visível ao olho nu; *(3)* creaming , em que a fase dispersa, conforme sua densidade relativa, se desloca à superfície ou ao fundo da emulsão;*(4)* amadurecimento de Ostwald, em que as partículas maiores crescem de tamanho devido à dissolução das partículas menores (DEBUYS *et al*., 2000; FRANGE; GARCIA, 2009).

A estabilidade preliminar das emulsões fotoprotetoras foi verificada por meio dos testes de centrifugação e estresse térmico, utilizados para acelerar possíveis sinais de instabilidade inerentes aos sistemas emulsionados (BRASIL, 2004). A **Tabela 18** descreve os resultados para ambos os testes.

.

Tabela 18. Características organolépticas das formulações fotoprotetoras submetidas ao Estudo de Estabilidade Preliminar

Formulações	Composição (compostos ativos e nanopartícula)	Avaliação Preliminar da Estabilidade	
		Centrifugação	Estresse Térmico
F1	AVO +MCO +ODP	N	N
F2	AVO +MCO +ODP+ B-NC	N	N
F3	AVO +MCO +ODP+ R-NC	N	N

Legenda. AVO: Avobenzona; MCO: p-metoxicinamato de octila; ODP: octil dimetil PABA; B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula com rutina; N: normal; M: modificado.

As formulações desenvolvidas não apresentaram alterações após a APE, sendo, portanto, consideradas aprovadas para a realização do teste de estabilidade acelerada.

5.15 TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA (TEA)

As formulações desenvolvidas foram analisadas visualmente, 24 horas após o preparo e após o 12° dia do ciclo, em relação às características organolépticas (aspecto, cor e odor). Ademais, as características físicas e físico-químicas das preparações foram medidas, respectivamente, por meio da viscosidade aparente e valor de pH. As **Tabelas 19** e **20** apresentam os resultados obtidos para emulsões fotoprotetoras.

Tabela 19. Características organolépticas, físicas e físico-químicas dos fotoprotetores no T0 (24 horas após o preparo)

Formulações	Composição (compostos ativos e nanopartícula)	Aspecto	Características organolépticas	Valor de pH	Viscosidade aparente (cP)
F1	AVO +MCO +ODP		Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor característico	7,25 ± 0,01[a]	42080 ± 243[c]
F2	AVO +MCO +ODP+ B-NC		Emulsão homogênea, de coloração rósea e odor característico	7,20 ± 0,02[a]	39867 ± 153[d]
F3	AVO +MCO +ODP+ R-NC		Emulsão homogênea, de coloração amarela intensa e odor característico	7,27 ± 0,02[a]	31800 ± 100[e]

Legenda. AVO: Avobenzona; MCO: *p*-metoxicinamato de octila; ODP: octil dimetil PABA; B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula com rutina. Resultados de valor de pH e viscosidade aparente expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p<0,05$).

Tabela 20. Características organolépticas, físicas e físico-químicas dos fotoprotetores no T12 (ao final do ciclo)

Formulações	Composição (compostos ativos e nanopartícula)	Aspecto	Características organolépticas	Valor de pH	Viscosidade aparente (cP)
F1	AVO +MCO +ODP		Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor característico	7,32 ± 0,01[a]	43567 ± 1106[c]
F2	AVO +MCO +ODP+ B-NC		Emulsão homogênea, de coloração rósea e odor característico	7,27 ± 0,01[a]	59033 ± 115[d]
F3	AVO +MCO +ODP+ R-NC		Emulsão homogênea, de coloração amarela intensa e odor característico	7,30 ± 0,01[a]	30733 ± 874[e]

Legenda. AVO: Avobenzona; MCO: *p*-metoxicinamato de octila; ODP: octil dimetil PABA; B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula com rutina. Resultados de valor de pH e viscosidade aparente expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p<0,05$).

As emulsões se apresentaram estáveis, com aspecto homogêneo e odor característico da base autoemulsificante. Em relação à coloração, o aspecto amarelo da formulação **F1** foi atribuído ao sistema de filtros UV. Em contrapartida as formulações **F2** e **F3** apresentaram coloração compatível com a amostra de nanopartículas de gelatina que as compõe, **B-NC** e **R-NC,** respectivamente. Não foi observada alterações nas características organolépticas das formulações ao final do ciclo de 12 dias.

O valor de pH de uma formulação deve assegurar a estabilidade dos ingredientes, sua eficácia e segurança, assim como ser compatível com os fluidos biológicos de acordo com a via de administração pretendida. O valor de pH das preparações foi considerado adequado. Devido ao ajuste do valor de pH durante o preparo das formulações, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre amostras no T0 ou T12 (BRASIL, 2004; FRANGE; GARCIA, 2009).

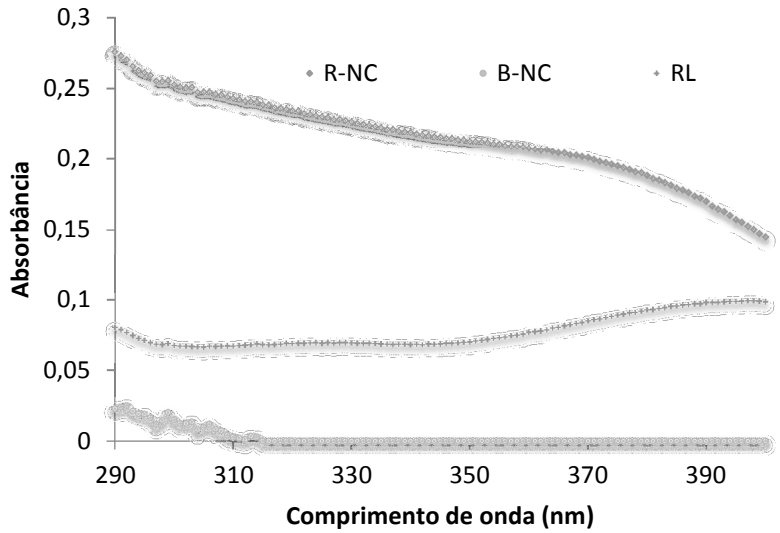
O valor de viscosidade aparente também apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as formulações, sendo considerado, em todos os casos, adequado para o uso proposto. Os valores obtidos para a formulação **F1** não sofreram alterações ao final do ciclo e foram atribuídos a base autoemulsionante (4,0% p/p), bem como a presença do polímero Pemulen® TR1 (0,1% p/p), capaz de elevar a viscosidade do sistema em concentrações reduzidas (BRASIL, 2004; PERES, 2015; SEPIC, 2011).

Os coloides hidrofílicos são frequentemente utilizados como auxiliares de emulsificação em emulsões O/A, pois aumentam a viscosidade da fase contínua, retardando a separação gravitacional da fase dispersa, promovendo, assim, a estabilidade. Observou-se, entretanto, nas formulações desenvolvidas que a adição das nanopartículas (**F2** e **F3**) reduziu a viscosidade aparente do sistema. Tal fato pode ser explicado pela reticulação das nanopartículas, que reduziu a afinidade do polímero com o meio aquoso. Ressalta-se ainda que, ao final do ciclo, a formulação **F2** sofreu aumento da viscosidade estatisticamente significativo ($p<0,05$). Contudo, esse perfil não foi percebido na formulação **F3,** indicando maior estabilidade da nanopartícula contendo rutina à variações bruscas de temperatura (FRANGE; GARCIA, 2009; PEÑA *et al.*, 2010).

5.16 ATIVIDADE FOTOPROTETORA *IN VITRO DAS NANOPARTÍCULAS*: FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) E AMPLO ESPECTRO

A espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração foi utilizada para a avaliação da eficácia *in vitro* frente à proteção UVA e UVB das amostras de nanopartículas (**B-NC** e **R-NC**). Uma solução aquosa (pH ~7,0) do flavoide em seu estado livre (6,0 mg/mL) foi preparada com o intuito de analisar comparativamente o desempenho da rutina livre em relação às preparações nanoparticuladas. A **Figura 32** apresenta o perfil espectral das amostras.

Figura 32. Perfil espectrofotométrico das amostras R-NC e RL, na mesma concentração do flavonoide (6,0mg/mL), e B-NC.



Legenda. B-NC: nanopartícula branca; R-NC: nanopartícula de rutina; RL: solução aquosa de rutina (pH 7,0).

Considerando o valor de FPS, as amostras não desenvolveram proteção anti-UVB. Apenas as amostras **RL** e **R-NC** apresentaram perfil espectral de importância para a fotoproteção, tendo em vista os valores de absorbância obtidos no UV. A amostra **B-NC** apresentou valores de absorbância próximos à

zero (**Figura 32**), dessa forma, seus resultados de comprimento de onda crítico e a razão UVA/UVB não foram analisados.

Os valores da razão UVA/UVB das amostras **RL** e **R-NC**, foram 1,15 ± 0,03 e 0,78 ± 0,04, respectivamente, e apresentaram diferença estatística ($p<0,05$). As nanopartículas de rutina exibiram perfil distinto do flavonoide livre, pois apresentaram valores de absorbância superiores na região da radiação UVB. Destaca-se, adicionalmente, que a nanopartícula de gelatina contendo rutina apresentou perfil de absorbância no UV superior ao flavonoide no estado livre.

O comprimento de onda crítico é o comprimento de onda para o qual a área sob a curva integrada de densidade ótica que começa em 290,0 nm é igual a 90% da área integrada entre 290,0 e 400,0 nm. Os protetores solares devem ter comprimento de onda crítico mínimo de 370,0 nm. Sobre esse parâmetro, os valores obtidos demonstraram que não houve diferença estatística entre **R-NC** ($\boldsymbol{\lambda_c}$ = 386,0) e **RL** ($\boldsymbol{\lambda_c}$ = 391,0). Ambas as preparações apresentaram valores de comprimento de onda crítico desejáveis para substâncias de amplo espectro. O flavonoide, em seu estado livre, apresentou desempenho superior, o que corroborou o caráter UVA do composto, apresentado na **Figura 32**, e já evidenciado por Velasco e colaboradores (2008a) (BRASIL, 2012a; VELASCO *et al*., 2008b).

Flavonoides possuem potencial fotoprotetor em função de sua capacidade de absorver a radiação UV, bem como, atuar como antioxidantes e anti-inflamatórios. Tais características os tornam adjuvantes interessantes para o desenvolvimento de protetores solares multifuncionais. Os resultados obtidos indicaram que as nanopartículas de gelatina contendo rutina, possuíram perfil fotoprotetor superior ao flavoide no estado livre. As nanopartículas apresentaram tamanho reduzido e, por conseguinte, podem aumentar a aderência da sustância ativa ao estrato córneo, formando um filme homogêneo. Somou- se, ainda, o fato dos sistemas particulados possuírem atividade antioxidante superior ao flavonoide no estado livre, tendo em vista o perfil antirradicalar apresentado pela gelatina (BECK; GUTERRES; POHLMANN, 2011; MENDIS; RAJAPAKSE; KIM, 2005; SAEWAN; JIMTAISONG, 2013).

O perfil adjuvante das nanopartículas na fotoproteção as credenciaram como ingredientes cosméticos, e foram, dessa forma, associadas ao sistema de filtros químicos avobenzona, como filtro UVA, *p*-metoxicinamato de octila e octil dimetil PABA, como filtros UVB. As formulações preparadas foram submetidas a avaliação da atividade fotoprotetora e fotoestabilidade *in vitro* e, os resultados, são apresentados a seguir.

5.17 AVALIAÇÃO *IN VITRO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA E* DA FOTOESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS

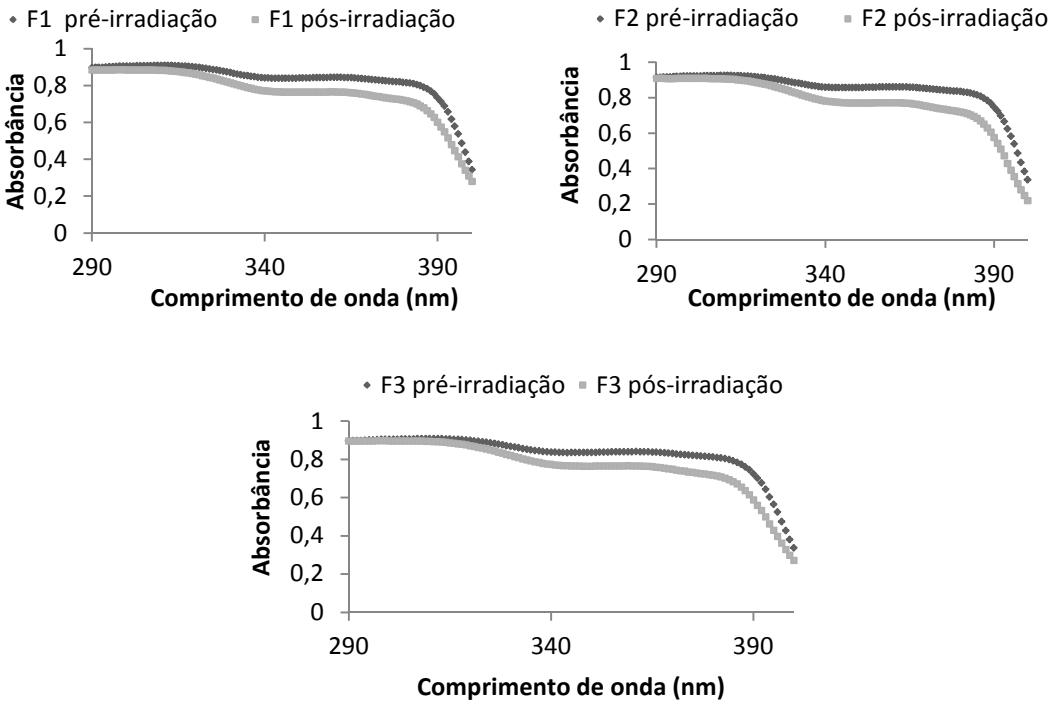
Avobenzona, *p*-metoxicinamato de octila e o octil dimetil PABA foram os filtros solares selecionados com o objetivo de desenvolver um fotoprotetor de amplo espectro e com perfil fotoinstável. Os resultados de FPS e comprimento de onda crítico das formulações, antes e após irradiação, são apresentados na **Tabela 21**, enquanto a **Figura 33** ilustra as curvas de absorbância das referidas amostras.

Tabela 21. FPS e comprimento de onda crítico das formulações antes e após irradiação

Formulações	FPS		Comprimento de onda crítico (λc)	
	Pré-irradiação	Pós-irradiação	Pré-irradiação	Pós-irradiação
F1	$17,0 \pm 1,0^{a}$	$12,0 \pm 1,0^{b}$	382^{d}	$378,7 \pm 0,6^{e}$
F2	$19,0 \pm 1,7^{a}$	$12,0 \pm 2,0^{b}$	382^{d}	$379,3 \pm 0,6^{e,f}$
F3	$25,3 \pm 1,5^{c}$	$15,7 \pm 1,5^{a,b}$	382^{d}	380^{f}

Legenda. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p<0,05$)

Figura 33. Perfil espectrofotométrico das amostras das formulações fotoprotetoras.



Todas as formulações foram consideradas de amplo espectro, pois apresentaram valor de FPS acima de 15 e comprimento de onda crítico acima de 370,0 nm. Os resultados obtidos indicaram que somente a presença da nanopartícula de gelatina contendo rutina proporcionou aumento estatisticamente significativo no valor de FPS *in vitro* (48%). Em relação ao comprimento de onda crítico, todas as formulações apresentaram o mesmo valor (λ_c =382,0), provavelmente, referente ao perfil espectral da avobenzona (OLIVEIRA *et al*., 2015).

Após a irradiação, as formulações apresentaram redução do valor de FPS e comprimento de onda crítico. Em relação ao valor de FPS, a formulação **F3** apresentou maior redução (40,0%), seguida pela amostra **F2** (36,0%) e **F1** (30,0%). Em contrapartida, a formulação **F3**, apresentou o comprimento de onda crítico mais elevado (λ_c = 380,0), após a irradiação.

O efeito sinérgico da associação da rutina com filtros químicos está intimamente relacionada à classe química do composto. Oliveira e colaboradores (2015), relataram aumento de 54,0% no valor da atividade

fotoprotetora *in vitro* da associação da rutina (0,1% p/p) com a benzofenona-3 (6,0% p/p). Em contrapartida, Peres e colaboradores (no prelo) não observaram elevação no valor de FPS após a interação do flavonoide (0,1% p/p), com os filtros UVB, *p*-metoxicinamato de octila, octil dimetil PABA e octocrileno (octocrylene), isoladamente em concentrações variadas.

Filtros orgânicos, como avobenzona, *p*-metoxicinamato de octila e octil dimetil PABA, absorvem a radição UV quando aplicados sobre a pele. Esse mecanismo torna-os susceptíveis à fotodegradação e geração de radicais livres. Uma estratégia para contornar esse perfil é a associação de filtros orgânicos à fotoestabilizadores naturais. Pinto (2014) demonstrou que concentrações aumentadas de rutina associada aos filtros avobenzona e *p*-metoxicinamato de octila não promoveu impacto sobre o FPS, porém apresentou influência na fotoestabilização dos compostos (KOCKLER *et al*., 2012; PERES *et al*., no prelo; SCALIA; MEZZENA, 2010).

Pelo exposto, as nanopartículas de gelatina contendo rutina apresentam perfil fotoprotetor *in vitro* distinto do flavonoide isolado. No presente estudo, foi possível demostrar que a incorporação da rutina em uma nanoestrutura ressaltou o perfil UVB do flavoinoide. Essa tendência pode ser confirmada pelo aumento do FPS quando **R-NC** foi associada ao sistema de filtros UV. O aumento de 48% do FPS (**Tabela 21**) indicou efeito sinérgico da associação de **R-NC** e dos filtros químicos. Tal fato pode ser atribuído ao aumento da relação superfície/volume e, consecutivamente, da superfície de contato entre os filtros e o flavonoide, presente no sistema nanoestruturado. Entretanto, o ensaio de fotoestabildiade indicou que **R-NC** não foi capaz de reduzir a isomerização da *p*-metoxicinamato de octila e, também, agir como supressor do estado singleto excitado da avobenzona, tendo em vista a decréscimo de 40% do valor de FPS da formulação **F3** (KOCKLER *et al*., 2012; PINTO, 2014).

Adicionalmente, os parâmetros UVA não foram afetados pela adição de **R-NC** tendo em vista a capacidade do composto biativo de absorver a radiação na região do espectro UVA (λmax 375-380 nm). O comprimento de onda crítico foi compatível com o perfil UV da associação de filtros químicos. Todavia, após a irradiação, a formulação **F3** conservou maior comprimento de onda crítico,

fator que contribui para manutenção do perfil amplo espectro da formulação (OLIVEIRA *et al*., 2015; VELASCO *et al*., 2008b).

5.18 ENSAIOS DE SEGURANÇA DAS FORMULAÇÕES

Como anteriormente descrito, o perfil biocompatível *in vitro* das nanopartículas desenvolvidas foi constatado por meio da avaliação da citotoxicidade penetração/permeação cutânea. Por conseguinte, previamente à sua aplicação nos participantes do estudo, a segurança *in vivo* das formulações fotoprotetoras desenvolvidas foi avaliada por meio dos testes clínicos de irritação cutânea primária e acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação cutânea e fotossensibilização dérmica, além da avaliação microbiológica das amostras

As emulsões foram avaliadas microbiologicamente, posteriormente à inativação de seu sistema conservante com polissorbato 80, pelo método de semeadura em superfície descrito na Farmacopeia Brasileira(BRASIL, 2010). Os resultados são apresentados na **Tabela 22** e asseguraram que as amostras encontraram-se dentro dos limites microbiológicos adequados, garantindo a segurança dos participantes durante a execução dos ensaios clínicos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COSMETOLOGIA, 2014; BRASIL, 2010).

Tabela 22. Avaliação microbiológica das formulações em estudo

Análise microbiológica	Especificação para semissólidos	Formulação F1	Formulação F2	Formulação F3
Contagem total de bactérias aeróbias	< 100 UFC / g	N.D.	N.D.	N.D.
Contagem total de fungos e leveduras	< 10 UFC / g	N.D.	N.D.	N.D.
Staphylococcus aureus	Ausente em 1 g	Ausente	Ausente	Ausente
Pseudomonas aeruginosa	Ausente em 1 g	Ausente	Ausente	Ausente

Legenda. Cepas ATCC de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foram utilizadas como controles positivos e evidenciaram a capacidade de promoção de crescimento dos meios de cultura empregados nas análises microbiológicas.

Os resultados obtidos nos ensaios de segurança *in vivo* são apresentados na **Tabela 23**, de acordo com a escala de Draize para a formação de edemas e eritemas (DRAIZE; WOODWARD; CALVERY, 1944).

Tabela 23. Ensaios de segurança *in vivo* das formulações

Ensaio Clínico	Participantes avaliados	Escala de Draize (edemas e eritemas)		
		Formulação F1	Formulação F2	Formulação F3
Irritação cutânea primária e acumulada	55	Escala 0		Escala 0
Sensibilização dérmica	55	Escala 0		Escala 0
Fotoirritação cutânea	27	Escala 0		Escala 0
Fotossensibilização dérmica	27	Escala 0		Escala 0

Legenda. Escala de Draize 0: ausência de edemas e eritemas em todos os participantes do estudo.

Em harmonia com os ensaios pré-clínicos das nanopartículas, a análise da segurança clínica das formulações indicou que todas as amostras (**F1**, **F2**, **F3**) apresentaram perfil seguro e biocompatível, visto que as mesmas não provocaram reações adversas, sinais clínicos ou sensação de desconforto nos participantes, independente do estudo. Após as três fases dos ensaios (indução, repouso e desafio), nenhum eritema foi detectado, de acordo com o controlo negativo. Os resultados indicaram que as formulações fotoprotetoras desenvolvidas possuem um perfil seguro para aplicações e posterior exposição à radiação solar (BRASIL, 2012c).

5.19 DETERMINAÇÃO DO FPS (ESTÁTICO) E FATOR DE PROTEÇÃO UVA (FPUVA)

A comparação de técnicas *in vitro e in vivo* para a obtenção do fator de proteção solar tem sido amplamente executada por diversos autores (OSTERWALDER *et al.*, 2008; AKRMAN *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 1999).

Dentre as dificuldades de transposição de resultados entre as duas metodologias está a fotoinstabilidade inerente a algumas combinações de filtros UV, tais como avobenzona e *p*-metoxicinamato de octila. Durante a avaliação do FPS *in vivo*, o dorso (região infra-escapular) dos participantes da pesquisa foi irradiado por um simulador solar, e dessa forma, o perfil fotoinstável dos filtros foi considerado no resultado final, ao contrário da técnica espectrofotométrica *in vitro*. A **Tabela 24** descreve os resultados obtidos para o FPS *in vivo* e FPUVA *in vitro* das amostras desenvolvidas. Tendo em vista os valores de FPS, as formulações não foram consideradas fotoprotetores, uma vez que desenvolveram FPS < 6,0. Considerando os aspectos regulatórios, as formulações podem ser consideradas produtos multifuncionais. Em relação à proteção contra a radiação UVA, as formulações encontraram-se em concordância com os aspectos regulatórios. O valor de FPUVA obtido para os produtos foi superior a 1/3 do FPS, bem como, o comprimento de onda crítico foi superior a 370,0 nm (**Tabela 23**) (BRASIL, 2012a; SANTOS *et al*., 1999).

Tabela 24. FPS *in vivo* e FPUVA *in vitro* das formulações desenvolvidas

Formulações	Parâmetros	
	FPS in vivo	**FPUVA**
F1	$4,5 \pm 0,42^{a}$	$3,0 \pm 0,1^{c}$
F2	$5,5 \pm 0,61^{b}$	$3,0 \pm 0,1^{c}$
F3	$5,0 \pm 0,29^{ab}$	$3,0 \pm 0,1^{c}$

Legenda. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p<0.05$)

Em relação à discrepância entre os valores de FPS obtidos para os métodos *in vivo* e *in vitro* algumas considerações necessitam ser apresentadas. Santos e colaboradores (1999), por exemplo, obtiveram valores de 15,8 ± 4,4 para o FPS de loções contendo *p*-metoxicinamato de octila a 7,5% (p/p). Contudo, como mencionado anteriormente, o perfil fotoinstável da combinação de filtros UV pode ter influenciado os resultados *in vivo*. Chatelain e Gabard (2001) observaram que, após a irradiação de uma formulação contendo *p*-metoxicinamato de octila (10,0% p/p) e avobenzona (5,0% p/p), somente 35% do filtro UVB, foi recuperado. Adicionalmente, a cobertura da formulação sobre

a pele dos sujeitos influenciou a resposta obtida, uma vez que a mesma deve espalhar-se homogeneamente sobre a topografia da pele (OSTERWALDER *et al.*, 2008).

Ressalta-se, ainda que, a metodologia *in vitro* avalia o perfil de transmitância das formulações enquanto *in vivo* analisa-se a capacidade protetora da formulação sobre a reação inflamatória, gerada a partir da radiação incidente sobre a pele (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999). Tendo em vista o exposto, exclusivamente pelo método *in vitro*, é possível inferir que as nanopartículas de gelatina contendo rutina interagiram sinergicamente com os filtros UV e alteraram seu perfil espectrofotométrico. Entretanto, *in vivo*, as nanopartículas de rutina não foram capazes de oferecer proteção adicional à formulação **F1**. Todavia, a formulação **F2**, contendo as nanopartículas brancas, sem adição do flavonoide, apresentaram desempenho superior à **F1,** na metodologia *in vivo.* A atividade antioxidante atribuída aos peptídeos que compõem o biopolímero, bem como, o reduzido tamanho de partícula das nanopartículas brancas foram as principais características que justificaram os resultados apresentados (MENDIS; RAJAPAKSE; KIM, 2005).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- **Obtenção, avaliação da segurança e caracterização física, físico-química, química, térmica e funcional das partículas**

Foram obtidas nanopartículas de gelatina esféricas e estáveis por meio da técnica de dessolvatação em dois passos. Em relação à caracterização física, as nanopartículas apresentaram diâmetro médio e IP variando entre 318,9 ± 6,9 nm (**B-NC**) a 442,8 ± 4,9 nm (**R-NC**), e, 0,06 ± 0,03 (**B-NC**) a 0,12 ± 0,01 (**R-NC**). Os valores do potencial zeta apresentaram-se elevados e negativos, variando entre -28,5 ± 0,9 mV (**B-NC**) e -26,6 ± 0,5 mV (**R-NC**). **R-NC** apresentou eficiência de associação equivalente a **51,8 ± 1,4%**, com ênfase para interação entre flavonoide e biopolímero (reação de reticulação), observada pela análise térmica. Os ensaios de segurança *in vitro* evidenciaram que, as amostras **B-NC** e **R-NC** apresentaram propriedades citotóxicas compatíveis para emprego em produtos cosméticos e possuíram tendência a manter-se na superfície da pele, sem potencial de penetração/permeação cutânea. A caracterização funcional das NPGs indicou que a amostra **R-NC**, possuiu perfil de absorbância no UV superior ao flavonoide no estado livre. Adicionalmente, observou-se que **R-NC** apresentou a % de sequestro de radicais livres **74%** superior ao flavonoide no estado livre (**RL**).

- **Preparo, avaliação da estabilidade e caracterização funcional *in vitro* das formulações fotoprotetoras**

As emulsões desenvolvidas apresentaram-se macroscopicamente estáveis. As formulações, consideradas de amplo espectro de proteção UV, exibiram características organolépticas adequadas ao uso proposto, mantendo-se estáveis durante o teste de estabilidade acelerada. O aumento de **48%** do FPS indicou efeito sinérgico da associação de **R-NC** e dos filtros químicos (avobenzona, *p*-metoxicinamato de octila e o octil dimetil PABA). Entretanto, **R-NC** não foi capaz de fotoestabilizar o sistema de filtros UV, tendo em vista a decréscimo de **40%** do valor de FPS da formulação **F3,** após a etapa de

irradiação. Todavia, após a irradiação, a formulação **F3** conservou maior comprimento de onda crítico ($\boldsymbol{\lambda_c} = 380,0$).

- **Avaliação da segurança *in vivo* das formulações fotoprotetoras**

As formulações foram aprovadas (seguras) nos ensaios *in vivo* de irritação cutânea primária e acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação cutânea e fotossensibilização dérmica.

- **Determinação do FPS (estático) e Fator de Proteção UVA (FPUVA)**

Em função dos valores de FPS obtidos, as formulações foram consideradas produtos multifuncionais. Em relação à proteção contra a radiação UVA, as formulações encontraram-se em concordância com os aspectos regulatórios (FPUVA ≥ 1/3 do FPS; λ_c ≥370,0 nm). Salienta-se, entretanto, que na determinação do FPS *in vivo*, as nanopartículas de rutina não foram capazes de oferecer proteção adicional à formulação **F1**. Todavia, a formulação contendo as nanopartículas brancas (**F2**) apresentaram desempenho superior à **F1**.

Conclui-se por fim, que resultados apresentaram perspectivas para o desenvolvimento de fotoprotetores bioativos com ingredientes nanotecnológicos. O desenvolvimento das partículas de gelatina contendo rutina permitiu o emprego viável de flavonoides em formulações fotoprotetoras, potencializando o valor do FPS e da proteção frente à radiação UVA, pela associação dos compostos bioativos com filtros químicos tradicionais.

Referências

7. REFERÊNCIAS

ACKER, S. A. B. E. V. *et al*. Structural Aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine,** v. 20, n. 3, p. 331–342, 1996.

AFONSO, S. *et al*. Photodegradation of avobenzone: Stabilization effect of antioxidants. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 140C, p. 36–40, 15 jul. 2014.

AKRMAN, J. *et al*. Quartz plates for determining sun protection in vitro and testing photostability of commercial sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, p. 119–129, 2009.

ALARIFI, S. *et al*. Cytotoxicity and genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human skin keratinocytes cells. **International journal of toxicology**, v. 32, n. 4, p. 296–307, jul. 2013.

ALMEIDA, J. S. *et al*. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale research letters**, v. 5, n. 10, p. 1603–1610, jan. 2010.

AMOS, W. B.; WHITE, J. G. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. **Biology of the Cell**, v. 95, n. 6, p. 335–342, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COSMETOLOGIA. **Guia ABC de microbiologia. Controle microbiológico na Indústria de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes**. 4ª. ed. São Paulo:2014.

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

BALLANTYNE, B.; JORDAN, S. L. Toxicological, medical and industrial hygiene aspects of glutaraldehyde with particular reference to its biocidal use in cold sterilization procedures. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, n. 2, p. 131–151, 2001.

BANGALE, M. *et al*. Recent nanotechnological aspects in cosmetics and dermatological preparations. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 88–97, 2012.

BARTOSOVA, L.; BAJGAR, J. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 27, p. 4671–4677, 2012.

BASU, S. K.; KAVITHA, K.; RUPESHKUMAR, M. Evaluation of ionotropic cross-linked chitosan/gelatin B microspheres of tramadol hydrochloride. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 28–34, mar. 2011.

BECHTEL, C. *et al*. Large field of view MEMS-based confocal laser scanning microscope for fluorescence imaging. **Optik - International Journal for Light and Electron Optics**, v. 125, n. 2, p. 876–882, 2014.

BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. (EDS.). **Nanocosmetics and Nanomedicines. New Approaches for Skin Care**,2011.

BIN, S. Photodecomposition sunscreen agents of several compounds commonly used as sunscreens agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 80, p. 417–421, 1994.

BONDA, C. Research pathways to photostable sunscreens. **Cosmetics & Toiletries**, v. 123, n. 2, p. 49–60, 2008.

BONDAREV, S. L.; KNYUKSHTO, V. N. Fluorescence and phosphorescence of rutin. **Journal of Luminescence**, v. 142, p. 236–240, out. 2013.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 609–615, 1997.

BOOTZ, A. *et al*. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl

cyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 369–375, 2004.

BORAN, G.; REGENSTEIN, J. M. Fish Gelatin. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 60, n. 10, p. 119–143, 2010.

BORM, P. J. A *et al*. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. **Particle and fibre toxicology**, v. 3, n. 11, p. 1–35, 2006.

BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 387, n. 1-3, p. 35–42, ago. 2011.

BRANDÃO, L. **Index ABC: ingredientes para a indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.** 3ª. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n°899, de 29 de maio de 2003.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília. v. 1, p. 45, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da diretoria colegiada nº 47, de 16 de março de 2006.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília. p. 6–10, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira 5ª Ed**. Brasília, v.1, 546p. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da diretoria colegiada nº 30, de 1º de junho de 2012**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília. 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília. 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília. v. 2, p. 72p, 2012c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n° 29, de 1°de junho de 2012**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília. 2012d.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Diagnóstico Institucional de Nanotecnologia.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/agencia+avalia+nanotecnologias+para+a+saude>. Acesso em: 8 set. 2015.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. :PAS 131. London, 2007. **Terminology for medical , health and personal care applications of nanotechnology**, 2007.

BURDYGINA, G. I.; FALINA, I. V; KOZLOV, P. V. Effect of modifying substances on internal stress variation in gelatin films. **Polymer Science U.S.S.R**, v. 21, n. 5, p. 1298–1305, 1980.

BURNETT, M. E.; WANG, S. Q. Current sunscreen controversies: a critical review. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 27, n. 2, p. 58–67, abr. 2011.

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. MR17–R71, 2007.

CARLOTTI, M. E. *et al*. Study on the Photostability of Octyl p-Methoxy Cinnamate in SLN. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 6, p. 809–816, nov. 2005.

CESTARI, T. F.; OLIVEIRA, F. B. DE; BOZA, J. C. Considerations on photoprotection and skin disorders. **Annales de dermatologie et de vénéréologie**, v. 139 Suppl , p. S135–43, dez. 2012.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 675–711, 2004.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. **Photochemistry and photobiology**, v. 74, n. 3, p. 401–6, 2001.

CHOQUENET, B. *et al.* Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. **Journal of natural products**, v. 71, n. 6, p. 1117–8, 2008.

COESTER, C. J. *et al*. Gelatin nanoparticles by two step desolv ation - a new preparation method, surface modifications and cell uptake. **Journal of microencapsulation**, v. 17, n. 2, p. 187–193, 2000.

CORREIA, D. M. *et al*. Thermal and hydrolytic degradation of electrospun fish gelatin membranes. **Polymer Testing**, v. 32, n. 5, p. 995–1000, ago. 2013.

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

COSMETICS EUROPE. **In vitro method for the determination of the UVA protection factor and "critical wavelength**" values of sunscreen products. Brussels. p. 28 p, 2011.

CPTEC. **Centro de previsão do tempo e estudos climáticos**. Disponível em: <http://www.cptec.inpe.br/>. Acesso em: 28 ago. 2014.

CURCIO, M. *et al*. Grafted thermo-responsive gelatin microspheres as delivery systems in triggered drug release. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 48–55, set. 2010.

DAMINK, L. H. H. O. *et al*. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 6, n. 8, p. 460–472, 1995.

DAS, M. K.; KALITA, B. Design and Evaluation of Phyto-Phospholipid Complexes (Phytosomes) of Rutin for Transdermal Application. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 10, p. 51–57, 2014.

DEBUYS, H. V *et al*. Modern approaches to photoprotection. **Dermatologic clinics**, v. 18, n. 4, p. 577–90, out. 2000.

DHIMAN, A.; SINGH, D. Development, characterization & in vitro skin permeation of rutin ethosomes as a novel vesicular carrier. **International Journal of Biomedical Research**, v. 5, n. 2013, p. 158–160, 2014.

DRAIZE, J. .; WOODWARD, D. G.; CALVERY, H. . Methods for study of irritation and toxicity substances applied to the skin and mucous membranes. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 82, p. 377–390, 1944.

DUBBER, M.-J.; KANFER, I. High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in Ginkgo biloba solid oral dosage forms. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences**, v. 7, n. 3, p. 303–309, 2004.

ELZOGHBY, A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 1075–1091, 2013.

FILHO, M. B. *et al*. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. v. 393, p. 79–84, 2002.

FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, maio 2010.

FLOR, J.; DAVALOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153–158, 2007.

FRANGE, R. C. C.; GARCIA, M. T. . Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva / água : avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadade**, v. 30, n. 3, p. 263–271, 2009.

FUCHS, S. Gelatin **Nanoparticles as a Modern Platform for Drug Delivery Formulation Development and Immunotherapeutic Strategies.** Berlim, 2010. 279 p. Tese (Doutorado). Tese de Doutorado - Faculdade de Química e Farmácia de Munique - Ludwig Maximilians-University. p. 279, 2010.

GILBERT, E. et al. Commonly used UV filter toxicity on biological functions : review of last decade studies. **International Journal of Cosmetic Science**, p. 1–12, 2012.

GIOKAS, D. L.; SALVADOR, A.; CHISVERT, A. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 360–374, 2007.

GUARDIA, T. *et al*. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Farmaco**, v. 56, n. 9, p. 683–687, 2001.

HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, p. 107–120, 2005.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, out. 2002.

HERMANSON, G. . **Bioconjugate techniques**. third ed.london: Academic, London, 2008.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). v. 12, n. April, p. 255–264, 2013.

HOWARD, W.; WENDER, S. Acid Dissociation Exponents of Rutin and Xanthorhamninl. **Journal of american chemical society**, v. 159, n. 5, p. 143–144, 1952.

IKEHATA, H.; ONO, T. The mechanisms of UV mutagenesis. **Journal of radiation research**, v. 52, n. 2, p. 115–125, 2011.

INCA. **INCA. Instituto Nacional do Cancêr Estimativa Incidência de câncer no Brasil - 2014**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>. Acesso em: 10 mar. 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures**: Text and methodology. v. 1994, n. November 1996, p. 41, 2005.

JANJUA, N. R. *et al*. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 22, n. 4, p. 456–61, abr. 2008.

JANSEN, R. *et al*. Photoprotection: part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 6, p. 853.e1–12; quiz 865–6, 2013.

JAYAKRISHNAN, A; JAMEELA, S. R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. **Biomaterials**, v. 17, n. 5, p. 471–84, 1996.

JEONG, L.; PARK, W. H. Preparation and characterization of gelatin nanofibers containing silver nanoparticles. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 4, p. 6857–79, 2014.

KERR, A.; FERGUSON, J. Photoallergic contact dermatitis. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 20, n. 3, p. 121–125, 2004.

KLIGMAN, A M.; WOODING, W. M. A Method for the Measurement and Evaluation of Irritants on Human Skin1. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 49, n. 1, p. 78–94, 1967.

KOCKLER, J. *et al*. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 91–110, mar. 2012.

KONTARGIRIS, E. *et al*. Zinc inhibits apoptosis and maintains NEP downregulation, induced by ropivacaine, in HaCaT cells. **Biological trace element research**, v. 150, n. 1-3, p. 460–6, dez. 2012.

KOZLOV;P.V; BURDYGINA, G. The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. **polymer reviews**, v. 24, p. 651–666, 1981.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H. C.; PITTELKOW, M. R. Photoprotection. **Lancet**, v. 370, n. 9586, p. 528–537, 2007.

LEE, J. K. *et al*. In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 4, p. 345–349, 2000.

LEE, J. S. *et al*. Photochemical properties of UV-absorbing chemicals in phase-controlled polymer microspheres. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, n. 2, p. 194–199, 2004.

LEO, E. *et al*. Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: Involvement of the drug in the cross-linking process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 155, n. 1, p. 75–82, set. 1997.

LHIAUBET-VALLET, V. et al. Filter-filter interactions. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 9, n. 4, p. 552–558, 2010.

LIU, W. G. *et al.* Intrinsic fluorescence investigation on the change in conformation of cross-linked gelatin gel during volume phase transition. **Polymer**, v. 41, p. 7589–7592, 2000.

MAIER, H. *et al*. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar-simulated radiation. **The Journal of investigative dermatology**, v. 117, n. 2, p. 256–62, ago. 2001.

MAIER, T.; KORTING, H. C. Sunscreens - Which and what for? **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 18, n. 6, p. 253–262, 2005.

MANCEBO, S. E.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. Sunscreens: a review of health benefits, regulations, and controversies. **Dermatologic clinics**, v. 32, n. 3, p. 427–38, x, jul. 2014.

MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**.São Paulo. 2009. 166 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H. I. The rabbit as a model for evaluating skin irritants: a comparison of results obtained on animals and man using repeated skin exposures. **Food and cosmetics toxicology**, v. 13, p. 533–540, 1975.

MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 581–587, 2005.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Sciene and Technology**, v. 50, p. 211–219, 2004.

MORABITO, K. *et al*. Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection. **International journal of cosmetic science**, v. 33, n. 5, p. 385–90, out. 2011.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 4, p. 793–829, jan. 2011.

NAHAR, M. *et al*. Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 4, n. 3, p. 252–61, set. 2008.

NATARAJAN, V. T. *et al*. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 7, p. 542–51, jul. 2014.

NOHYNEK, G. J. *et al*. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. **Critical reviews in toxicology**, v. 37, n. 3, p. 251–77, 2007.

OFOKANSI, K. *et al*. Matrix-loaded biodegradable gelatin nanoparticles as new approach to improve drug loading and delivery. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 1–9, set. 2010.

OLIVEIRA, C. A. *et al.* Vegetable oils as bioactive adjuvants for sunscreens. **Household and Personal Care Today**, v. 7, n. 3, p. 9–11, 2012.

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

OLIVEIRA, C. A. *et al*. Cutaneous biocompatible rutin-loaded gelatin-based nanoparticles increase the SPF of the association of UVA and UVB filters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [no prelo].

OSTERWALDER, U. *et al.* Understanding sunscreens- In vitro SPF determination requires correction for in vivo photo degradation. **Journal of american academy dermatoly**, v. 58, n. 2, p. AB29, 2008.

OZCELIK, B.; LEE, J.; MIN, D. Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 2, p. 487–490, 2003.

PAPAKOSTAS, D. *et al*. Nanoparticles in dermatology. **Archives of dermatological research**, v. 303, n. 8, p. 533–50, out. 2011.

PARK, S. N.; LEE, H. J.; GU, H. A. Enhanced skin delivery and characterization of rutin-loaded ethosomes. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 3, p. 485–489, 10 jan. 2014.

PEDRIALI, C. A. *et al*. The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. **Quimica Nova**, v. 31, n. 8, p. 2147–2151, 2008.

PEDRIALI, C. A. *et al.* In Vitro Sun Protection Factor Evaluation of Sunscreens Containing Rutin and its Derivative. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 5, p. 12–15, 2011.

PEÑA, C. *et al*. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. **Bioresource technology**, v. 101, n. 17, p. 6836–42, set. 2010.

PERES, D. A. *et al*. Rutin increases critical wavelength of systems containing a single UV filter and with good skin compatibility. **Skin Research and Technology** [no prelo].

PERES, D. A. **Prospecção da propriedade fotoestabilizadora e eficácia clínica do ácido ferúlico em preparações fotoprotetoras**. São Paulo, 2015.109p. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. 2015.

PERUGINI, P. *et al.* Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, n. 1-2, p. 37–45, 2002.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035–42, jul. 2000.

PIMENTA, M.; MELO, C. DE PINTO. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias estratégicas**, v. 18, p. 9 – 21, 2004.

PINTO, C. A. S. O. **Influência da rutina na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do p -metoxicinamato de octila (filtro UVB).** São Paulo, 2014.212p. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. 2014.

PROW, T. W. *et al.* Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.

PSOTOVA, J. *et al*. Photoprotective properties of Prunella vulgaris and rosmarinic acid on human keratinocytes. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 84, n. 3, p. 167–74, 1 set. 2006.

RIBANI, M. . *et al*. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIGEL, D. S. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 5 SUPPL. 2, 2008.

ROTHWELL, J. A.; DAY, A. J.; MORGAN, M. Experimental Determination of Octanol – Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2005.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 9, p. 129–141, 2013.

SAMBANDAN, D. R.; RATNER, D. Sunscreens: An overview and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 4, p. 748–758, 2011.

SANTOS, E. P. *et al*. In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. **International journal of cosmetic science**, v. 21, p. 1–5, 1999.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane-octyl methoxycinnamate. **Photochemistry and photobiology**, v. 86, n. 2, p. 273–8, 2010.

SCHLUMPF, M. *et al*. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update. **Toxicology**, v. 205, n. 1-2, p. 113–22, dez. 2004.

SEITÉ, S. *et al.* Photodamage to human skin by suberythemal exposure to solar ultraviolet radiation can be attenuated by sunscreens: A review. **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 5, p. 903–914, 2010.

SEPIC. **Polymers range**. p. 4p, 2011.

SHABIR, G. A. V alidation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration , the

US Pharmacopeia and the International Con. **Journal of Cromatography A**, v. 987, p. 57–66, 2003.

SHEU, M. T. *et al*. Correlation of in vivo and in vitro measurements of sun protection factor. **Jornal of Food and Drug Analysis**, v. 11, n. 2, p. 128–132, 2003.

SINGH, P.; NANDA, A. Nanotechnology in cosmetics: a boon or bane? **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 8, p. 37–41, 2012.

SIQUEIRA, N. . **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana**. Porto Alegre, 2008. 106p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

SPRINGSTEEN, A. *et al*. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytica Chimica Acta**, v. 380, n. 2-3, p. 155–164, fev. 1999.

STEEDEN, S. *et al*. Flavonoids Antioxidants. **Journal of american chemical society**, v. 116, n. 5, p. 4846–4851, 1994.

STOTT, C. W. *et al*. Evaluation of the phototoxic potential of topically applied agents using long-wave ultraviolet light. **The Journal of investigative dermatology**, v. 55, p. 335–338, 1970.

STRAUSS, G.; GIBSON, S. M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 1, p. 81–89, jan. 2004.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Protein release from gelatin matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3, p. 287–301, 1998.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services FDA U. **Sunscreen drug products for over the counter use: final monograph**. Fed Reg 1999; 64: 27666–93. 1999.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. 21 CFR Parts 201 and 310. **Labeling and effectiveness testing; sunscreen drug products for over-the- counter human use**. Federal Register. v. 76, n. 117, 2011.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services.**Guidance for Industry Safety of Nanomaterials in Cosmetic**. p. 1–16, 2014.

UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP36; The National Formulary: NF31. Rockville: United States Pharmacopeial Convention,p.983-988, 2013. p. 983–988, 2013.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. 21 CRF parts 347 and 352. **Sunscreen drug products for over-the-counter human use**; Proposed amendment of Final Monograph; Proposed Rule. 2007.

VALLEJO, J. J.; MESA, M.; GALLARDO, C. Evaluation of the avobenzone photostability in solvents used in cosmetic formulations. **Vitae**, v. 18, p. 63–71, 2011.

VALLET, V. *et al*. In vitro percutaneous penetration of organophosphorus compounds using full-thickness and split-thickness pig and human skin. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 6, p. 1182–90, set. 2007.

VELASCO, M. V. *et al*. Influences of bioactive substances on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions emulsões fotoprotetoras. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 1, n. 9, p. 119–130, 2012.

VELASCO, M. V. R. *et al*. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: Avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. Latin American Journal of Pharmacy, v. 27, n. 1, p. 23–27, 2008a.

VELASCO, M. V. R. *et al*. Broad spectrum bioactive sunscreens. **International journal of pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 50–7, 3 nov. 2008b.

VICIOLLE, E.; CASTILHO, P.; ROSADO, C. In vitro and in vivo assessment of the effect of Laurus novocanariensis oil and essential oil in human skin. **International journal of cosmetic science**, v. 34, n. 6, p. 546–50, dez. 2012.

VICTOR, F. C.; COHEN, D. E.; SOTER, N. A. A 20-year analysis of previous and emerging allergens that elicit photoallergic contact dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 62, n. 4, p. 605–10, abr. 2010.

VOGT, A. *et al*. 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. **The Journal of investigative dermatology**, v. 126, n. 6, p. 1316–1322, 2006.

WANG, L. *et al*. Flavonoid composition, antibacterial and antioxidant properties of tartary buckwheat bran extract. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 312–317, 2013.

WANG, S. Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. **Dermatologic therapy**, v. 23, n. 1, p. 31–47, 2010.

WANG, S. Q.; LIM, H. W. Current status of the sunscreen regulation in the United States: 2011 Food and Drug Administration's final rule on labeling and effectiveness testing. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 4, p. 863–9, out. 2011.

WANG, S. Q.; TOOLEY, I. R. Photoprotection in the era of nanotechnology. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, v. 30, n. 4, p. 210–3, dez. 2011.

WATKINSON, A. C. *et al*. Nanoparticles do not penetrate human skin - A theoretical perspective. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 8, p. 1943–1946, 2013.

WILHELM, K. P.; BOTTJER, B.; SIEGERS, C. P. Quantitative assessment of primary skin irritants in vitro in a cytotoxicity model: comparison with in vivo human irritation tests1. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 5, p. 709–715, 2001.

WISSING, S. A; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. **Journal of controlled release**, v. 81, n. 3, p. 225–33, 17 jun. 2002.

WU, T.-H. *et al*. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 346, n. 1-2, p. 160–8, 4 jan. 2008.

YOUNG, S. *et al.* Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. **Journal of Controlled Release**, v. 109, n. 1-3, p. 256–274, 2005.

ZHAI, X. **Gelatin nanoparticles and nanocrystals for dermal delivery**. Berlim, 2013. 138 p. Tese (Doutorado). Departamento de Biologia, Química e Farmácia - Universiadade de Berlim. 2013.

ZHANG, X. *et al*. Chemical modification of gelatin by a natural phenolic cross-linker, tannic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6809–6815, 2010a.

ZHANG, X. *et al*. Chemical cross-linking gelatin with natural phenolic compounds as studied by high-resolution NMR spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 4, p. 1125–32, 12 abr. 2010b.

ZVEZDANOVIC, J. *et al*. Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution, studied by UV-spectrophotometry and HPLC chromatography. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 3, p. 297–312, 2012.

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

Anexos

ANEXO A- INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS DE DOUTORADO

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

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

ANEXO B- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento tecnológico, avaliação da segurança e eficácia de sistemas nanoparticulados de gelatina contendo rutina

Pesquisador: André Rolim Baby

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30610014.8.0000.0067

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 735.497

Data da Relatoria: 25/08/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto visa o desenvolvimento de sistemas particulados de gelatina contendo rutina, visando a obtenção de uma matéria-prima inovadora e funcional para utilização dermocosmética e, por conseguinte, o desenvolvimento de fotoprotetores de amplo espectro, de eficácia estimada in vitro por espectrofotometria de refletância e confirmada in vivo, partindo-se da incorporação dos sistemas nanoestruturados com perfis de funcionalidade adequados em veículos de aplicação tópica.

Objetivo da Pesquisa:

I. Obtenção das partículas de gelatina, contendo rutina nanoencapsulada.

II. Caracterização física, físico-química e química das partículas.

III. Avaliação in vitro da citotoxicidade dos sistemas.

Iv. Identificação in vitro das propriedades funcionais (atividade antirradicalar e eficácia fotoprotetora estimada) das nanoestruturas.

v. Desenvolvimento e análise (física, físico-química e funcional in vitro) das formulações dermocosméticas fotoprotetoras para incorporação das nanopartículas de gelatina.

vi. Determinação da eficácia clínica e segurança das formulações dermocosméticas fotoprotetoras

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

de melhor desempenho por meio da obtenção do fator de proteção solar (FPS) estático, irritabilidade dérmica primaria, acumulada, sensibilização e pesquisa de fototoxicidade e fotossensibilização.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: todas as substâncias que compõem o produto são de uso habitual e consideradas seguras para a finalidade que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, podem ocorrer reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica do(s) produto(s). Os investigadores garantem os cuidados e acompanhamento necessários durante todas as etapas do estudo.

Benefícios: não existem benefícios diretos aos participantes do estudo envolvidos, mas os resultados poderão trazer benefícios futuros a população, uma vez que contribuirão para ampliar o conhecimento sobre um produto cosmético.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é interessante e relevante diante do elevado número de produtos introduzidos no mercado, com promessa de atuar como antioxidantes, mas sem comprovação científica com metodologia de boa qualidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos foram adequados de acordo com as recomendações e pendências apresentadas pelo CEP.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 735.497

SAO PAULO, 01 de Agosto de 2014

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3822 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br

ANEXO C- CURRÍCULO LATTES

Camila Areias de Oliveira

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/[illegible]

Última atualização do currículo em 30/09/2015

Resumo informado pelo autor

Graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, atualmente é aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação de Fármaco e Medicamentos da USP.Realizou estágio de pesquisa(6 meses) na Universidade Lusófana (Lisboa) com ênfase na avaliação in vivo e in vitro da segurança e eficácia de produtos cosméticos. Atua na área de pesquisa e desenvolvimento de produtos cosméticos, com ênfase no desenvolvimento de fotoprotetores bioativos. Reúne 6 anos de experiência na área tendo atuado em indústrias cosméticas e farmácias de manipulação. Desenvolve pesquisas na área de educação com ênfase em educação a distância e T3C.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome	Camila Areias de Oliveira
Filiação	Luís Fernando Pereira de Oliveira e Dilma Areias de Oliveira
Nascimento	02/03/1987 - São Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade	210915275 DIC - RJ - 23/05/2005
CPF	118.151.887-70

Formação acadêmica/titulação

2011 Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Desenvolvimento Tecnológico, Avaliação de Segurança e Eficácia Clínica de Sistemas Micro/Nanoparticulados de Sistema Contendo Rutina, Ano de obtenção: 2015
Orientador: André Rolim Baby

2005 - 2009 Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

2002 - 2004 Ensino Profissional de nível técnico.
Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca, CEFETIRJ, Rio De Janeiro, Brasil

Formação complementar

2010 MBA em Cosmetologia.
Universidade Camilo Castelo Branco, UNICASTELO, Santos, Brasil
Título: Curso em andamento
Orientador: Curso em andamento

2013 Extensão universitária em Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2013 - 2013 Workshop U.S. Pharmacopeia HPLC.
United States Pharmacopeia, USP, Estados Unidos

2013 - 2013 Curso de curta duração em Writing in Science.
Stanford University, STANFORD, Stanford, Estados Unidos

2013 - 2013 Curso de curta duração em Metodologias Téc e Aplic. para Caras. de partícula.
Malvern Instruments, MI, Brasil

2012 - 2012 Extensão universitária em Objetos de Aprendizagem.
Universidade Federal do ABC, UFABC, Santo André, Brasil

2012 - 2012 Extensão universitária em Produção de Vídeo.
Universidade Federal do ABC, UFABC, Santo André, Brasil

2012 - 2012 Extensão universitária em Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2012 - Atual

2. Universidade Federal do ABC - UFABC

Vínculo institucional

2012 - 2012 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Tutor , Carga horária: 20, Regime: Parcial

3. Ateliê das Fórmulas - AF

Vínculo Institucional

2010 - 2010 Vínculo: CLT , Enquadramento funcional: Farmacêutica , Carga horária: 44, Regime: Dedicação exclusiva

4. Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro - HSERJ

Vínculo Institucional

2009 - 2009 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 12, Regime: Parcial

5. Dermatus Cosmética Médica Ltda - DERMATUS

Vínculo Institucional

2007 - 2008 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 20, Regime: Parcial

6. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Vínculo Institucional

2009 - 2009 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 12, Regime: Parcial

2006 - 2007 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 12, Regime: Parcial

Revisor de periódico

1. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (Impresso)

Vínculo

2014 - Atual Regime: Parcial

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **DE OLIVEIRA, CAMILA ARRAS**, PERES, DANIELA D'ALMEIDA, RUSHO, CAYNAN MENDES, KOJIMA, MAYARA, DE OLIVEIRA PINTO, CLAUDINEIA APARECIDA SALES, CONSIGLIERI, VLADI OLGA, KANEKO, TELMA MARY, Rosado, Catarina, Mota, Joana, VELASCO, MARIA VALÉRIA ROBLES, BABY, ANDRÉ ROLIM.
Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology. LOC, v.148, p.154 - 159, 2015.

2. OLIVEIRA, C. A., NISHIKAWA, D. O., BALOGH, T. S., PRESTES, P. S., CONSIGLIERI, V. O., KANEKO, T. M., VELASCO, M. V., BABY, A. R.
VEGETABLE OILS AS BIOACTIVE ADJUVANTS FOR SUNSCREENS. Household and Personal Care Today (Texto Stampato) , v.7, p.9 - , 2012.

3. SILVA, D. G. E., OLIVEIRA, C. A., PERES, D. D., PEREIRA, M., PEREIRA, N., ALMEIDA, T. S., MOTA, J. P., ROSADO, C., VELASCO, M. V. R., BABY, A. R., LEITE-SILVA, V. R.
Impact of stirring speed, glycerin and sodium chloride concentrations on photoprotective nanoemulsions. Biomedical and Biopharmaceutical Research , v.11, p.210 - , 2015.

4. NISHIKAWA, D. O., PERES, D. D., OLIVEIRA, C. A., SILVA, V. R. L. E., KANEKO, T. M., VELASCO, M. V., BABY, A. R.
Stability and efficacy of sunscreens containing inorganic filters and quercetin. Biomedical and Biopharmaceutical Research , v.10, p.51 - , 2013.

5. VELASCO, M. V., SARRUF, F. D., OLIVEIRA, C. A., SILVA, A. P. M., CONSIGLIERI, V. O., KANEKO, T. M., BABY, A. R.
Influence of a bioactive substance on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions. Biomedical and Biopharmaceutical Research , v.8, p.119 - 130, 2012.

6. DOTTA, S., OLIVEIRA, C. A., LOPES, P. H., JORGE, E.
A mediação em aulas virtuais síncronas via webconferência. Revista Brasileira de Informática na Educação , v.22, p.56 - 68, 2014.

7. PEREIRA, M., PEREIRA, N., ROSADO, C., **OLIVEIRA, C. A.**, PERES, D., ARAUJO, M. E., VELASCO, M. V., BABY, A. R., Mota, Joana, ALMEIDA, T. S.
Photostabilization of sunscreens by incorporation of tea as the external phase Fotoestabilização de protectores solares por incorporação de chás como fase externa. Biomedical and Biopharmaceutical Research , v.12, p.107 - 116, 2015.

Artigos aceitos para publicação

1. **OLIVEIRA, C. A.**, PERES, D., GRATIOLA, F., CHACRA, N. B., ARAUJO, G. L. B., FLORIDO, A., Mota, Joana, ROSADO, C., VELASCO, M. V., Luís, M. Rodrigues, FERNANDES, A. S., BABY, A. R.
Cutaneous biocompatible fulfilled gelatin-based nanoparticles increase the SPF of the association of UVA and UVB filters. European Journal of Pharmaceutical Sciences. LOC, 2015.

2. **DE** PERES, DANIELA D'ALMEIDA, **OLIVEIRA, C. A.**, COSTA, M. S., TOKUMAGA, V. K., Mota, Joana, ROSADO, C., CONSIGLIERI, V. O., KANEKO, T. M., VELASCO, M. V. R., BABY, A. R.
Rutin increases critical wavelength of cyclosters containing a single UV filter and with good skin compatibility. Skin Research and Technology. LOC, 2015.

Livros publicados

1. DOTTA, S., COSTA, A. K. N., MARCHIONI, B. D., **OLIVEIRA, C. A.**, PIMENTEL, E., JORGE, E., BRAGA,

J., ABUJAR, P. H. L.
Aulas virtuais síncronas: Condução de webconferência multimodal e multimídia em Educação a Distância. São Andrés : UFABC, 2014. v.1. p.144.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. DOTTA, S., OLIVEIRA, C. A., JORGE, E., LOPES, P. H., SILVEIRA, R. T.
Abordagem dialógica para condução de aulas síncronas em uma webconferência In: X Congresso Brasileiro de Ensino Superior a Distância, 2013, Belém.
Abordagem dialógica para condução de aulas síncronas em uma webconferência , 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BABY, A. R., GRAZIOLA, F., OLIVEIRA, C. A., Rosado, Catarina, Mota, Joana, ALMEIDA, T. S., KANEKO, T. M., CONSIGLIERI, V. O., PINTO, C. A. S. O., VELASCO, M. V.
Obtenção, caracterização físico-química e eficácia fotoprotetora in vitro de microesferas de gelatina reticuladas com glutaraldeído ou rutina In: 27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2014, São Paulo.
Obtenção, caracterização físico-química e eficácia fotoprotetora in vitro de microesferas de gelatina reticuladas com glutaraldeído ou rutina. Cannia, 2014.

2. OLIVEIRA, C. A., SILVA, A. L. F., PERES, D. D., FLORIDO, A., CHACRA, N. B., Saraiva, Nuno, Mota, Joana, Rosado, Catarina, VELASCO, M. V., Luis, M. Rodrigues , FERNANDES, A. S., BABY, A. R.
RUTIN-LOADED PROTEIN-BASED NANOTECHNOLOGY: A PLATFORM FOR INNOVATIVE SUNSCREENS In: 27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2014, São Paulo.
RUTIN-LOADED PROTEIN BASED NANOTECHNOLOGY: A PLATFORM FOR INNOVATIVE SUNSCREENS , 2014. v.28. p.182 - 182

3. BABY, A. R., Mota, Joana, ALMEIDA, T. S., Nicola, M., Salvado, M., OLIVEIRA, C. A., Rosado, Catarina
Silicone based formulations: deeper insight into skin permeation and sunscreen efficacy In: 27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2014, São Paulo.
Silicone based formulations: deeper insight into skin permeation and sunscreen efficacy , 2014.

4. VELASCO, M. V., OLIVEIRA, C. A., PERES, D. D., RIMOS, M. M. A., KANEKO, T. M., CONSIGLIERI, V. O., BABY, A. R.
Development and in vitro photoprotection efficacy of bioactive sunscreens containing rutin, avobenzone and octyl dimethyl paba. In: International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress , 2012
Development and in vitro photoprotection efficacy of bioactive sunscreens containing rutin, avobenzone and octyl dimethyl paba. , 2012.

5. RIMOS, M. M. A., OLIVEIRA, C. A., PERES, D. D., KANEKO, T. M., VELASCO, M. V., BABY, A. R.
DEVELOPMENT AND IN VITRO PHOTOPROTECTION EFFICACY OF BIOACTIVE SUNSCREENS CONTAINING RUTIN, AVOBENZONE AND OCTYL DIMETHYL PABA In: XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia
DEVELOPMENT AND IN VITRO PHOTOPROTECTION EFFICACY OF BIOACTIVE SUNSCREENS CONTAINING RUTIN, AVOBENZONE AND OCTYL DIMETHYL PABA , 2012.

6. SARRUF, F. D., OLIVEIRA, C. A., SILVA, A. P. M., VELASCO, M. V., KANEKO, T. M., CONSIGLIERI, V. O., BABY, A. R.
Influence of a bioactive substance on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions In: Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012, São Paulo.
Influence of a bioactive substance on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions , 2012. v.48. p.70 - 70

7. OLIVEIRA, C. A., CHACRA, N. B., VELASCO, M. V., CONSIGLIERI, V. O., KANEKO, T. M., BABY, A. R.
Protein based nanotechnology: antioxidant and photoprotective activities In: Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012, São Paulo.
Protein based nanotechnology: antioxidant and photoprotective activities , 2012. v.48. p.70 - 70

8. VELASCO, M. V., OLIVEIRA, C. A., CHACRA, N. B., CONSIGLIERI, V. O., KANEKO, T. M., BABY, A. R.
Rutin-loaded gelatin nanoparticles: antioxidant and photoprotective activities In: International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, 2012
Rutin-loaded gelatin nanoparticles: antioxidant and photoprotective activities , 2012.

Artigos em revistas (Magazine)

1. OLIVEIRA, C. A., CALADO, R., PAIVA, L. M. S.
O Tempo Não Para: O Curso Técnico de Meteorologia do CEFET/RJ em Quase Meio Século de História. Boletim da Sociedade Brasileira de Meteorologia. Rio de Janeiro, p.02 - 05, 2005.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **OLIVEIRA, C. A.**, VELASCO, M. V. R., RODRIDO, C., BABY, A. R.
Gelatin nanoparticles (GNPs) increased the Sun Protection Factor (SPF) and antioxidant activity of Bioscreens, 2010. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

2. OLIVEIRA, C. A., SILVA, A. L. F., PERES, D. D., FLORIDO, A., CHACRA, N. B., Saraiva, Nuno, Mota, Joana, Rosado, Catarina, VELASCO, M. V., Luis, M. Rodrigues , FERNANDES, A. S., BABY, A. R.
RUTIN-LOADED PROTEIN BASED NANOTECHNOLOGY: A PLATFORM FOR INNOVATIVE SUNSCREENS, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 04/10/2015 às 19:21:14.

ANEXO D – FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

Secretaria de Pós-Graduação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

9139 - 7752197/1 - Camila Areias de Oliveira

Email:	milaareias@usp.br
Data de Nascimento:	02/03/1987
Cédula de Identidade:	RG - 57.583.318-X - SP
Local de Nascimento:	Estado do Rio de Janeiro
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro - Brasil - 2009

Curso:	Doutorado Direto
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	05/07/2011
Início da Contagem de Prazo:	05/07/2011
Data Limite para o Depósito:	03/11/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). André Rolim Baby - 05/07/2011 até o presente. Email: andrerb@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 05/07/2011
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 05/07/2015 até 02/11/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 09/08/2013
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2015
Impresso em: 15/09/2015 15:17:21

Terezinha Sueli Duarte
FCF/USP
Nº USP 8830369

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Secretaria de Pós-Graduação

9139 - 7752197/1 - Camila Arcias de Oliveira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
FBF5702-6/2	Formulação de Produtos Cosméticos e Cosmecêuticos	02/08/2011	05/09/2011	75	5	80	A	N	Concluída
FBF5722-6/2	Espectrofotometria Diferencial no Controle de Qualidade de Medicamentos	10/08/2011	05/10/2011	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5777-2/5	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	11/08/2011	23/11/2011	45	3	100	A	N	Concluída
PSA5866-4/3	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	15/08/2011	25/09/2011	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
EDM5102-2/5	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/08/2011	25/09/2011	60	4	80	A	N	Concluída
EDM5791-5/7	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	23/08/2011	14/11/2011	120	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à disciplina FBF0354 - Cosmetologia, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/02/2012	30/06/2012	-	3	-	-	-	-
EDM5063-2/5	Ambientes de Aprendizagem Cooperativo Apoiados em Tecnologias da Internet: Novos Desafios, Novas Competências (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/03/2012	29/06/2012	120	8	91	A	N	Concluída
FBF5806-1/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	02/08/2012	05/09/2012	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5779-2/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	16/08/2013	17/10/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5794-2/4	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II	11/09/2013	19/11/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5811-1/1	Utilização de Sistemas Biológicos In Vitro, Ex Vivo e In Vivo na Avaliação de Eficácia e Segurança de	17/02/2014	30/03/2014	30	2	100	A	N	Concluída

Terezinha Sueli Duarte
FCF/USP
Nº USP 8830369

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
	Fármacos, Medicamentos e Cosméticos								

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	39
Estágios:			
Total:	0	25	39

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR 3588, de 11.06.2005 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 10/01/2013.

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2015

Impresso em: 15/09/2015 15:17:21

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP
Secretaria de Pós-Graduação

Terezinha Sueli Duarte
FCF/USP
Nº USP 8830369

ANEXO E- PRODUÇÃO CIENTÍFICA NA FORMA DE ARTIGO

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products

Camila Areias de Oliveira [a,*], Daniela DAlmeida Peres [a], Caynan Mendes Rugno [a], Mayara Kojima [a], Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto [a], Vladi Olga Consiglieri [a], Telma Mary Kaneko [a], Catarina Rosado [b], Joana Mota [b], Maria Valéria Robles Velasco [a], André Rolim Baby [a]

[a] Department of Pharmacy, University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Av., Bl. 15, Conjunto das Químicas, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil
[b] CBIOS-Research Center for Biosciences and Health Technologies, Lusófona University, Campo Grande 376, 1749-024 Lisbon, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 September 2014
Received in revised form 8 April 2015
Accepted 13 April 2015
Available online 20 April 2015

ABSTRACT

Sunscreens are the most-established approach for photoprotection. The strategy of providing antioxidant properties to sun care products by addition of natural and potent anti-free radical compounds has led to the development of bioactive sunscreens, able to neutralize the harmful effects of ultraviolet (UV) radiation. UVA filters, such as benzophenone-3 (BP) and butyl methoxydibenzoylmethane (BMDBM), can exhibit photodegradation which limits the development of broad spectrum sunscreens. Previous research verified that rutin interacts with filters incorporated in sunscreens. In this work, we focused on the development and evaluation of the efficacy of the sunscreens containing either BP or BMDBM with and without rutin. The addition of rutin to the UVA filters afforded antioxidant properties to the formulations and they were considered safe for human use. Additionally, rutin in combination with either BP or BMDBM increased the antioxidant activity about 40 times when compared with the UVA filters alone. Remarkably, the addition of rutin 0.1% (w/w) to BP 6.0% (w/w) raised the SPF from 24.3 ± 1.53 to 33.3 ± 2.89. In conclusion, these findings demonstrated that the addition of rutin into sunscreens can markedly improve the antioxidant properties of the formulation as well as photostabilize some of the UVA filters.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Skin Res Technol. 2015 Sep 7. doi: 10.1111/srt.12265. [Epub ahead of print]

Rutin increases critical wavelength of systems containing a single UV filter and with good skin compatibility.

Peres DA[1], de Oliveira CA[1], da Costa MS[1], Tokunaga VK[1], Mota JP[2], Rosado C[2], Consiglieri VO[1], Kaneko TM[1], Velasco MV[1], Baby AR[1].

Author information

Abstract

BACKGROUND/PURPOSE: Ultraviolet (UV) radiation is responsible for sunburns, skin cancer, photoaging, and the production of reactive oxygen species (ROS). The awareness on preventing these deleterious effects made the use of anti-UVB formulations an important part of population habits; however, despite the availability of several antioxidants capable of ROS scavenging, the pharmaceutical market lacks products associating UV filters with natural compounds of proven efficacy. Here, we investigated the effect of rutin, a flavonoid with antioxidant activity, associated with UVB filters in dermocosmetic preparations.

METHODS: Formulations were assessed through its antioxidant activity, in vitro photoprotective effectiveness, photostability, and in vivo skin tolerance (hydration, transepidermal water loss, and erythema).

RESULTS: Samples containing rutin were compatible with the human skin and presented a pronounced antioxidant potential, with scavenging activity values 75% higher than the ones containing only UVB filters. Although rutin could not prevent the sunscreens photodegradation post-irradiation, the bioactive compound significantly increased the formulations critical wavelengths, showing a photoprotective gain, especially in the UVA range.

CONCLUSION: In conclusion, the absorption in the UVA range, coupled with ROS scavenging potential, proved the positive effect of rutin applied to anti-UVB formulations, making this bioactive compound a promising candidate for photoprotection improvement.

© 2015 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

KEYWORDS: ethylhexyl dimethyl PABA; ethylhexyl methoxycinnamate; flavonoid; octocrylene; photoprotection; photostability

European Journal of Pharmaceutical Sciences
Available online 30 September 2015
In Press, Accepted Manuscript — Note to users

Cutaneous biocompatible rutin-loaded gelatin-based nanoparticles increase the SPF of the association of UVA and UVB filters

Camila Arelas de Oliveira[a], Daniela D´Almeida Peres[a], Fabiana Graziola[a], Nadia Araci Bou Chacra[a], Gabriel Lima Barros de Araújo[a], Ana Catarina Florido[b], Joana Mota[b], Catarina Rosado[b], Maria Valéria Robles Velasco[a], Luis Monteiro Rodrigues[b], Ana Sofia Fernandes[b], André Rolim Baby[a]

show more

doi:10.1016/j.ejps.2015.09.016

Get rights and content

Abstract

The encapsulation of natural ingredients, such as rutin, can offer marked improvements in sun protection effectiveness. This strategy can provide enhanced flavonoid content and produces an improved bioactive compound with new physical and functional characteristics. As an alternative to common synthetic-based sunscreens, rutin-entrapped gelatin nanoparticles (GNPs) were designed and associated with ethylhexyl dimethyl PABA (EHDP), ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC) and methoxydibenzoylmethane (BMDBM) in sunscreen formulations. The purpose of this study was to develop rutin-loaded gelatin nanoparticles and characterize their physicochemical, thermal, functional and safety properties. Rutin-loaded gelatin nanoparticles increased antioxidant activity by 74% relative to free-rutin (FR) solution. Also, this new ingredient upgraded the Sun Protection Factor (SPF) by 46%, indicating its potential as a raw material for bioactive sunscreens. The safety profile indicated that GNPs and glutaraldehyde (GTA) decreased HaCaT cell viability in a concentration/time-dependent manner. However, both blank nanoparticles (B-NC) and rutin-loaded nanoparticles (R-NC) had good performance on skin compatibility tests. These results functionally characterized rutin-loaded nanoparticles as a safe SPF enhancer in sunscreens, especially in association with UV filters.

Peer-reviewed article

Monographic Supplement Series

Compendium on SUN CARE

CAMILA AREIAS DE OLIVEIRA*,
DEBORAH DE OLIVEIRA NISHIKAWA, TATIANA SANTANA BALOGH,
PAULA SOUZA PRESTES, VLADI OLGA CONSIGLIERI, TELMA MARY KANEKO,
MARIA VALÉRIA ROBLES VELASCO, ANDRÉ ROLIM BABY

School of Pharmaceutical Sciences of University of São Paulo, Laboratory of Cosmetology, Dept. of Pharmacy
580 Prof. Lineu Prestes Av., Bl. 13/15, Conjunto das Químicas, Cidade Universitária, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author

Vegetable oils as bioactive adjuvants for sunscreens

KEYWORDS: Bioactive sunscreens; Ethylhexyl methoxycinnamate; Simmondsia chinensis; Cymbidium grandiflorum; Daucus carota L.; Lycopersicon esculentum.

Abstract Nowadays, it is observed the use of naturally occurring plant products for the prevention of UV-induced skin photodamage and for the improvement of Sun Protection Factor (SPF). This research proposed the development and *in vitro* efficacy evaluation of bioactive sunscreens containing vegetable oils associated or not to an UVB filter. Formulations were developed with an anionic self-emulsifying agent. Ethylhexyl methoxycinnamate (EHM) was selected as UVB filter and the next vegetable oils were individually associated or not to the EHM: *Simmondsia chinensis* (jojoba), *Cymbidium grandiflorum* (orchid), *Daucus carota* L. (carrot) and *Lycopersicon esculentum* (tomato). The following determinations were performed (base; base + EHM; base + oils; and base + EHM + oils): pH value, apparent viscosity (cP) and *in vitro* SPF by reflectance spectrophotometry with integrated sphere (RSIS) (Labsphere® UV- 2000S). *One-way* ANOVA followed by Tukey test ($p<0.05$) was the statistical treatment. The pH values of pHmeter ranged from 6.3 to 6.9. It was verified that *L. esculentum* oil promoted the apparent viscosity lowest value (15,600 cp). *In vitro* efficacy indicated the elevation of SPF from 4.25 ± 0.5 (base + EHM) to 7.25 ± 1.5 (base + EHM + *D. carota* L. and base + EHM + *L. esculentum*). A synergism on the SPF increase was statistically identified when 10 percent w/w *D. carota* L. (carrot) oil or 10 percent *w/w L. esculentum* (tomato) oil was individually associated with 7.5 percent w/w EHM. These results indicated that there was a synergism between these oils rich in carotenoid pigments and the employed UVB filter. The RSIS was suitable for the estimation of *in vitro* efficacy through SPF determination of the above bioactive sunscreens.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédicas e Biofarmacêutica

Biopharmaceutical Sciences | *Ciências Biofarmacêuticas* *Biomed Biopharm Res.*, 2014; (11) 2: , 215-225

Impact of stirring speed, glycerin and sodium chloride concentrations on photoprotective nanoemulsions

Impacto da velocidade de agitação, contração de glicerina e de cloreto de sódio em nanoemulsões fotoprotetoras

Débora Granemann e Silva[1], Camila Areias de Oliveira[1], Daniela D´Almeida Peres[1], Margarida Pereira[2], Nicole Pereira[2], Tânia Santos Almeida[2,3], Joana Portugal Mota[2], Catarina Rosado[2], Vânia Rodrigues Leite-Silva[4], Maria Valéria Robles Velasco[1], André Rolim Baby[1]

[1]Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil
[2]CBios - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona, Lisboa, Portugal
[3]Centro de Química e Bioquímica / Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
[4]Instituto de Ciências Ambientais Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema SP, Brasil. Diadema, SP, Brasil
Email: andrerb@usp.br

Fontes de Financiamento: FAPESP e CNPq

Abstract

New technologies that improve the physical as the sensory properties of sunscreens can help to increase its continued use and impact on health. The use of nanoemulsions in the development of photoprotective vehicles is an advantage, since nanostructured components may have superior properties regarding their performance when compared to conventional products. The advantages of using nanobiotechnology in manufacture of cosmetic and dermatological formulations arise from the protection of compounds from chemical or enzymatic degradation, from the control of their release, and also to the prolonged retention time of cosmetic ingredients in the stratum corneum. Thus, this study aimed to evaluate the impact of stirring speed and of glycerin and sodium chloride concentrations in the development and effectiveness of a nanoemulsion containing ethylhexyl methoxycinnamate and benzophenone-3. The results of statistical analyses regarding the impact of the variables in the process of nanoemulsion development showed that these parameters affect the phase inversion temperature (PIT). However, this did not affect the particle size and the photoprotective efficacy in vitro.

Key-words: Nanoemulsion; Photoprotection; Ethylhexyl methoxycinnamate; Benzophenone-3

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Biopharmaceutical Sciences | *Ciências Biofarmacêuticas* *Biomed Biopharm Res.*, 2013; (10) 1: 91-100

Stability and efficacy of sunscreens containing inorganic filters and quercetin

Estabilidade e eficácia de fotoprotetores contendo filtros inorgânicos e quercetina

Deborah de Oliveira Nishikawa, Daniela D'Almeida Peres, Camila Areias de Oliveira, Vânia Rodrigues Leite e Silva, Telma Mary Kaneko, Maria Valéria Robles Velasco & André Rolim Baby
School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo. São Paulo, SP, Brazil
Email: daniela.peres@usp.br

Fontes de Financiamento: FAPESP e CNPq

Abstract

Exposure to the sun can have health benefits, however, excess exposure can cause skin damage, such as skin cancer. Photoprotection can be used as a preventive method against the harmful effects of the ultraviolet (UV) radiation and Brazilian biodiversity is a fertile field for research in this area. Therefore, the aim of this study was the development of sunscreens containing quercetin (bioactive compound) and inorganic filters (titanium dioxide and zinc oxide) with further characterization of the formulae and evaluation of stability. Formulations containing the bioactive compound, isolated or in association with the inorganic filters, presented: pH values biocompatible with the skin; apparent viscosity between 10550 and 23600 cP; sun protection factor (SPF) between 2.1 and 22.5; and broad spectrum protection, with critical wavelengths above 379 nm. It was found that the association of quercetin with inorganic filters was not adequate due to the negative interactions that occurred between the bioactive compound and the metals, which were only identified during the stability study. However, considering the in vitro estimated efficacy of the isolated flavonoid, its use can still be explored as an alternative substitute to classic UV filters.

Keywords: Photoprotection; Quercetin; Stability; Titanium dioxide, Zinc oxide.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Biopharmaceutical Sciences | *Ciências Biofarmacêuticas* *Biomed Biopharm Res.*, 2013; (10) 1: 91-100

Stability and efficacy of sunscreens containing inorganic filters and quercetin

Estabilidade e eficácia de fotoprotetores contendo filtros inorgânicos e quercetina

Deborah de Oliveira Nishikawa, Daniela D'Almeida Peres, Camila Arcuas de Oliveira, Vânia Rodrigues Leite e Silva, Telma Mary Kaneko, Maria Valéria Robles Velasco & Andréa Rolim Baby
School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo. São Paulo, SP, Brazil
Email: daniela.peres@usp.br

Fontes de Financiamento: FAPESP e CNPq

Abstract

Exposure to the sun can have health benefits, however, excess exposure can cause skin damage, such as skin cancer. Photoprotection can be used as a preventive method against the harmful effects of the ultraviolet (UV) radiation and Brazilian biodiversity is a fertile field for research in this area. Therefore, the aim of this study was the development of sunscreens containing quercetin (bioactive compound) and inorganic filters (titanium dioxide and zinc oxide) with further characterization of the formulas and evaluation of stability. Formulations containing the bioactive compound, isolated or in association with the inorganic filters, presented: pH values biocompatible with the skin; apparent viscosity between 10550 and 23600 cP; sun protection factor (SPF) between 2.1 and 22.5; and broad spectrum protection, with critical wavelengths above 379 nm. It was found that the association of quercetin with inorganic filters was not adequate due to the negative interactions that occurred between the bioactive compound and the metals, which were only identified during the stability study. However, considering the in vitro estimated efficacy of the isolated flavonoid, its use can still be explored as an alternative substitute to classic UV filters.

Keywords: Photoprotection; Quercetin; Stability; Titanium dioxide, Zinc oxide.

Biomedical and Biopharmaceutical Research
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Biopharmaceutical Sciences | *Ciências Biofarmacêuticas* *Biomed Biopharm Res.*, 2015; (12) 1: , 107-116

Photostabilization of sunscreens by incorporation of tea as the external phase

Fotoestabilização de protectores solares por incorporação de chás como fase externa

Margarida Pereira[1], Nicole Pereira[1], Catarina Rosado[1], Camila Areias de Oliveira[2], Daniela D´Almeida Peres[2], Maria Eduarda Araújo[3], Maria Valéria Robles Velasco[2], André Rolim Baby[2], Joana Portugal Mota[1*] and Tânia Santos Almeida[1*]

[1]CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona, campo Grande, 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

[2]Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 15, 05508-900, São Paulo, Brasil

[3]Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal and Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

Email: tania.almeida@ulusofona.pt

*Shared senior authorship

Abstract

The use of isolated ultraviolet (UV) filters in photoprotective formulations creates products with limited protection against radiation, emphasising the need to develop formulations containing UVA and UVB filter combinations. However, most of the formulations developed to include both filters are unstable as a result of this combination, as well as by exposure to UV radiation. It is, therefore, crucial to include additives that enable photostabilization. Tea is the second most widely consumed beverage in the world and represents a good source of bioactive compounds, particularly polyphenols, which provide antioxidant activity. In the present work formulations containing green tea or black tea, as well as the sunscreens avobenzone (UVA sunscreen) and octilmetoxinamato (UVB sunscreen), were developed and evaluated in order to develop new and effective photostable formulations providing broad spectrum photoprotection. These formulations have been developed with complete replacement of the external phase of the oil in water (O/W) emulsion by these teas. The results showed that both teas presented photostabilizing capacity, particularly for green tea in the storage conditions at room temperature and at 5 °C, and black tea for the samples stored at 40 °C.