



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

EULLÁLLIA GONÇALO DAS NEVES E SILVA

***ARTEMIA SALINA* LEACH EM FOTOPROTEÇÃO: UM NOVO MODELO PARA
AVALIAR O POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS PARA APLICAÇÃO TÓPICA**

**CAMPINA GRANDE
2023**

EULLÁLLIA GONÇALO DAS NEVES E SILVA

**ARTEMIA SALINA LEACH EM FOTOPROTEÇÃO: UM NOVO MODELO PARA
AVALIAR O POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS PARA APLICAÇÃO TÓPICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração:

Desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Molina Martins

**CAMPINA GRANDE
2023**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586a Silva, Eullália Gonçalo Das Neves e.
Artemia Salina Leach em fotoproteção [manuscrito] : um novo modelo para avaliar o potencial de nanopartículas para aplicação tópica / Eullália Gonçalo Das Neves e Silva. - 2023.
89 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

"Orientação : Prof. Dr. Rodrigo Molina Martins, Departamento de Farmácia - CCBS. "

1. Fotoproteção. 2. Fototoxicidade. 3. Rutina. 4. Radiação ultravioleta. I. Título

21. ed. CDD 615

EULLÁLLIA GONÇALO DAS NEVES E SILVA

ARTEMIA SALINA LEACH EM FOTOPROTEÇÃO: UM NOVO MODELO PARA AVALIAR O POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS PARA APLICAÇÃO TÓPICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração:

Desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

Aprovada em: 02/05/2023.

BANCA EXAMINADORA

**RODRIGO MOLINA
MARTINS:21811438890**

Assinado de forma digital por
RODRIGO MOLINA
MARTINS:21811438890
Dados: 2023.05.26 08:46:26 -03'00'

Prof. Dr. Rodrigo Molina Martins (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Lidiane Pinto Correia
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Dedico, com muito amor e gratidão, a Deus, aos meus pais, ao meu irmão e a todos os que estiveram comigo nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento direciono a Deus, autor de toda minha história, pela dádiva da vida e por me permitir viver tantas realizações como essa. Ele, em sua infinita bondade, encoraja-me, sustenta-me diante dos obstáculos, concede-me sabedoria e me cerca de pessoas incríveis que me ajudam a trilhar os caminhos.

Aos meus pais, João Batista Gonçalo das Neves e Maria do Socorro Silva das Neves, e ao meu irmão, Pitágoras Gonçalo das Neves, que são expressão do amor de Deus, meu muito obrigada por me acompanharem em todo meu crescimento pessoal e me estimular no crescimento profissional. Agradeço por todo esforço investido na minha trajetória acadêmica, por me oferecerem incentivo constante, apoio, refúgio nos momentos de angústia, pelas orações dedicadas e por tanto cuidado e amor dedicado a mim, em todas as fases da minha vida.

Ao meu querido orientador, o professor Rodrigo Molina Martins, digno de todo meu respeito e admiração, meus sinceros agradecimentos por não medir esforços para me ajudar, por me “adotar” e conduzir este trabalho com tanta paciência, dedicação e empatia. Sua humildade para além do campo acadêmico me inspiram e ensinam que, quando se é realizado naquilo que faz, o amor pela profissão transborda em atos de cuidado, respeito e comprometimento. Trilhar mais esse caminho guiada por seu conhecimento trouxe leveza ao processo e esperança nos momentos de dificuldades. Expresso com muito orgulho e felicidade a dádiva de ser sua orientanda mais uma vez, de graduação e agora de pós-graduação. Meu muito obrigada por tudo!

Minha gratidão a Everton Vilar Ramalho, pelo companheirismo, paciência, incentivo e por me ajudar nesta caminhada. Agradeço aos meus amigos Laize Santos, Tayane Barbosa, Camila Lima, Padre Ronaldo Oliveira, Vitória Araújo, Thainá Rodrigues, Anne Cibelle, Anderson Felipe. E, de modo especial, a Darlan Alcântara Sousa e Vitoria da Cunha Ferreira, que muito me ajudaram nessa trajetória, especialmente nessa reta final. A Eder Michel Sousa Teles, que, mesmo fisicamente distante, está presente sempre, em todos os momentos,

procurando me ajudar e me incentivando a alcançar meus objetivos. Vocês são todos muito especiais e sou grata e feliz por contar com cada um de vocês!

Meus agradecimentos a Jacilene Melo, Alanna Gonçalo, Álvaro Gonçalo, Ísis Maria, Emília Moura, Fabiana Fernandes, aos meus padrinhos Verônica Pereira, Amaury Soares, Cassya, Rosimaria Farias e todos os outros da minha família que, assim como estes, vibram com minhas conquistas. E a Samuel, que com sua ingenuidade, traz muita alegria para os meus dias. Ao meu primo, Carlos Aderbal, que comigo compartilhou sua morada e me acolheu como uma irmã, preocupando-se comigo e por muitas vezes indo me deixar e me buscar na universidade, obrigada por tudo!

Meu muito obrigada bastante especial a Gustavo Luís Ferreira Barbosa, pela atenção e disponibilidade para nos ajudar no desenvolvimento deste estudo, sobretudo na parte experimental dedicando seu tempo e por fazer parte da construção deste trabalho. Agradeço a Brenda Maria Silva Bezerra, que esteve no laboratório nos auxiliando, e a Davi Nathan Fernandes dos Santos, que nos ajudou na realização das análises térmicas.

Gratidão à minha dupla, Wedja Marcelino da Silva, que comigo esteve em todas as situações desde o nosso primeiro dia de aula. Nela, encontrei suporte e amizade. Juntas compartilhamos alegrias, tristezas, medos e sempre estivemos nos ajudando. Agradeço também a Talita Nunes Cardoso, pela parceria que deu certo e por todos os auxílios quando precisei. E a Ana Clara Vieira da Cunha, sempre muito prestativa.

À Universidade Estadual da Paraíba, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, ao coordenador Harley da Silva Alves e a todo corpo docente pela transmissão de conhecimentos. Obrigada, Thiago Araújo, por tanta paciência e por estar sempre disponível para sanar minhas dúvidas.

A todos que fazem parte do laboratório de Ensaio Físico-químicos LABDEM I, em especial, ao professor João Augusto Oshiro Júnior, pelo acolhimento, sugestões e prontidão para nos ajudar e a Mariana Rillo Sato, pela receptividade e atenção, e ao professor José Germano Veras Neto.

Ao professor José Pinto de Siqueira Júnior, do Laboratório de Genética de Microrganismos/DBM/UFPB, por ter disponibilizado a lâmpada UVB e o radiômetro, equipamentos necessários para realização dos ensaios frente à radiação UVB.

Aos integrantes do Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), por nos ajudar com análises importantes deste estudo em especial ao pesquisador Dr. Wladimir Jefferson Bacalhau de Sousa e ao professor Dr. Marcus Vinicius Lia Fook.

À professora Maine Virgínia Alves Confessor, da Unifacisa, por ter cedido instrumentos de análise essenciais ao trabalho e aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão (FCFRP), Maria José Vieira Fonseca, Luis Alexandre Pedro de Freitas e Renata Fonseca Vianna Lopez, por terem cedido insumos e instrumentos para que esse trabalho pudesse ser realizado.

À minha banca examinadora, por serem solícitos ao convite do meu orientador. Ao Prof. Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes, no mestrado, tive a oportunidade de tê-lo como professor e suas ricas discussões contribuíram muito para minha formação. Além disso, agradeço pelo auxílio na realização de análises realizadas neste estudo. Muito obrigada! À Prof. Dra. Lidiane Pinto Correia, pessoa e professora incrível, que tive o prazer de conhecer na graduação e ser sua aluna, obrigada por me tratar com carinho, entusiasmo e por me ajudar sempre, inclusive em adversidades dessa trajetória de mestrado. Tens minha admiração. Gratidão por tudo.

Aos meus colegas de trabalho, em especial, a Maria de Lourdes, por compreender esta etapa e minhas ausências, quando necessário.

À UNIFACISA, em nome da coordenadora do curso de farmácia Marisa Torres de Moura Agra, por permitir a realização de análises na instituição e ceder o espaço para defesa.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO

A utilização de animais em pesquisas tem gerado discussões acaloradas por parte da sociedade e da comunidade científica. Este fato, associado à necessidade de comprovar a segurança e eficácia destes produtos, tem levado a um crescente interesse na procura de alternativas mais sustentáveis. Diante desse cenário, o desenvolvimento de novos métodos alternativos torna-se importante até mesmo do ponto de vista econômico. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o uso do microcrustáceo invertebrado *Artemia salina* Leach para ensaios de fototoxicidade e fotoproteção, avaliando assim o potencial de uso de sistemas nanoestruturados para aplicação tópica contra a radiação ultravioleta. Como modelo de produto a ser avaliado, foram produzidas nanopartículas lipídicas sólidas do flavonoide rutina (NLSR), que apresenta diversas atividades, com destaque para a ação antioxidante. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o uso do microcrustáceo invertebrado *Artemia salina* Leach para ensaios de fototoxicidade e fotoproteção, avaliando, dessa forma, o potencial uso de sistemas nanoestruturados para aplicação tópica frente à radiação ultravioleta. As NLSR foram obtidas pela técnica de microemulsão de fusão a quente, usando um homogeneizador de alto cisalhamento. Estas foram caracterizadas e avaliadas quanto ao tamanho médio de partícula ($D_{50} = 185 \pm 12,19$ nm), índice de polidispersão ($PDI = 0,140 \pm 0,11$), potencial zeta ($PZ = -34,04 \pm 1,43$ mV) e eficiência de encapsulação ($EE = 98,82 \pm 0,37\%$), representando valores satisfatórios para aplicação tópica. Em relação à caracterização físicoquímica, determinada por análise térmica (DTA e TG) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier não mostraram nenhuma mudança em relação ao perfil térmico e cristalinidade das NLSR quando comparadas com seus respectivos constituintes. Os resultados de difração de raios X mostraram uma diminuição da cristalinidade nas NLSR. As NLSR foram submetidas a uma avaliação em relação à penetração/permeação *in vitro* usando orelha de porco, em que as NLSR foram capazes de aumentar a penetração da rutina na pele em até três vezes quando comparado à rutina livre com uma concentração de $3,23 \pm 0,54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e não apresentando permeação de rutina no líquido coletor. A avaliação *in vitro* do fator de proteção solar por espectrofotometria (FPS_{UVB}) para as NLSR indicou um aumento maior que 6 vezes com $FPS = 5,44 \pm 2,45$. Em relação aos ensaios com *Artemia salina* L. foi determinado as doses letais frente à radiação UVA ($DL_{50} = 133,2 \pm 0,82$

J/cm²) e UVB (DL₅₀=0,45±0,056 J/cm²) e posteriormente realizados os ensaios de toxicidade, fototoxicidade e fotoproteção. As NLSR foram consideradas atóxicas. No ensaio de fototoxicidade, as NLSR apresentaram ação fotoquimiopreventiva, principalmente frente à radiação UVA. Nos estudos de fotoproteção, as formulações contendo NLSR exibiram uma fotoproteção maior contra a radiação UVB (86,60%±7,64 de viabilidade) do que UVA (58%±10,95 de viabilidade). Em conclusão, o método utilizando a *Artemia salina* L., demonstrou ser uma ferramenta muito eficaz e promissora para avaliar o potencial fototóxico e fotoprotetor de sistemas nanoestruturados.

Palavras-Chave: fotoproteção; fototoxicidade; rutina; radiação ultravioleta.

ABSTRACT

The use of animals in research has generated heated discussions on part of society and the scientific community. This fact, associated with the need to prove the safety and efficacy of these products, has led to a growing interest in the search for an alternative method. Given this scenario, the development of new alternative methods becomes important even from an economic point of view. Therefore, this study aimed to evaluate the use of the invertebrate microcrustacean *Artemia salina* Leach for phototoxicity and photoprotection assays, thus evaluating the potential use of nanostructured systems for topical application against ultraviolet radiation. As a product model, solid lipid nanoparticles of the flavonoid rutin (SLNRs) were produced, which presents several activities, with emphasis on antioxidant action. SLNRs were obtained by the hot melt microemulsion technique using a high-shear homogenizer. These were characterized and evaluated for the average particle size ($D_{50} = 185 \pm 12.19$ nm), polydispersity index ($PDI = 0.140 \pm 0.11$), zeta potential ($PZ = -34.04 \pm 1.43$ mV), and encapsulation efficiency ($EE = 98.82 \pm 0.37\%$), representing satisfactory values for topical application. Regarding the physicochemical characterization, determined by thermal analysis (DTA and TG), and infrared spectroscopy by Fourier transform did not show any change in relation to the thermal profile and crystallinity of the SLNR when compared with their respective constituents. X-ray diffraction results showed a decrease in crystallinity in NLSR. The SLNR were submitted to an in vitro penetration/permeation evaluation using pig ear, where the SLNR were able to increase the penetration of rutin into the skin by up to three times when compared to free rutin at a $3.23 \pm 0.54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ concentration and not presenting rutin permeation in the collecting liquid. The in vitro evaluation of the sun protection factor by spectrophotometry (SPF_{UVB}) for SLNR indicated an increase greater than 6 times with $SPF = 5.44 \pm 2.45$. Regarding the assay with *Artemia salina*, the lethal doses were determined against UVA radiation ($LD_{50} = 133.2 \pm 0.82$ J/cm²) and UVB ($LD_{50} = 0.45 \pm 0.056$ J/cm²) and later performed the toxicity, phototoxicity, and photoprotection essays. SLNRs were considered non-toxic. In the phototoxicity test, the SLNR showed photochemopreventive action, mainly against UVA radiation. In photoprotection studies, formulations containing NLSR exhibited greater photoprotection against UVB radiation ($86.60\% \pm 7.64$ viability) than UVA ($58.00\% \pm 10.95$ viability). In conclusion, the method using *Artemia salina* L., proved to

be a very effective and promising tool to evaluate the phototoxic and photoprotective potential of nanostructured systems.

Keywords: photoprotection; phototoxicity; rutin; ultraviolet radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Radiação solar e esquema representando a penetração nas camadas da pele.....	20
Figura 2 –	Tipos de filtros solares e seus mecanismos de ação.....	24
Figura 3 –	Nanocarreadores lipídicos de primeira e segunda geração.....	28
Figura 4 –	Estrutura molecular da rutina.....	31
Figura 5 –	Esquema representativo do preparo das nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina (NLSR) e nanopartículas lipídicas sólidas sem rutina (NLSB).....	39
Figura 6 –	Esquema representativo do ensaio de permeação/retenção usando célula de Franz.....	44
Figura 7 –	Esquema representativo da avaliação da fotoproteção de formulações usando placa de quartzo e <i>Artemia salina</i>	48
Figura 8 –	Distribuição do tamanho de partícula das NLSs, em que (A) representa as NLSs sem rutina (NLSB) e (B) NLSs com rutina (NLSB).....	51
Figura 9 –	Curva termogravimétrica das NLSs contendo rutina (NLSR), NLSB sem rutina (NLSB), mistura física (MF), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC) e rutina (RUT).....	53
Figura 10 –	Curva calorimétrica das NLSs contendo rutina (NLSR), NLSB sem rutina (NLSB), mistura física (MF), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC) e rutina (RUT)	55
Figura 11 –	Difratograma das NLSs contendo rutina (NLSR), NLSs sem rutina (NLSB), mistura física (MF), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC) e rutina (RUT)	56
Figura 12 –	Espectro de FTIR para NLSs com rutina (NLSR), NLSs sem rutina (NLSB), mistura física (MF), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC) e rutina (RUT).....	57
Figura 13 –	Espectros de absorção de NLSs sem rutina (a), rutina (b) e NLSs contendo rutina (c).....	58
Figura 14 –	Estudo comparativo <i>in vitro</i> da liberação das NLSR e da rutina	

	livre.....	60
Figura 15 –	Estudo da permeação/retenção usando pele de orelha de porco.....	61
Figura 16 –	Efeitos da rutina livre, NLSB e NLSR na avaliação da toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> L. após 24 horas.....	63
Figura 17 –	Mortalidade da <i>Artemia salina</i> L. frente a doses crescentes de UVB.....	65
Figura 18 –	Mortalidade da <i>Artemia salina</i> L. frente a doses crescentes de UVA.....	66
Figura 19 –	Avaliação da fototoxicidade da <i>Artemia salina</i> L. frente à dose letal de radiação UVB em diferentes concentrações de rutina.....	67
Figura 20 –	Avaliação da fototoxicidade da <i>Artemia salina</i> frente à dose letal de radiação UVB em diferentes concentrações de NLSs contendo rutina.....	69
Figura 21 –	Viabilidade da <i>Artemia salina</i> L. frente à dose letal UVA em diferentes concentrações de rutina.....	70
Figura 22 –	Viabilidade da <i>Artemia salina</i> L. frente à dose letal UVA em diferentes concentrações de NLSR.....	71
Figura 23 –	Viabilidade da <i>Artemia salina</i> L. frente à dose letal de UVB usando placa de quartzo.....	73
Figura 24 –	Viabilidade da <i>Artemia salina</i> L. frente à dose letal UVA usando placa de quartzo.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Categorias de fotoprotetores baseados no valor de FPS.....	23
Tabela 2 –	Constituição e concentração dos componentes das formulações tópicas.....	42
Tabela 3 –	Ponderação empregada no cálculo do fator de proteção solar por espectrofotometria.....	46
Tabela 4 –	Propriedades físico-químicas das NLSs.....	51
Tabela 5 –	Dados de TG para NLSs de rotina, mistura física e seus componentes.....	52
Tabela 6 –	Dados de DTA para NLSs de rotina, mistura física e seus componentes.....	54
Tabela 7 –	Quantificação <i>in vitro</i> dos valores de FPS das formulações avaliadas.....	59
Tabela 8 –	Mostra a mortalidade da <i>Artemia salina</i> L. frente a doses crescentes de UVB.....	64
Tabela 9 –	Mostra a Mortalidade da <i>Artemia salina</i> L. frente a doses crescentes de UVA.....	66
Tabela 10 –	Mostra a viabilidade da <i>Artemia salina</i> L. frente à dose letal UVB em diferentes concentrações de rotina.....	67
Tabela 11 –	Mostra a viabilidade da <i>Artemia salina</i> L. frente à dose letal UVB em diferentes concentrações de NLSs de rotina.....	68
Tabela 12 –	Mostra a viabilidade da <i>Artemia salina</i> frente à dose letal em diferentes concentrações de rotina.....	69
Tabela 13 –	Mostra a viabilidade da <i>Artemia salina</i> frente à dose letal em diferentes concentrações de NLSR.....	70
Tabela 14 –	Mostra a viabilidade da <i>Artemia salina</i> L. frente à dose letal de UVB usando placa de quartzo.....	72
Tabela 15 –	Mostra a viabilidade da <i>Artemia salina</i> L. frente à dose letal UVA usando placa de quartzo.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência de Vigilância Nacional
CA	Cera de abelha
CI	Controle irradiado
CLAE	Cromatografia de alta eficiência
CLNs	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CNI	Controle não irradiado
DME	Dose Mínima Eritematosa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raio X
DTA	Análise térmica diferencial
D ₅₀	Distribuição média de tamanho de partículas
DL ₅₀	Dose letal que mata 50 % da população em estudo
Ee	Eficiência de encapsulação
EE	Efeito eritematígeno
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F C	Formulação comercial
F NB	Formulação com NLSB
F NLSR	Formulação contendo nanopartículas de rutina
FP	Formulação contendo apenas os componentes do sistema emulsionado
FPS	Fator de proteção solar
F RL	Formulação contendo rutina livre
FT-IR/FTNIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
IPD	Escurecimento Imediato do Pigmento
IV	Infravermelho
MF	Mistura física
NLSR	Nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina
NLSs	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
NLSB	Nanopartículas lipídicas sólidas sem rutina

O/A	Óleo em água
PDD	Escurecimento Persistente do Pigmento
PDI	Índice de polidispersão
PZ	Potencial zeta
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RUT	Rutina
RUV	Radiação ultravioleta
TGA	Análise termogravimétrica
TG	Termogravimétrica
UV	Ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVA-FP	Fator de proteção UVA
UVB	Radiação ultravioleta B
UVC	Radiação ultravioleta C
3D	Modelo tridimensional
2D	Modelo bidimensional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	Radiação solar e seus efeitos em relação à saúde	20
2.2	Fotoprotetores e fator de proteção solar	22
2.3	Filtros solares e seus mecanismos de fotoproteção	23
2.3.1	<i>Filtros UV inorgânicos</i>	24
2.3.2	<i>Filtros UV Orgânicos</i>	25
2.4	Nanopartículas	26
2.4.1	<i>Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados</i>	26
2.5	Riscos de segurança e saúde de agentes de proteção solar	28
2.5.1	<i>Absorção de protetor solar</i>	29
2.6	Ingredientes ativos naturais em protetores solares	29
2.7	Rutina	30
2.8	Métodos utilizados para avaliação da fotoproteção e fototoxicidade	31
2.9	<i>Artemia salina</i> Leach	36
3	OBJETIVO	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	METODOLOGIA	39
4.1	Preparo das nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina	39
4.2	Caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas	40
4.2.1	<i>Análises de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta</i> ..	40
4.2.2	<i>Determinação da eficiência de encapsulação das NLSR</i>	40
4.2.3	<i>Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimétrica (TG)</i>	41
4.2.4	<i>Análise de Difração de Raios-X</i>	41
4.2.5	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier</i>	41
4.3	Preparo das formulações tópicas	42
4.4	Estudo de liberação <i>in vitro</i>	42
4.5	Estudo da permeação/retenção usando pele de orelha de porco	43
4.5.1	<i>Condições cromatográficas</i>	45
4.6	Atividade fotoprotetora <i>in vitro</i>	45
4.7	Determinação do fator de proteção solar (FPS) por espectrofotometria .	45

4.8	Avaliação da toxicidade das NLSR frente a <i>Artemia salina</i> L.	46
4.9	Estudo de dose resposta frente a radiação UVA e UVB	47
4.10	Estudo de fototoxicidade usando <i>Artemia salina</i> L. frente radiação UVA e UVB.....	47
4.11	Estudo de fotoproteção usando <i>Artemia salina</i> L. frente radiação UVA e UVB.....	48
4.12	Análise estatística dos resultados.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1	Caracterização das nanoparticulas lipídicas sólidas	50
5.1.1	<i>Análise do tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial Zeta e eficiência de encapsulação</i>	50
5.1.2	<i>Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimétrica (TG)</i>	52
5.1.3	<i>Análise de Difração de Raios-X</i>	55
5.1.4	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier</i>	56
5.2	Avaliação <i>in vitro</i> do potencial fotoprotetor e FPS Espectrofotométrico	58
5.3	Liberação do ativo <i>in vitro</i>	60
5.4	Estudo da retenção/permeação usando pele de orelha de porco	61
5.5	Avaliação da toxicidade das NLSR frente a <i>Artemia salina</i> L.	63
5.6	Avaliação da <i>Artemia salina</i> para uso em estudos de fototoxicidade e fotoproteção	64
5.6.1	<i>Estudo de dose resposta frente a radiação UVA e UVB</i>	64
5.6.2	<i>Estudo de fototoxicidade usando <i>Artemia salina</i> L. frente radiação UVA e UVB</i>	66
5.6.3	<i>Estudo de fotoproteção usando <i>Artemia salina</i> L. frente radiação UVA e UVB</i>	72
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

A radiação ultravioleta (UV), que é caracterizada em três tipos (UVA, UVB e UVC), impacta em efeitos para saúde humana. Quando em quantidades adequadas, desenvolve diversos benefícios. Todavia, quando em altos níveis de exposição, podem desencadear efeitos nocivos. E para evitar tais efeitos indesejáveis são adotadas medidas como a utilização de protetor solar (ASSIS et al., 2021; ROBINSON et al., 2021; RODRIGUES; JOSE, 2020). Entretanto, essas formulações possuem algumas limitações principalmente relacionadas à estabilidade, toxicidade, proteção de espectro estreito, penetração indesejável na epiderme da pele e também há evidências recentes que alguns filtros solares possuem alta absorção sistêmica (BHATTACHARJEE et al., 2021; SUH et al., 2020).

A utilização de ingredientes ativos naturais está se tornando o foco de muito interesse, principalmente na área cosmética (GAETANO et al., 2021). Formulações à base de produtos naturais, como plantas e organismos marinhos, são bons candidatos para formulações fotoprotetoras. E tem chamado a atenção devido à alta toxicidade das moléculas sintéticas (JI et al., 2021; NETTO MPHARM; JOSE, 2018; SOLANO, 2020). Os compostos naturais em potencial podem exibir baixa solubilidade, estabilidade e absorção. Porém, estratégias tecnológicas, como a produção de nanopartículas, têm grande potencial em melhorar tais características indesejáveis. Além de promoverem efeitos hidratantes (GAETANO et al., 2021; NETTO MPHARM; JOSE, 2018; SHARMA et al., 2022).

Esses novos sistemas nanotecnológicos são avaliados em relação à sua toxicidade, fototoxicidade e fotoproteção por modelos *in vivo* e *in vitro*. Para experimentos toxicológicos são usados estudos *in vivo* com animais, podendo refletir vários tipos de efeitos de toxicidade (toxicidade aguda, toxicidade subaguda e toxicidade crônica) (ZENG et al., 2019). Para avaliação da fototoxicidade *in vitro* o teste de fototoxicidade de captação de vermelho neutro 3T3 (3T3 NRU PT) é recomendado como ensaio primário (SVOBODOVÁ; ULRICHOVÁ; VOSTÁLOVÁ, 2019).

Dentro dos testes para avaliação da fotoproteção, o teste *in vivo*, realizado em humanos, é o preconizado para determinação do fator de proteção solar (FPS) (BRASIL, 2012). E outros métodos *in vitro* podem ser utilizados na avaliação da fotoproteção na fase do desenvolvimento das formulações (CAMELO;

KELLERMANN, 2021), incluindo métodos espectrofotométricos, métodos biológicos (de culturas de células dérmicas humanas ou de modelo murino (CASTRO; MOTA; LAIGNIER, 2022) e modelos de pele tridimensionais (3D) (MARTINS et al., 2020).

A utilização de modelo animal está sujeita a estritos limites legais, devendo haver o cumprimento do princípio dos 3Rs: substituição, redução e refinamento (MAESTRI, 2021). Os modelos alternativos, ganharam boa expressividade, principalmente na área cosmética, e estão gradativamente substituindo os modelos convencionais (PISTOLLATO et al., 2021).

Entretanto, novos modelos alternativos ainda podem ser explorados com o intuito de diminuir os custos operacionais dos atuais já aprovados. Por exemplo, os modelos baseados em cultura celular são muito dispendiosos com necessidade de uma estrutura laboratorial adequada e direcionada ao seu desenvolvimento, com a utilização de equipamentos específicos, uso de reagentes caros e pessoal altamente qualificado, o que acaba encarecendo economicamente sua aplicabilidade (DOULGKEROGLOU et al., 2020). Já os modelos tridimensionais (3D) são considerados modelos complexos de alto custo e apresentam resultados com alto índice de variabilidade (LANGHANS, 2018). Portanto, explorar novos modelos para a avaliação de toxicidade, fototoxicidade e fotoproteção em etapas preliminares de novos ativos puros ou na forma de sistemas modificados como os nanoestruturados é de suma importância para se diminuir os custos relacionados às etapas iniciais de tais componentes.

A utilização do microcrustáceo invertebrado, *Artemia salina* Leach, pode ser um método promissor para realização de ensaios preliminares para exploração do potencial fototóxico e fotoprotetor, avaliando a resposta biológica frente à radiação UV. Foi demonstrado que as larvas de *Artemia salina* são sensíveis à radiação UV. Sua exposição à radiação UVB afetou a fecundidade, inibiu o crescimento, induziu dano e reparo ao DNA, provocou prejuízos irreversíveis e conduziu a morte dos náuplios (DATTILO et al., 2005). Os náuplios de *A. salina* já têm sido empregados em estudos preliminares de toxicidade (PECORARO et al., 2021).

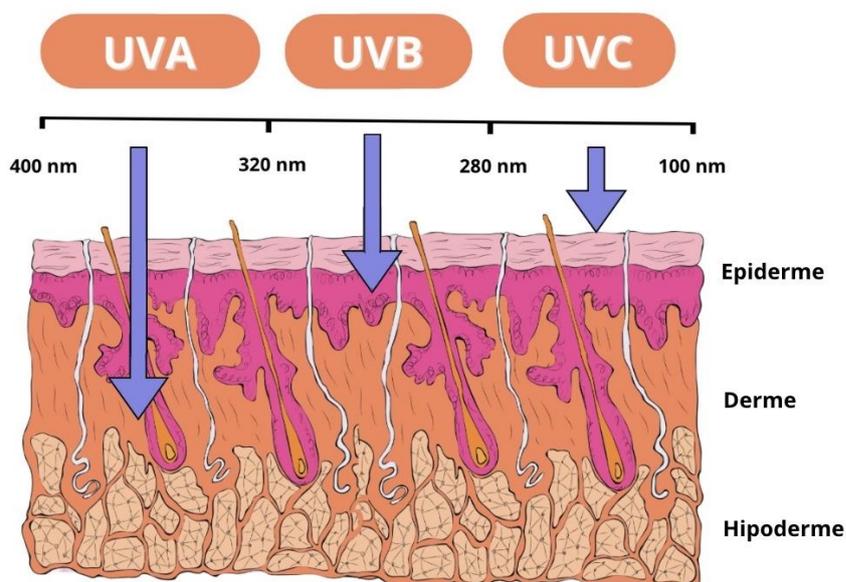
Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o uso da *Artemia salina* L. como um modelo alternativo para ensaios de fototoxicidade e fotoproteção, avaliando, assim, o potencial uso de sistemas nanoestruturados para aplicação tópica frente à radiação ultravioleta.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Radiação solar e seus efeitos em relação à saúde

A luz solar é a fonte primária de energia e componente necessário para a existência humana. A radiação ultravioleta (RUV) representa 5 % de toda luz solar incidente na superfície do planeta. Comparada a outras radiações, possui uma fração bem menor e o maior *quantum* de energia. Pode ser subdividida com base nas propriedades eletrofísicas em componentes UVA, UVB e UVC. Os fótons UVC possuem comprimento de onda mais curtos (100–280 nm) e a energia mais alta. Os fótons UVA possuem os comprimentos de onda mais longos (320–400 nm) e as energias mais baixas. E os fótons UV-B representam valores intermediários entre UVC e UVA (Figura 1) (ANBUALAKAN et al., 2022; BERNARD et al., 2022). Cerca de 90 % da radiação UVB e quase toda radiação UVC são filtradas pela camada de ozônio. Já a radiação UVA atravessa a camada de ozônio quase na sua totalidade, em torno de 95 % (KHAN et al., 2020).

Figura 1 – Radiação solar e esquema representando a penetração nas camadas da pele.



Fonte: adaptada de Ngoc et al. (2019).

A RUV influencia de forma significativa tanto na saúde quanto em doenças humanas. A radiação UVB é o principal determinante para a síntese de vitamina D,

cerca de 90 % dessa vitamina utilizada pelo indivíduo é formada pela ação dos raios UVB na pele. A vitamina D desempenha papel importante no metabolismo ósseo e mineral, função da pele, regulação imunológica, prevenção de vários tipos de câncer e depressão, e auxilia na saúde vascular. Outro benefício importante relacionado à exposição ao sol é a redução da pressão arterial, a redução do risco de desenvolvimento de obesidade e doenças cardiovasculares. Em contrapartida, a exposição de até mesmo 1 hora de RUV extensivamente danifica o genoma (ASSIS et al., 2021; FAN et al., 2021; LEE et al., 2020). Lesões desenvolvidas por radiações UV possibilitam a modificação química e distorção estrutural do DNA, formando fotoprodutos e estresse oxidativo (BARNES et al., 2018).

Estudos epidemiológicos e laboratoriais apontam que a RUV desenvolve efeitos agudos e crônicos na pele. São considerados como principais efeitos agudos as queimaduras solares e fotodermatose, enquanto fotoenvelhecimento, ceratose actínica e câncer de pele são efeitos de longo prazo da exposição solar à RUV. Além da pele, a RUV pode desenvolver efeitos nos olhos, incluindo fotoqueratite, fotoconjuntivite carcinoma de células escamosas da córnea e da conjuntiva, e também no sistema imunológico (MILIGI, 2020).

Por possuir um comprimento de onda mais longo, a radiação UVA pode penetrar profundamente na pele, passando pela epiderme e derme. Este tipo de radiação é pouco influenciada pela altitude ou pelo clima, quando comparados com UVB. O bronzeamento e o escurecimento ocorrem devido a exposição a UVA. Eventos indesejáveis como carcinomas de pele, fotoenvelhecimento, imunossupressão, alergias e danos oculares podem ser gerados pela exposição a esses raios. Os raios UVB podem causar queimaduras solares, eritema, fotocarcinogênese e imunossupressão. Entre todos os raios, o UVC é considerado o mais prejudicial (RODRIGUES; JOSE, 2020).

A radiação ultravioleta tipo B (UVB) e a radiação ultravioleta tipo A (UVA) são consideradas cancerígenas ao ser humano. A radiação UVB interage diretamente com o DNA, provocando danos, dando origem a formação de dímeros de timina. A radiação UVA induz danos diretos e indiretos ao DNA através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a quebras de cadeia simples ou duplas e ligações cruzadas de DNA-proteína e, por meio da oxidação, para formar 8-oxoguanina (GRACIA-CAZAÑA et al., 2020).

Como mecanismo de defesa, em resposta ao dano do DNA nas células, ativa-se o processo de reparo celular por meio da excisão de nucleotídeos, que é responsável pela remoção de fotolesões de DNA induzidas por RUV, e ajuda a manter a integridade genômica das células. A falha neste processo induz à mutagênese e ao desenvolvimento de cânceres de pele (SARKAR; GADDAMEEDHI 2020).

O câncer de pele é a neoplasia mais comum do mundo, que acomete homens e mulheres de todas as cores de pele. Entre os cânceres recém-diagnosticados, um em cada três é um câncer de pele (LAIKOVA et al., 2019). No Brasil, o câncer de pele não melanoma é o tumor mais frequente em ambos os sexos. E a exposição solar excessiva é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pele (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022).

A radiação UVB causa, principalmente, alterações no nível epidérmico, onde essa radiação é captada em grande escala. A quantidade de UVA na luz ambiente é de 10 a 100 vezes maior que a quantidade de UVB; no entanto, a radiação UVB é mais energética do que a radiação UVA. A radiação UVA penetra mais profundamente nas camadas da pele do que o UVB, provocando danos à epiderme e à derme (WANG et al., 2019).

Diante dos riscos resultantes da exposição à radiação UV, várias estratégias são recomendadas para proteção solar, tais como: evitar o sol durante o horário de pico de UV (10h às 16h), usar roupas de proteção e realizar aplicação de protetor solar (ROBINSON et al., 2021).

2.2 Fotoprotetores e fator de proteção solar

Os fotoprotetores, conhecidos como protetores solares, desempenham um papel crítico na redução de distúrbios da pele humana provocados pela exposição solar. Foi comercializado pela primeira vez em 1928, nos Estados Unidos, e seu uso passou a ser parte integrante da estratégia de fotoproteção em todo mundo (NGOC et al., 2019).

Ao longo de décadas, vários protetores solares foram aprimorados em relação à potência de proteção UV. Em 2012, a Comissão Europeia determinou várias categorias de proteção para classificar o Fator de Proteção Solar (FPS) em 'Baixa Proteção' (FPS 6, 10), 'Proteção Média' (FPS 15, 20, 25), 'Alta Proteção' (FPS 30,

50) e 'Proteção Muito Alta' (FPS 50+), devido à enorme heterogeneidade dos protetores solares no mercado (Tabela 1) (SINGER; KARRER; BERNEBURG, 2019).

Tabela 1 – Categorias de fotoprotetores baseados no valor de FPS.

Nível de proteção	Valor do FPS
Muito alto	> 50
Alto	30 – 50
Médio	15 – 25
Baixo	06 – 10

Fonte: Singer Karrer, Berneburg (2019).

O fator de proteção solar (FPS) é o dado que quantifica o grau de proteção de um filtro solar. É uma medida relativa da quantidade de tempo que uma pessoa pode ficar exposta ao sol antes de desenvolver uma resposta de eritema aos raios solares UV. O valor do FPS deve ser testado a cada novo protetor solar (THROM et al., 2021).

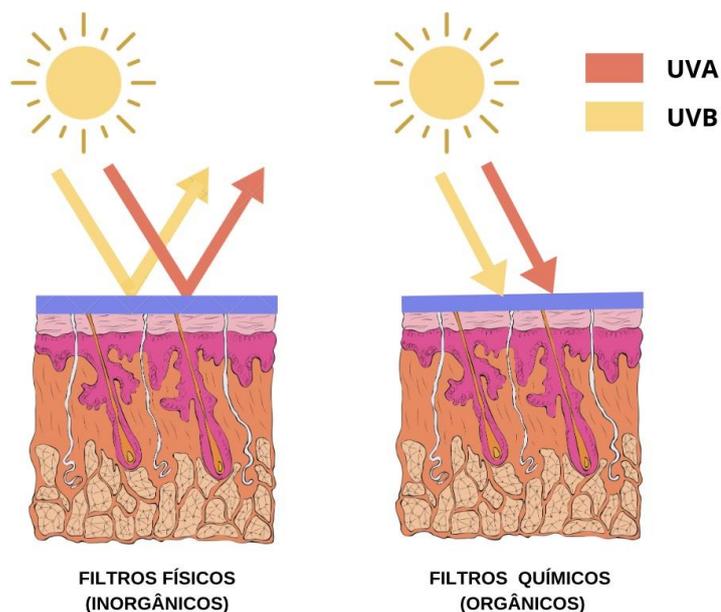
Quanto maior o valor do FPS, maior a proteção que o produto oferece. Portanto, a eficácia de um protetor solar, geralmente, é expressa pelo FPS que pode ser determinado *in vivo* ou *in vitro* (OPRIS et al., 2021).

2.3 Filtros solares e seus mecanismos de fotoproteção

Os filtros solares estão presentes nas formulações fotoprotetoras interferindo diretamente na radiação solar, os quais podem agir por meio da absorção, reflexão ou dispersão de energia. Com base em seu mecanismo de ação, são categorizados basicamente em duas classes: protetores solares químicos ou orgânicos e protetores solares físicos ou inorgânicos (Figura 2) (SCHNEIDER; LIM, 2019).

Os filtros devem permanecer na superfície do estrato córneo após aplicação para manterem a eficácia e serem farmacologicamente inertes. A penetração dos filtros solares na pele, além de comprometer a sua capacidade de fotoproteção, também pode acarretar em reações tóxicas e alérgicas graves na pele (DAHABRA et al., 2021).

Figura 2 – Tipos de filtros solares e seus mecanismos de ação.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

2.3.1 Filtros UV inorgânicos

Filtros inorgânicos protegem a pele humana do contato direto com a luz solar, refletindo ou espalhando a radiação UV. A eficácia dos protetores solares é determinada por suas propriedades reflexivas que incluem o índice de reflexão (quanto maior, melhor o filtro UV), o tamanho das partículas (quanto menor, mais atraente cosmeticamente), a espessura do filme (um revestimento espesso fornece um grau maior de reflexão, no entanto não é esteticamente atraente) e a dispersão da base (GABROS; NESSEL; ZITO, 2022).

São considerados menos tóxicos, mais estáveis e mais seguros quando comparados aos filtros UV orgânicos, devido à baixa permeabilidade através das camadas da pele. Os agentes atuais são óxido de zinco, dióxido de titânio, calamina, ichthammol, talco e petrolato veterinário vermelho (DAHABRA et al., 2021; NGOC et al., 2019). Por cobrirem todo o espectro ultravioleta, são considerados de amplo espectro (GEOFFREY; MWANGI; MARU, 2019).

As formulações iniciais de protetores solares contendo filtros físicos geralmente são visíveis devido aos resíduos de pigmento branco deixados na pele, ficando com aparência branca e calcária, sendo mais visíveis em pele escura. Para

estética e satisfação do consumidor, foram desenvolvidas novas formulações com partículas menores, culminando o uso de nanopartículas (SCHNEIDER; LIM, 2019).

2.3.2 Filtros UV Orgânicos

Os filtros orgânicos são classificados em filtros UVA (antranilatos, benzofenonas e dibenzoilmetanos) ou filtros UVB (derivados do ácido para-aminobenzóico, salicilatos, cinamatos e derivados da cânfora), que participam da absorção do protetor solar. Apresentam propriedades estéticas (não mancham a pele) e de segurança (estabilidade, não irritantes, não voláteis, não fotossensibilizantes) (NGOC et al., 2019). São compostos aromáticos ligados, no geral, a um grupo carbonila (GEOFFREY; MWANGI; MARU, 2019). Para esses filtros UV orgânicos fornecerem um amplo espectro e também elevarem os valores de FPS, são usados principalmente em combinações em níveis permitidos pelo Agência de Vigilância Nacional (ANVISA) (NGOC et al., 2019).

Os filtros orgânicos absorvem os raios UV prejudiciais antes da chegada até a pele e os convertem em radiação de baixa energia, considerada relativamente segura (ROMANHOLE et al., 2020). Agem absorvendo energia através de cromóforos, que são átomos insaturados ou grupos funcionais responsáveis por absorver e refletir a luz em ângulos distintos. Nos filtros orgânicos, os cromóforos sofrem uma deslocalização dos elétrons π em sistemas altamente conjugados, passando a molécula do estado fundamental para um estado excitado (PAN et al., 2022).

Os filtros orgânicos, quando interagem com a RUV, age de três diferentes maneiras: liberando a energia incidente na forma de calor, sofrendo alterações em sua conformação molecular e emitindo radiação em um comprimento de onda maior (EGAMBARAM; PILLAI; RAY, 2020). Absorvem os raios UV prejudiciais antes da chegada até a pele e os convertem em radiação de baixa energia, considerada relativamente segura (ROMANHOLE et al., 2020).

Há crescentes indícios de absorção sistêmica, fotodegradação e possível carcinogenicidade de filtros UV orgânicos. Portanto, o uso de nanopartículas como veículo de entrega para essas moléculas apresenta vantagens potenciais (NG'ETICH; MARTINCIGH, 2021).

2.4 Nanopartículas

A bio-nanotecnologia é a vinculação entre a ciência e a nanotecnologia. É um ramo que tem crescido como um registro de criação rápida com sua aplicação em ciência e inovação com o intuito final de obter novos materiais em nível de nanoescala. As partículas coloidais são chamadas de nanopartículas (RODRIGUES; JOSÉ, 2020).

As nanopartículas estão dentro de uma faixa de tamanho de 1 a 1000 nm. Podem ser carregadas com compostos ativos aprisionados ou adsorvidos na superfície do núcleo (ZIELIŃSKA et al., 2020). Possuem uma ampla aplicação na indústria cosmética e é uma área de investigação e pesquisa em andamento (SCHNEIDER; LIM, 2019).

Existem dois tipos principais de sistemas de nanocarreadores, líquidos e sólidos. Os sistemas líquidos incluem nanoemulsões e nanolipossomas; e os sólidos incluem nanopartículas lipídicas (nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados), nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas) e nanocristais. Dentre esses, as nanopartículas lipídicas sólidas vêm atraindo considerável atenção para aplicação cutânea (PESSOA et al., 2021).

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) são considerados como um sistema de entrega alternativo e exclusivo para aplicações dérmicas aprimoradas quando comparados com formulações tópicas e dermatológicas tradicionais. Desenvolvem efeitos desejáveis na pele, são adequados para pele danificada ou inflamada pois são preparados com lipídeos não irritantes e não tóxicos. Formam filme na pele o que reduz a perda transdérmica e também favorece a penetração do ativo na pele (DUDHIPALA; GORRE, 2020).

2.4.1 Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados

As NLSs foram elaboradas como carreadores alternativos aos sistemas carreadores convencionais, como lipossomas e emulsões (JOSE; NETO, 2019). Por apresentarem características específicas, como o uso de componentes naturais de fabricação, tamanho e distribuição estreita relacionada, otimização da estabilidade,

maior permeabilidade e solubilidade, biocompatibilidade, facilidade no processo de fabricação e diferentes vias de administração possíveis, como administração tópica, oral, parenteral, ocular, pulmonar, cerebral (NEGAHDARI et al., 2021; PANDEY, 2020).

São consideradas como um dos carreadores de fármacos mais seguros e eficazes. Parâmetros como a capacidade do ativo atravessar as barreiras biológicas, promover uma liberação sustentada e estável são essenciais para uma entrega eficaz de NLSs. São usadas como carreadores em preparações de filtros solares (RODRIGUES; JOSÉ, 2020). E permitem que a maioria das formulações sejam aplicadas de maneira suave e transparente, devido ao pequeno tamanho das partículas (SCHNEIDER; LIM, 2019).

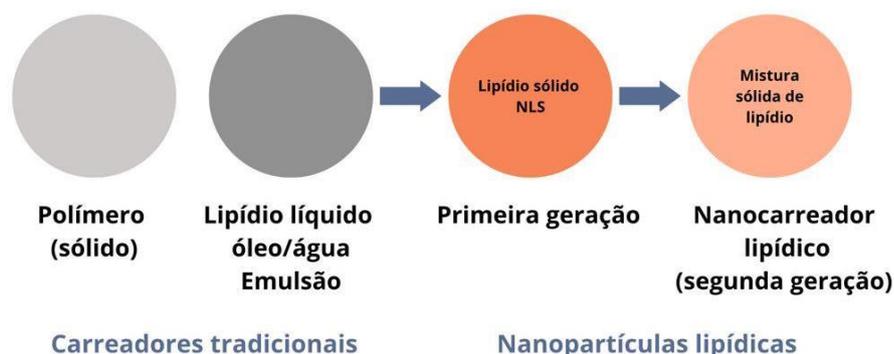
As NLSs são nanoesferas consideradas de primeira geração (Figura 3) e são compostas de um núcleo lipídico sólido. Sua matriz sólida pode proteger de forma eficaz os ativos farmacêuticos contra a degradação química e proporcionar modificação dos perfis de liberação do fármaco. São sólidas à temperatura ambiente e biológica (APOLINÁRIO, 2020). São de fácil obtenção e comercialização devido à alta disponibilidade de lipídeos (MUSIELAK; FELICZAK-GUZIK; NOWAK, 2022).

Apesar de exibir diversas vantagens, as NLSs possuem algumas limitações que incluem: carregamento limitado de ativos, expulsão do ativo do núcleo e cristalização durante o armazenamento. Para superar tais limitações, os transportadores lipídicos nanoestruturados foram desenvolvidos como segunda geração de nanopartículas lipídicas (SHIRODKAR et al., 2019).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) são considerados uma modificação das nanopartículas lipídicas sólidas, havendo presença de lipídios sólidos e líquidos à temperatura ambiente (Figura 3). A presença de um lipídeo líquido na matriz sólida resulta em imperfeições, espaçamento na sua matriz, maior capacidade de carga e preserva sua estabilidade física (APOLINÁRIO, 2020).

A composição dessas nanopartículas, juntamente com suas características, tornam os NLSs e CLNs ideais para o transporte/entrega de ativos sensíveis, protegendo-os contra a degradação química. Ambos, podem combinar vantagens como a liberação controlada, produção em larga escala, facilidade de aplicações por diversas vias e ainda são toxicologicamente aceitáveis (BORGES, 2020; DUDHIPALA; GORRE, 2020).

Figura 3 – Nanocarreadores lipídicos de primeira e segunda geração.



Fonte: adaptada de Sharma et al. (2018).

2.5 Riscos de segurança e saúde de agentes de proteção solar

Os protetores solares devem ser seguros, atóxicos, não irritantes, quimicamente inertes, além de promover proteção contra o amplo espectro que pode evitar a fotocarcinogênese e o fotoenvelhecimento. Entretanto, eles também desenvolvem efeitos negativos, como sensibilidade de contato, estrogenicidade, dermatites e risco de deficiência de vitamina D (NGOC et al., 2019).

Os protetores solares sintéticos são os mais comumente comercializados. No entanto, existe uma preocupação em relação ao tempo de contato prolongado dos protetores solares químicos na pele que pode provocar a entrada indesejável na epiderme da pele, afetando adversamente a biologia da pele (YAMADA; MOHAMMED; PROW, 2020).

O ácido para-aminobenzóico e oxibenzona são ingredientes geralmente presentes em formulações de proteção solar e podem desencadear problemas de pele (NGOC et al., 2019). Em Key West e no Havaí, a utilização de oxibenzona e octinoxato foram recentemente proibidos, por exibirem efeitos tóxicos ao meio marinho. Portanto, seu impacto na saúde humana deve ser analisado de forma minuciosa (SUH et al., 2020).

Há relatos que a maior incidência de melanoma é resultante do uso de filtro solar. Alguns protetores solares comercializados absorvem completamente UVB, entretanto permitem a passagem de grandes quantidades de UVA, o que pode ser um fator contribuinte para o desenvolvimento de melanoma em populações em latitudes > 40° (NGOC et al., 2019).

As reações adversas relatadas mais comuns relacionadas ao uso de protetores solares incluem irritação (como queimação e ardor) com ausência de erupção cutânea, dermatite de contato irritante e de contato alérgica e fotoalérgica e comedogenicidade (SANDER et al., 2020).

2.5.1 Absorção de protetor solar

Há evidências recentes que ingredientes de filtros solares possuem alta absorção sistêmica, o que gerou preocupação em relação à segurança dos produtos de proteção solar (SUH et al., 2020). Ensaio clínico randomizado com 24 participantes demonstrou exposição sistêmica de 4 ingredientes ativos comumente utilizados em produtos de proteção solar: oxibenzona, avobenzona, octocrileno e ácido tereftalilideno dicanfor sulfônico. Em outros estudos, foi possível observar a absorção sistêmica de alguns ingredientes do filtro solar. Além disso, ingredientes de proteção solar foram encontrados no leite materno, no líquido amniótico, na urina e no sangue (MATTA et al., 2019).

2.6 Ingredientes ativos naturais em protetores solares

Os filtros solares sintéticos são amplamente utilizados para evitar o surgimento na pele de queimaduras solares, fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese. No entanto, a segurança e eficácia da maioria dos ingredientes dos protetores solares sintéticos são prejudicadas por sua fotoestabilidade, toxicidade e danos aos meios marinhos (HAILUN et al., 2021). Alguns filtros solares decompõem-se na presença de luz solar conduzindo a uma deficiência na proteção solar resultando em riscos ao usuário (BHATTACHARJEE et al., 2021).

Uma grande preocupação na comunidade científica, hoje em dia, é relacionada à capacidade de produtos químicos sintéticos e outros compostos orgânicos presentes em formulações de protetores solares, de permearem pela pele e atingirem a corrente sanguínea após aplicação tópica (RODRIGUES; JOSE, 2020). Portanto, com o intuito de reduzir a irritação da pele e outros efeitos nocivos associados aos filtros solares estão sendo realizadas pesquisas sobre o uso de ingredientes naturais para estas formulações (CEFALI et al. 2019).

As plantas e também organismos marinhos, atualmente, são vistos como ricas fontes de compostos para o combate ao fotoenvelhecimento e fotoprotetores, sendo propícios para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos tópicos (KOSTYUK et al., 2018).

Os compostos naturais merecem destaque por apresentarem baixa toxicidade e atividade antioxidante quando comparados aos produtos artificiais. Sendo, portanto, potenciais ingredientes de proteção solar. Além disso, estudos demonstram que extratos de plantas naturais melhoram o FPS de formulações fotoprotetoras (HAILUN et al., 2021; RODRIGUES; JOSE, 2020).

Tem sido proposto que, ao aumentar os constituintes naturais ativos nas formulações de protetores solares, pode haver melhora das qualidades fotoprotetoras dessas formulações, oferecendo maior proteção aos usuários. No entanto, há pouca pesquisa clínica que demonstre especificamente os ingredientes, as concentrações e combinações com outros materiais capazes de oferecer benefícios para a pele humana (MATSUI et al., 2009).

2.7 Rutina

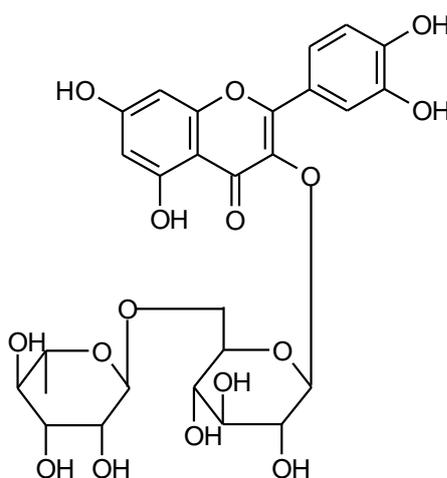
A rutina é um ramnoglicosídeo de quercetina, também conhecido como rutoside, ou quercetina-3-rutinosídeo, pertence à classe de flavonoides, e é um dos principais fotoquímicos terapeuticamente ativos e um dos principais constituintes bioativos de vários alimentos e bebidas naturais. É encontrada em maçãs, frutas cítricas, chá, vinho tinto, farinha de trigo sarraceno (PINZARU et al., 2021; SEMWAL et al., 2021).

Foi atestado que mais de 70 plantas, incluindo *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) e *Sophora japonica* L. (Fabaceae), *Strelitzia reginae* Banks ex Aiton (Strelitziaceae), *Maranta leuconeura* (Marantaceae), *Orchidantha maxillarioides* (Labiaceae), *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae), *Canna indica* L. (Cannaceae) e *Canna edulis* Ker Gawl. (Cannaceae), são fontes de rutina (SATARI et al., 2021).

A rutina, também chamada de vitamina P, é considerada um dos melhores antioxidantes naturais da classe natural conhecida. Além disso, possui várias propriedades terapêuticas como antibacteriana, antiprotozoária, antitumoral, anti-inflamatória, antialérgica, antiviral, anti-hipertensiva e antiplaquetária. Apresenta efeitos benéficos em diferentes distúrbios da pele, como envelhecimento, psoríase,

dermatite de contato e dermatite alérgica. Usa-se rutina em alimentos como corante, antioxidante, conservante, estabilizante e absorvente de UV. É também usada em medicamentos fitoterápicos e em cosméticos (PATEL; PATEL, 2019; PINZARU et al., 2021).

Figura 4 – Estrutura molecular da rutina.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Uma desvantagem da rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$) (Figura 4) é a baixa solubilidade em água, que resulta em uma baixa biodisponibilidade e instabilidade metabólica (PINZARU et al., 2021; ANVISA, 2010). No entanto, estudos anteriores sugeriram que a rutina, na forma de nanopartículas ou complexos, exibe biodisponibilidade desejável e, portanto, maior eficácia (DEEPIKA et al., 2019).

A rutina sequestra radicais livres gerados pela radiação UV e pode ser utilizada em formulações tópicas para redução de uso inadequado de filtro UV. Quando produzida em nanopartículas lipídicas sólidas favorece a sua penetração na pele, potencializa a aplicação e intensifica sua ação (MARTINS et al., 2020; MARTINS et al., 2022).

2.8 Métodos utilizados para avaliação da fotoproteção e fototoxicidade

A maioria dos avanços existentes nas ciências biológicas depende da estrutura metodológica de modelos animais vivos. Para prever a toxicidade em

humanos, pesquisas farmacêuticas e industriais usam testes em animais. Os animais comumente utilizados para teste *in vivo* são camundongos, ratos, peixes e pássaros. Apesar de tamanho sucesso, o custo com animais é altíssimo. No geral, os testes em animais variam de 1,5× a >30× mais caros que os testes *in vitro*. Além de dispendiosos, muitos testes em animais são demorados, requer mão de obra e trazem potenciais problemas éticos (MEIGS et al., 2018; NORMAN, 2019; WANG; XU; YIN, 2023).

Além disso, o uso de animais para pesquisa gera preocupações relacionadas à dor e ao sofrimento induzidos experimentalmente. Diante disso, foram propagados os princípios dos 3Rs no final dos anos 1950, que consiste na redução (do inglês, *reduction*), refinamento (do inglês, *refinement*) e substituição (do inglês, *replacement*) de modelos animais em pesquisas científicas, fazendo com que fossem consideradas abordagens alternativas possíveis para compreender os mecanismos envolvidos (ARCK, 2019).

Com a intenção de apoiar o desenvolvimento de metodologias alternativas, em 2012, o Ministério da Ciência, Tecnologia Inovação e Comunicação, instituiu a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), através da Portaria nº 491, de 3 de julho (RENAMA, 2012).

A cultura celular é um método alternativo que ajuda na percepção dos mecanismos biofísicos e biomoleculares fundamentais pelos quais as células se agrupam em tecidos e órgãos e auxilia também na compreensão das funções fisiológicas das células e ruptura durante a doença. É comumente utilizada em pesquisa biomédica, engenharia de tecidos, medicina regenerativa, bem como em outras práticas industriais (SAYDÉ et al., 2021). Este modelo é incapaz de demonstrar as complexidades associadas à aplicação do protetor solar na pele (YAMADA; MOHAMMED; PROW, 2020).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 9, de 14 de março de 2011, dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia, alertando para as considerações, cuidados e protocolos exigidos (BRASIL, 2011).

A tradicional cultura de células bidimensionais (2D) é empregada há séculos e é bastante utilizada em estudos toxicológicos. Seu uso resultou em constituições significativas para toxicologia (IPEK; ÜSTÜNDAĞ; EKE, 2022). Ainda é a referência

para a maioria das áreas de pesquisa, incluindo testes farmacêuticos, isso devido à falta de protocolos robustos e reprodutíveis estabelecidos e às dificuldades em obter leituras e imagens bioquímicas precisas em sistemas de cultura 3D (TEMPLE et al., 2022).

Culturas de células 2D são cultivadas como monocamadas em superfícies planares. Estas possuem certas limitações, como a incapacidade de reproduzir o micro e microambiente celular em sua totalidade e são frequentemente consideradas como modelos pré-clínicos ineficazes para triagem de drogas e estimativa de toxicidade e eficácia de drogas *in vivo* (AGRAWAL et al., 2021).

Para superar essas limitações, foram desenvolvidas novas plataformas de cultura de células tridimensionais (3D) para melhor se assemelhar às condições *in vivo* (SAYDÉ et al., 2021). Pode recapitular o microambiente da célula, então, torna-se um modelo mais realista quando comparado com a cultura celular tradicional (İPEK; ÜSTÜNDAĞ; EKE, 2022). A cultura celular 3D apresenta um grande potencial em pesquisas toxicológicas (WANG; XU; YIN, 2023), desenvolvimento de novas drogas ou classe de drogas e em uma variedade de campos (TEMPLE et al., 2022).

Na última década, surgiram técnicas baseadas em culturas 3D usando vários modelos de pele reconstruída em 3D e são usadas no campo da pesquisa. Esses modelos imitam a pele natural humana, resultando em grandes descobertas de medicamentos (MEENA; MOHANDASS, 2019). Os modelos de pele tridimensionais (3D) oferecem um melhor entendimento sobre as vias moleculares subjacentes e permite a avaliação da segurança e eficácia dos compostos ativos. É um modelo que pode ser utilizado para avaliação de fotoproteção (MARTINS et al., 2020; MARTINS et al., 2022).

Os bioensaios visam demonstrar respostas de organismos vivos em técnicas *in vitro* e torna-se um desafio desenvolvê-los e validá-los. Para garantir a reprodutibilidade, precisão e acurácia é necessário conhecer minuciosamente o mecanismo que envolve e seu alvo de estudo, para impor os pontos críticos que devem ser avaliados e controlados durante o processo. Diante disso, várias características devem ser constantemente analisadas, tais como manutenção da viabilidade da cultura celular, reagentes utilizados, sensibilidade das técnicas, que envolvem comumente sinais colorimétricos, luminescentes ou fluorimétricos (CASTRO; MOTA; LAIGNIER, 2022).

Para avaliação da fototoxicidade de substâncias, o ensaio primário recomendado é o teste de fototoxicidade de captação de vermelho neutro 3T3 (3T3 NRU PT). Consiste em um método *in vitro* que mede a viabilidade celular em fibroblastos de pele de camundongo 3T3 como uma alternativa para avaliação da fototoxicidade após exposição à radiação UV. Realiza a comparação da citotoxicidade do composto testado na presença e na ausência de exposição a uma dose não citotóxica de luz UV. 24 horas após o tratamento, a citotoxicidade é avaliada pela captação de vermelho neutro (NRU). Uma das limitações conhecidas deste teste é a baixa solubilidade em água, sendo um problema para o teste produtos muito lipofílicos. Alguns ensaios mostraram que um resultado fototóxico positivo obtido através deste teste pode não se correlacionar com resultados em voluntários humanos (KIM et al., 2020; SVOBODOVÁ; ULRICHOVÁ; VOSTÁLOVÁ, 2019).

O uso de métodos alternativos para teste de produtos e testes pré-clínicos aumentou significativamente. O uso de “animais alternativos” como insetos, peixes, vermes e camarões ganhou espaço e passaram a ser muito utilizados (NORMAN, 2020). Nos últimos anos, tem sido crescente a utilização de *Artemia salina* para desenvolver ensaios toxicológicos. Muitas características, incluindo características fisiológicas, como disponibilidade imediata, múltiplos estágios de vida e simples cultura de laboratório, fazem da *A. salina*, um organismo modelo adequado para o desenvolvimento de estudos em toxicologia (ZHU et al., 2017).

O ensaio de toxicidade de ativos em *Artemia* são de baixo custo, continuamente acessíveis e estáveis (HNAMTE; KAVIYARASU; SIDDHARDHA, 2020). Além disso, possuem alta reprodução e requisitos mínimos a serem atendidos, que são principalmente relacionados às condições experimentais (temperatura, pH médio, salinidade, aeração e luz). Estas vantagens chama atenção para utilização desse camarão salmoura em pesquisas (YADAV; MOHITE, 2020; TURAN; MAMMADOV, 2021). Para realização desses ensaios são utilizados os náuplios que possuem uma maior sensibilidade a agentes tóxicos em comparação com a *Artemia* adulta (TROMPETA, 2019).

A eficácia dos fotoprotetores pode ser estabelecida também por metodologias *in vivo* e *in vitro*, através da obtenção do fator de proteção solar (FPS) (BALOGH et al., 2011). A avaliação do FPS, comumente utilizada no Brasil e aceita pela ANVISA conforme a RDC nº 237, de 22 de agosto de 2002, consiste no aparecimento do eritema na pele, resultante da exposição à radiação solar. O valor do FPS é definido

como sendo a dose mínima eritematosa na pele protegida pelo fotoprotetor dividida pela dose mínima eritematosa na pele não protegida (equação 1).

Equação 1

$$FPS = \frac{DME \text{ (pele protegida)}}{DME \text{ (pele não protegida)}}$$

Onde:

DME = Dose Mínima Eritematosa (dose mínima de radiação UV necessária para desenvolver a primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta).

Para determinação *in vivo* do valor do FPS, a Agência Reguladora Norte-Americana, *Food and Drug Administration* (FDA) em 1978, propôs a seleção de 10 a 20 voluntários de fototipo I a III para serem submetidos a doses progressivas de radiação UV emitidas por um simulador de luz solar, em regiões não protegidas e protegidas pelo protetor solar avaliado em quantidade de 2 mg/cm² (CAMELO, KELLERMANN 2021).

Escurecimento Persistente do Pigmento (PPD), Escurecimento Imediato do Pigmento (IPD) e fator de proteção UVA (UVA-FP) são métodos utilizados para determinação *in vivo* do fator de proteção UVA. Os protetores são pesados na quantidade definida e aplicados na pele do participante, após secagem são expostos à radiação UVA. Para realização, tanto do método de medição do FPS quanto do teste de PPD, é selecionado um número específico de voluntários sadios com tipo de peles Fototipos II, III e IV (pele sensível, normal e minimamente sensível, respectivamente) que atentam aos critérios estabelecidos (HEDAYAT, 2020).

O UVA-PF avalia a resposta eritematosa mínima e a pigmentação permanente causada pela irradiação UVA. O escurecimento imediato do pigmento (IPD) ocorre no estágio inicial a ~1 J/cm² em minutos e dura horas. Neste método, realiza a medição da menor dose de UVA necessária para produzir um escurecimento da pele após a irradiação UVA e é, geralmente, realizado em peles dos tipos III e IV. O PPD ocorre a >11,0 J/cm², é fundamentado na resposta de pigmentação tardia ou persistente da pele exposta à radiação UVA e costuma ser usado para medir a proteção que o filtro solar oferece contra a radiação na faixa UVA (EGAMBARAM; PILLAI; RAY, 2020; YARDMAN-FRANK; FISHER, 2021).

As análises dos fatores de proteção frente à radiação UVA e UVB *in vivo* são complexas e onerosas, pois envolvem uso de animais e humanos e, conseqüentemente, aspectos relativos à ética e contratação de técnicos especializados. Em alternativa, existem diversas vantagens em utilizar as metodologias *in vitro* durante a fase de desenvolvimento do produto, pois apresentam boa correlação com os ensaios *in vivo* e são economicamente viáveis, rápidos, mais seguros e atendem aos aspectos éticos. Inclusive, diversos estudos estão empregando metodologias *in vitro* com modelos biológicos, nos quais utilizam cultura de células geneticamente modificadas com intuito de predizer mecanismos de fotoproteção de diversos compostos (CASTRO; MOTA; LAIGNIER, 2022).

Os métodos *in vivo* são os preconizados para a determinação do FPS, no entanto, os métodos *in vitro* podem ser utilizados para avaliação prévia das formulações durante seu desenvolvimento, antes de ser encaminhado para teste realizados em voluntários humanos (CAMELO, KELLERMANN, 2021).

A determinação do FPS *in vitro* pode ser realizada por meio da leitura espectrofotométrica de suas soluções diluídas e, posteriormente, há um tratamento matemático por meio dos valores de absorbância obtidos (ANTUNES et al., 2021). Um outro método *in vitro* para a avaliação de FPS de protetores solares envolve a transmitância. O equipamento mede a transmitância difusa da amostra de protetor solar em um intervalo espectral de 250 a 450 nm. Uma lâmpada de xenônio emite um feixe de luz difusa intensa e uniforme que ilumina a amostra (que é aplicada na quantidade de 2 mg/cm) por meio de uma esfera integradora. O *software* realiza o cálculo automático do FPS, da relação UVA/UVB (FOGAÇA, 2019).

Os métodos espectrofotométricos apresentam limitações, principalmente relacionadas a fatores extrínsecos, como os diferentes solventes nos quais os filtros solares são dissolvidos, a combinação e concentração dos filtros solares ativos, interações entre o veículo e os componentes das formulações, o pH, propriedades reológicas, tipo do espectrofotômetro utilizado e rugosidade do substrato (CASTRO; MOTA; LAIGNIER, 2022).

2.9 *Artemia salina* Leach

A *Artemia* L. é um microcrustáceo da ordem Anostraca, pertencente à família Artemiidae, que é encontrado em muitos ecossistemas de água salgada, capaz de

sobreviver em altas taxas de salinidade (4,5-340 ‰). Os náuplios (forma de larva) têm crescimento ótimo a 28 °C. É um dos alimentos vivos mais populares, conveniente e econômico usado na larvicultura de peixes e mariscos. Este invertebrado é capaz de ingerir partículas com tamanho menor que 50 µm (BANTI; HADJIKAKOU, 2021; LISH et al., 2019; STAPPEN et al., 2020; TURAN; MAMMADOV, 2021).

Além das aplicações práticas, as *Artemias* são organismos que chamam atenção em relação ao ponto de vista fisiológico, pois os diferentes estágios do ciclo de vida da *Artemia* oferecem muitos exemplos de notáveis mecanismos fisiológicos (LOPALCO et al., 2019).

O zooplâncton é usado como organismo modelo na avaliação da toxicidade devido diversas características, como alta produção de descendentes, eclosão rápida, fácil acessibilidade de náuplios, pequeno tamanho corporal, simplicidade de cultivo e custo-benefício (LISH et al., 2019).

Os cistos de *A. salina* estão disponíveis para comercialização e são amplamente utilizados na aquicultura e também têm sido usados para avaliação da toxicidade potencial de poluentes (ZHU et al., 2017).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Usar o microcrustáceo *Artemia salina* L. como modelo alternativo em ensaios preliminares para avaliação do potencial fototóxico e fotoprotetor de sistemas nanoestruturados, usando as NLSR como modelo de produto a ser avaliado frente à radiação UVA e UVB.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos a serem alcançados por este trabalho são:

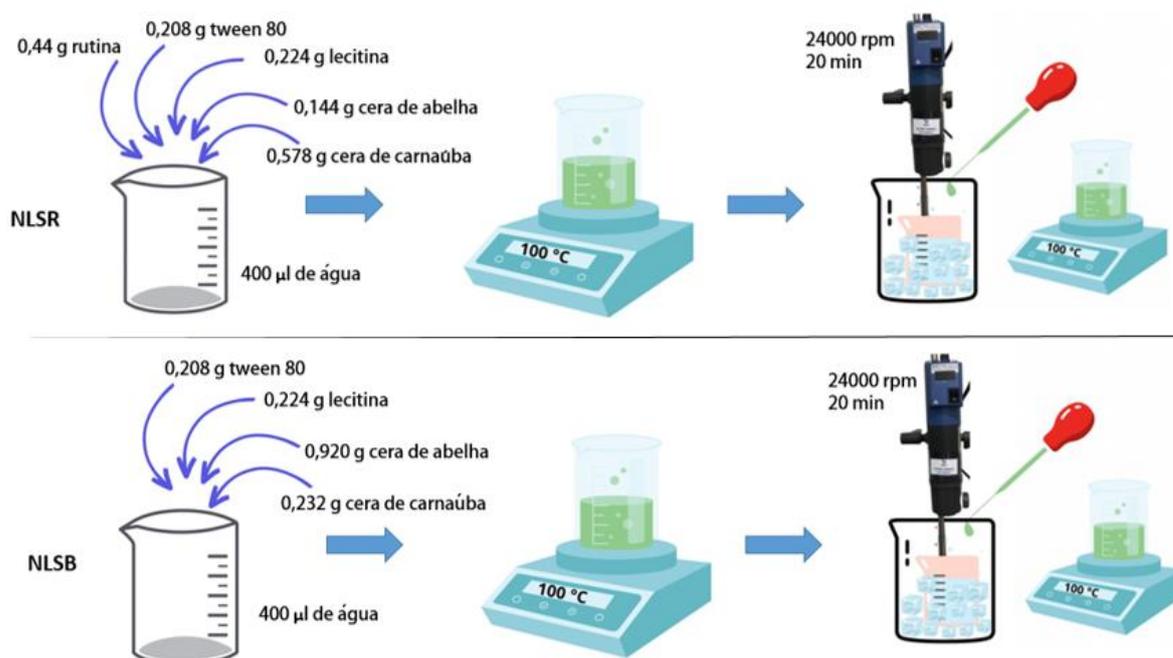
- a) produzir nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina e sem rutina e caracterizar suas propriedades físico-químicas pela determinação do tamanho médio, eficiência de encapsulação, polidispersividade, potencial zeta e pelas técnicas de análise térmica (DTA e TG), difração de raios – X e infravermelho;
- b) determinar a dose letal para *Artemia salina* L. em resposta à radiação ultravioleta;
- c) produzir formulações tópicas contendo sistemas nanoestruturados;
- d) avaliar a toxicidade, fototoxicidade e fotoproteção dos sistemas nanoestruturados obtidos frente a *Artemia salina* L.;
- e) determinar o fator de proteção solar UVB por espectrofotometria UV dos sistemas nanoestruturados;
- f) avaliar a permeação/retenção usando pele de orelha de porco e a liberação *in vitro* das formulações contendo as NLSR.

4 METODOLOGIA

4.1 Preparo das nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina

As NLSs com rutina (NLSR) foram desenvolvidas seguindo uma técnica de microemulsão de fusão a quente, usando um homogeneizador de alto cisalhamento, descrita por Martins et al. (2022), com algumas modificações. Em um recipiente foi adicionado 400 μ L de água purificada, 0,44 g de rutina (adquirida da Sigma–Aldrich, St Louis, MO), 0,224 g de lecitina de soja (adquirida da Adicel, Belo Horizonte, Brasil), 0,208 g tween[®] 80 (adquirido da Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,578 g de cera de abelha e 0,144 g de cera de carnaúba (adquiridas da Henrifarma, São Paulo, SP, Brasil), todos estes ingredientes foram aquecidos até 100 °C e homogeneizados (Figura 5). Posteriormente, a fase oleosa foi adicionada, por gotejamento, na fase aquosa, contendo 40 mL de água destilada gelada (2 a 3 °C), produzindo uma microemulsão.

Figura 5 – Esquema representativo do preparo das nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina (NLSR) e nanopartículas lipídicas sólidas sem rutina (NLSB).



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A dispersão foi submetida à homogeneização vigorosa usando um Ultra-Turrax IKA® T25 digital a 24000 rpm por 20 minutos. Durante o processo de homogeneização a dispersão foi mantida em banho de gelo (Figura 5). O desenvolvimento de NLSR foi realizado em triplicata.

As NLSs sem rutina (NLSB) foram desenvolvidas nas mesmas condições como descritas acima, modificando apenas os valores das ceras de abelha e carnaúba para substituírem a rutina ausente 0,920 g de cera de abelha e 0,232 g de cera de carnaúba (Figura 5). O desenvolvimento das NLSB foi realizado em triplicata.

4.2 Caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas

4.2.1 Análises de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta

As análises foram realizadas semelhante ao descrito por Medeiros et al. (2020). Para caracterização dos parâmetros de distribuição média de tamanho (D_{50}), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ), foi utilizado o equipamento de dispersão de luz *NanoBrook Series (A Nova Instruments Company, Holtville, EUA)*. As amostras foram diluídas em água destilada na proporção de 1:100 (v/v), e as leituras foram feitas em triplicata. Para o PZ as medições foram feitas à temperatura de 25°C com uma intensidade de campo de 20 V/cm. As análises para o PZ foram feitas em triplicata.

4.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação das NLSR

Para determinar a quantidade de rutina nas NLSs, 1 mL de cada dispersão contendo NLSR foram submetidos à ultrafiltração Vivaspin® (Sartorius, EUA) durante 40 minutos a 4000 G a 25° C usando uma centrífuga. Filtrado contendo a rutina livre foi retirado para análise por espectrofotometria UV/vis (UV-1900 UV-Vis-Shimadzu, Kyoto, Japão) a 370 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Quantidade total de rutina presente nas NLSs foi determinada pela ruptura dos lipídios com metanol seguido de sonicação por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram filtradas em filtros de 0,45 µm e quantificadas por espectrofotometria

UV/vis. A eficácia de encapsulação (Ee) foi determinada usando a seguinte equação:

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

Eq. (2)

4.2.3 Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimétrica (TG)

Para estas análises foram utilizadas amostras de NLSR, NLSB, rutina livre (RUT), cera de abelha (CA) e cera de carnaúba (CC) e uma mistura física (MF) proporcional entre rutina:CA:CC. As curvas TG e DTA foram obtidas por meio do analisador térmico *Shimadzu* DTG-60. Utilizando 5 mg de cada amostra em cadinho de alumina e submetendo-as a condições como descritas por Sayed e Polshettiwar (2015), um intervalo de temperatura entre 25 e 900 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (fluxo de 100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

4.2.4 Análise de Difração de Raios-X

As propriedades estruturais das NLSs com e sem a rutina e dos seus componentes foram caracterizadas utilizando um difratômetro XRD 7000 (*Shimadzu*, Kyoto, Japão) para obtenção dos dados seguindo semelhante o descrito por medeiros et al. (2020), com ângulo aberto de 2θ na faixa de 5–70°, sistema θ - θ , usando radiação de Cu ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), em um passo de 0,02° (θ) e 1,0 s de intervalo para cada amostra.

4.2.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Esta análise foi realizada conforme explicado por Sharifi-Rad et al. (2020), utilizando um espectrômetro Prestige 21 (*Shimadzu*, Kyoto, Japão) processadas em pastilha de KBr com resolução de 4 cm^{-1} , velocidade de varredura de 0,2 cm^{-1} e varredura de 4000 a 500 cm^{-1} para as NLSR e NLSB, e para os seus componentes separadamente.

4.3 Preparo das formulações tópicas

Foram preparados sistemas emulsionados do tipo óleo em água (O/A), contendo as NLSR (F NLSR), NLSB (F NB), formulação contendo apenas os componentes do sistema emulsionado (F P) e formulação contendo rutina livre (F RL). A Tabela 2 mostra os componentes das formulações que foram preparadas.

Tabela 2 - Constituição e concentração dos componentes das formulações tópicas.

Componentes	F RL	F NLSR	F NB	FP
Rutina	1,0 %	-	-	-
NLSR	-	1,0 %	-	-
NLSB	-	-	1,0 %	-
Hostacerin SAF®	4,0 %	4,0 %	4,0 %	4,0 %
Propilenoglicol	4,0 %	-	-	4,0 %
Metilparabeno	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %
Água purificada	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A produção da formulação base foi feita adicionando os componentes oleosos na fase aquosa. Porém, nesse caso particular, as fases aquosa e oleosa não necessitam serem aquecidas, uma vez que o hostacerin SAF® (fornecido pela PharmaSpecial Ltda., São Paulo, SP, Brasil) é uma base oleosa autoemulsionante. Portanto, basta adicioná-lo a fase aquosa com os demais componentes. Para a preparação da formulação contendo apenas rutina, a rutina foi levigada com propilenoglicol (fornecido pela PharmaSpecial Ltda., São Paulo, SP, Brasil) antes de ser adicionada à formulação emulsionada.

4.4 Estudo de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados para entender os padrões de liberação aplicando condições *sink* (SAQR et al., 2021). Resumidamente, foram usadas bolsas de diálise com peso molecular entre 12000 a 14000 Da, preenchidas com 5 mL de uma solução tampão fosfato (pH 7,4) com 15% de álcool etílico e adicionadas quantidades específicas das respectivas amostras (15,9 mg de NLSR e 3,5 mg de rutina). A bolsa de diálise foi atada em ambas as extremidades para

manter em seu interior as amostras a serem analisadas. Foi usado um aparelho de dissolutor (Nova Ética, Vargem Grande Paulista/SP, Brasil) com aparato pá. Em cada cuba foi adicionado 95 mL da mesma solução empregadas no interior das bolsas de diálise. Cada bolsa de diálise foi presa no aparato pá e submersa na solução no interior da cuba. A temperatura da cuba foi mantida a 37°C em uma rotação de 50 rpm. Em cada intervalo de tempo especificado, a solução de amostra foi removida e determinado sua absorção usando um espectrofotômetro UV/visível a 370 nm. Logo após a determinação da absorbância a amostra foi devolvida ao meio para não ter interferência no processo de liberação. As amostras foram feitas em triplicata. Para a quantificação da rutina foi feito uma curva analítica dos valores obtidos a partir de soluções padrão de rutina à base do mesmo tampão usado no ensaio de liberação e mostrou linearidade ao longo da faixa de concentração de 5–35 µg/mL com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9998 apresentando uma equação da reta de $y=0,0237x-0,0074$. Os dados de liberação foram tratados de acordo com diferentes modelos cinéticos: ordem zero (porcentagem cumulativa de ativo liberada x tempo), primeira ordem (porcentagem cumulativa de ativo restante x tempo) e Higuchi (porcentagem cumulativa de ativo liberado x raiz quadrada do tempo) (COSTA; LOBO, 2001).

4.5 Estudo da permeação/retenção usando pele de orelha de porco

Para realização deste estudo foram adquiridas orelhas de porco após 2 horas do abate dos animais (Olhos D'Água Indústria e Comércio de Carnes Ltda, Ipuã, SP, Brasil). O estudo foi realizado com base em Martins e colaboradores (2014), com modificações. Usou-se a pele a partir da superfície externa das orelhas. Com cautela e com auxílio de um bisturi, foi removida a membrana de pele total da cartilagem subjacente. Os tecidos subcutâneos foram também removidos e a pele foi armazenada a -20 °C por um período máximo de 40 dias antes do ensaio. Células de difusão de Franz (1,77 cm²) foram utilizadas para realização do estudo, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador em que a formulação foi aplicada, e a derme voltado para o compartimento receptor. A câmara receptora continha 150 mM de tampão fosfato (pH 7,4) em monolaurato de polioxietileno

sorbitano (Tween 80®, 0,5 %, v/v), e o líquido foi continuamente agitado e mantido a uma temperatura constante ($37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) (Figura 6).

As formulações contendo rutina livre NLSB e NLSR foram aplicadas com o auxílio de uma seringa (350 mg de cada) na superfície do estrato córneo. As formulações foram removidas doze horas após a aplicação. Para separar o estrato córneo da epiderme restante as secções de pele foram sujeitas ao *tape stripping* usando 15 pedaços de fita adesiva. A epiderme e a derme restantes foram cortadas em pequenos pedaços, deixadas em banho de ultrassom durante 30 minutos com cinco mililitros de metanol. Posteriormente, foram submetidas à agitação em *vortex* durante 2 minutos e centrifugadas por 30 minutos a 1200 G. O sobrenadante foi depois transferido para um balão volumétrico. Cinco mililitros de metanol foram adicionados ao precipitado residual, e o procedimento de extração foi repetido. O sobrenadante da segunda extração foi adicionado à amostra anterior no frasco volumétrico, e essas amostras foram secas e diluídas em um mililitro de metanol. A mistura resultante foi filtrada através de uma membrana de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), e o teor de rutina foi analisado por cromatografia de alta eficiência (CLAE) (Figura 6). A solução receptora de cada experimento foi recolhida após 12 horas e liofilizadas, extraídas com metanol, filtradas com filtros $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) e analisadas por CLAE.

Figura 6 - Esquema representativo do ensaio de permeação/retenção usando célula de Franz.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

4.5.1 Condições cromatográficas

Para a determinação da quantidade da rutina a partir das NLSs em pele de porco, utilizou-se um cromatógrafo líquido modelo LC-10 AT VP (*Shimadzu, Inc, Kyoto, Japão*) acoplado a detector UV/VIS, modelo SPD-10 VP, integrador, modelo C-R6A, injetor *Rheodyne* e coluna C18 *Shim-pack, CLC- ODS* (280 mm × 4.6 mm, 5 µm). A fase móvel constituiu-se de ácido acético 0,5 %, metanol e água (85:15), na vazão de 1 mL/min. O volume injetado foi de 20 µL e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 360 nm. Para os resultados das NLSR a curva analítica foi feita nas concentrações de 1; 2; 4; 10 e 16 µg/mL apresentando uma equação da reta ($y = 12904x - 8459,1$) e coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9995$). A curva analítica foi obtida em triplicata.

4.6 Atividade fotoprotetora *in vitro*

Os espectros de absorção de NLSR sem rutina e uma solução de rutina em álcool etílico de igual concentração foram obtidos em comprimentos de onda de 290 a 400 nm usando um espectrofotômetro UV-1900 UV-Vis (*Shimadzu, Kyoto, Japão*). Tanto o nanossistema quanto a solução de rutina foram feitas a partir de 2 mg/mL da formulação tópica que contém em sua composição 1 % de rutina.

4.7 Determinação do fator de proteção solar (FPS) por espectrofotometria

Para determinar o potencial fotoprotetor UVB foi utilizado o método espectrofotométrico adaptado de Mansur (MANSUR et al., 1986). Neste método, foram preparadas soluções de concentrações de 2 mg/mL de cada formulação, sendo as amostras diluídas em álcool etílico. Posteriormente, essas soluções foram submetidas à leitura de suas absorbâncias usando um espectrofotômetro de UV/vis (UV-1900 UV-Vis-Shimadzu, Kyoto, Japão), na faixa de 290 a 320 nm, sendo feitas as leituras de 5 em 5 nm. Os valores obtidos foram aplicados na Equação 3, para obtenção do valor de FPS_{UVB} . A equação 3 relaciona o produto entre o efeito eritematogênico (EE) e a intensidade da radiação (I), que é constante em cada comprimento de onda (Tabela 3). Os testes foram feitos em triplicatas.

Equação 3 Usada para determinação do FPS_{UVB} .

$$FPS = FC \cdot \sum_{290\text{ m}}^{320\text{ m}} \cdot EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

Onde:

FC = fator de correção (= 10);

EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

I (λ) = intensidade da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

Abs (λ) = leitura da absorvância obtida da amostra em cada comprimento de onda (λ).

Tabela 3 - Ponderação empregada no cálculo do fator de proteção solar por espectrofotometria.

EE (nm)	EE (λ) x I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

Fonte: Sayre et al. (1979).

4.8 Avaliação da toxicidade das NLSR frente a *Artemia salina* L.

Este ensaio foi realizado conforme Silva et al. (2020) com modificações. Inicialmente, os cistos de *Artemia* foram colocados em 50 mL de água do mar, em um recipiente aberto e deixado por um período de 48 horas, até a liberação dos náuplios (estágio larval e planctônico da *Artemia*) no meio aquoso. Após esse período, 20 náuplios foram coletados e adicionados em recipiente apropriado para a avaliação de diferentes concentrações das amostras a serem estudadas. As amostras avaliadas foram as NLSs contendo rutina (NLSR), as NLS sem rutina (NLSB) e a rutina pura. As concentrações avaliadas foram: 125, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Cada concentração foi deixada em contato com os náuplios por 24 horas. Após esse período, foi feita a contagem e determinada em porcentagem os náuplios mortos. As amostras foram consideradas atóxicas quando apresentam 0 %

de mortalidade na concentração de 1000 µg/mL (SILVA et al., 2022). Cada concentração foi feita em quintuplicata. Para o preparo das concentrações contendo apenas rutina fez-se necessário o uso de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (adquirido da Sigma–Aldrich, St Louis, MO), devido à sua baixa solubilidade em água. Um controle de DMSO foi usado para demonstrar que este não seria um interferente nos resultados de toxicidade. Para as amostras contendo as NLSs não foi usado o DMSO, pois este poderia comprometer a estrutura das nanopartículas.

4.9 Estudo de dose resposta frente à radiação UVA e UVB

Ovos de *Artemia salina* L. (adquiridos da Maramar Pet, Arraial do Cabo, RJ, Brasil) foram colocados em recipiente contendo água do mar e, após 48 horas, ocorreu a eclosão dos ovos com liberação dos náuplios. Foram coletados 20 náuplios para cada dose a ser avaliada e colocados em recipiente apropriado contendo água do mar para posterior irradiação. As doses de radiação UVB foram geradas usando uma lâmpada UVB (Philips TL20W/12RS) e de UVA usando uma lâmpada Led 100 w Ip67 (Philips TL40W/12RS). Para a determinação da dose aplicada foram usadas sondas específicas de UVB e UVA acopladas a um radiômetro (modelo VLX-3W). As doses foram escolhidas empiricamente. Para o estudo frente à radiação UVA, as doses avaliadas foram: 50, 60, 70, 100, 125, 130, 135, 140, 150, 160 J/cm². Já para a radiação UVB foram: 0,08; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1 J/cm². O intuito desse estudo foi determinar a dose de radiação (UVA e UVB) capaz de promover a letalidade de 100% dos náuplios de *Artemia salina* L. Cada dose foi avaliada em quintuplicata. Posteriormente, a dose letal de cada radiação foi usada nos ensaios de fototoxicidade e fotoproteção das amostras e formulações tópicas, respectivamente, frente à radiação UVA e UVB.

4.10 Estudo de fototoxicidade usando *Artemia salina* L. frente à radiação UVA e UVB

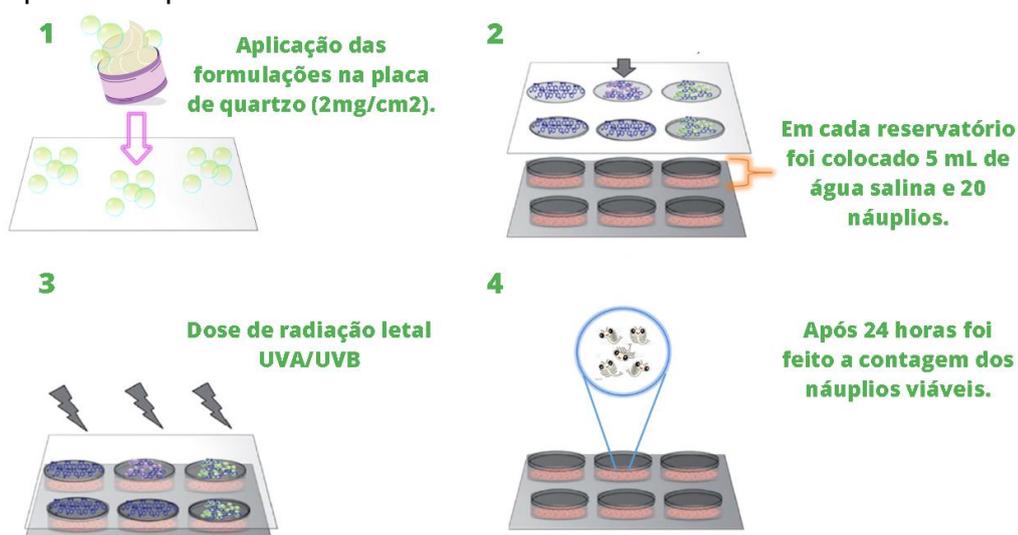
Os ensaios de fototoxicidade foram feitos usando concentrações subtóxicas de acordo com resultados obtidos nos ensaios de toxicidade (item 4.8). Inicialmente, foram colocados 20 náuplios em recipiente adequado contendo água salina. Juntamente com os náuplios, foram adicionadas as concentrações das amostras

avaliadas para os ensaios frente à radiação UVA de 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$ e UVB de 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, as amostras foram irradiadas com a dose letal de UVA/UVB obtidas nos ensaios de dose letal frente à radiação (item 4.9). Após 24 horas, foi feita a contagem dos náuplios vivos/mortos. Foi usado um grupo controle que não recebe irradiação (controle não irradiado - CNI) e um grupo que recebe a irradiação letal contendo 20 náuplios (controle irradiado - CI). Os ensaios foram feitos em quintuplicata.

4.11 Estudo de fotoproteção usando *Artemia salina* L. frente à radiação UVA e UVB

A capacidade fotoprotetora foi avaliada pela análise da viabilidade do microcrustáceo *Artemia salina* L. frente à dose letal de radiação UVA/UVB. Nesse ensaio foi usado uma placa de quartzo, na qual foi aplicada 2 mg/cm^2 de cada formulação avaliada em sua parte superior. Abaixo da placa foram adicionados 20 náuplios de *Artemia salina* L. em reservatório adequado com água salina (5 mL). Acima da placa foi irradiada à dose letal UVA ou UVB (Figura 7).

Figura 7 - Esquema representativo da avaliação da fotoproteção de formulações usando placa de quartzo e *Artemia salina*.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Após 24 horas, foi feita a contagem dos náuplios e determinada sua viabilidade. Foi usado um grupo controle que não recebe irradiação (controle não irradiado - CNI), um grupo que recebe a irradiação letal contendo apenas os 20 náuplios (controle irradiado - CI) e um grupo que foi determinado a viabilidade de uma formulação comercial de protetor solar FPS 60 (FC) para comparar com os grupos tratados com formulação contendo NLSs de rotina (FNLSR), formulação contendo NLSs sem rotina (FNB), formulação sem NLSs e rotina (FP) e formulação contendo rotina livre (FR). Os ensaios foram feitos em quintuplicata. A Figura 7 mostra o esquema do ensaio de fotoproteção usando placa de quartzo e as *Artemias*.

4.12 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa de estatística *GraphPad Prism*[®] (versão 9.00 para *Windows*, *GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA e as diferenças entre as médias foram consideradas significantes para valor de p menor que 0,05 pelo teste “*t de Student*”.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas

5.1.1 Análise do tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial Zeta e eficiência de encapsulação

A penetração e a profundidade de penetração dos nanocarreadores são afetadas por sua composição, estrutura, tamanho da partícula e carga superficial. As NLSs e os transportadores lipídicos nanoestruturados são retidos principalmente no estrato córneo, devido às suas fortes propriedades lipofílicas. Os nanocarreadores de tamanho de partícula bem menor, incluindo os com características lipofílicas, podem penetrar no fundo dos folículos pilosos e mostrar mais acúmulo e permeabilidade mais acentuada (ZHOU et al., 2021). Além disso, as partículas não devem ser tão pequenas, abaixo da faixa considerada ideal, pois pode considerar possíveis riscos nanotoxicológicos e também para prevenir a ocorrência de efeitos sistêmicos (AMASYA et al., 2019).

A distribuição do tamanho das NLSR e NLSB estão representados na Tabela 4. Os valores do tamanho médio (D_{50}) obtidos foram de $185,31 \pm 12,19$ (Figura 8 B) e $219,68 \pm 47,58$ (Figura 8 A) para NLSR e NLSB, respectivamente, estando estes resultados entre a faixa de tamanho de NLSs considerada ideal (100-300 nm) (ARYANI et al., 2019). Em relação à presença da rutina nas NLSs, não parece ter alterado o tipo de distribuição de tamanho, como pode ser observado na Figura 8, na qual, tanto NLSR quanto NLSB apresentaram uma distribuição do tipo Gaussiana (STRACKE et al., 2006). Entretanto, os resultados do PDI foram de $0,140 \pm 0,11$ para NLSR e $0,364 \pm 0,01$ para NLSB, mostrando que a presença de rutina (aproximadamente 27 %) nas NLSs foi responsável por uma distribuição mais estreita do que as observadas na NLSB, o que favorece uma população de partículas mais homogênea no tamanho. Valores mais próximos de zero sugerem uma dispersão bem homogênea e quando são apresentados acima de 0,5 sugerem alta heterogeneidade (TA et al., 2021). Em relação ao D_{50} , a presença de rutina nas NLSs mostrou também ser capaz de promover uma pequena diminuição dos valores. Segundo Martins et al. (2022), uma distribuição estreita com valores

menores que 0,2 pode contribuir para penetração da rutina nas camadas mais profundas da epiderme.

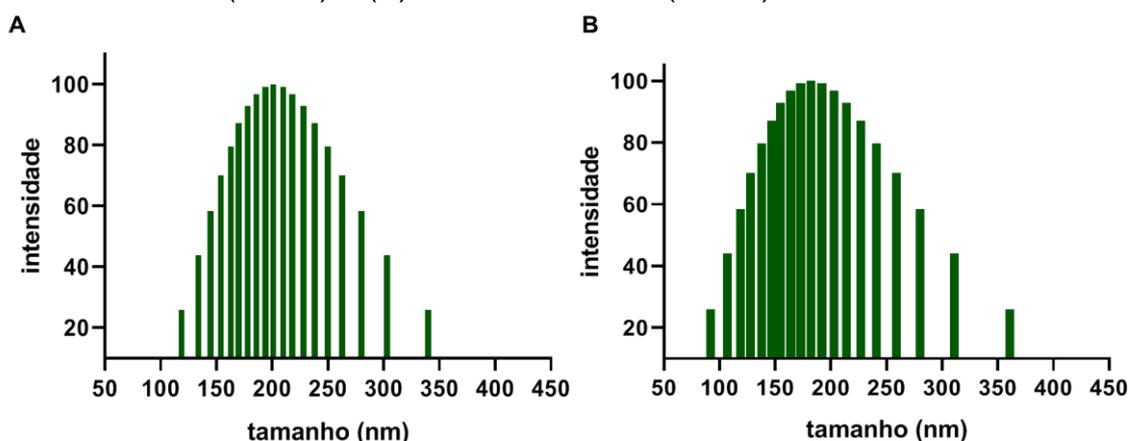
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas das NLSs.

Parâmetros	NLSR	NLSB
D ₅₀ (nm)	185,31 ± 12,19	219,68 ± 47,58
PDI	0,140 ± 0,11	0,364 ± 0,01
Ee (%)	98,82 ± 0,37	-
ZP (mV)	-34,04 ± 1,43	-40,82 ± 1,48

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Nota: tamanho médio (D₅₀), índice de polidispersão (PDI), eficiência de encapsulamento (Ee) e potencial zeta (ZP). Os resultados são representados por média±SEM (n=3).

Figura 8 - Distribuição do tamanho de partícula das NLSs, em que (A) representa as NLSs sem rutina (NLSB) e (B) NLSs com rutina (NLSR).



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

O valor de Ee foi bastante satisfatório (98,82%±0,37). A alta capacidade de encapsulação deve-se às propriedades da rutina de lipofilicidade, as quais são semelhantes aos materiais lipídicos usados na produção das NLSs (cera de abelha e cera de carnaúba). A similaridade de composição permite uma mistura mais homogênea da rutina por toda a estrutura da nanopartícula (GAETANO et al., 2021).

O PZ está relacionado à estabilidade das dispersões, indicando o grau de repulsão entre as partículas. Os coloides com alto potencial zeta (positivo ou negativo) são eletricamente estabilizados indicando que o sistema é estável. Além disso, uma forte nanopartícula com carga positiva ou negativa pode interagir com vários componentes da pele e vias de penetração (AMASYA et al., 2019).

O valor do PZ obtido para NLSR foi de -34,04 ± 1,43. De acordo com a literatura, são considerados ideais para dispersões coloidais valores de PZ entre -30

e +30 mV. Indicando que o resultado obtido favorece a estabilidade elétrica das nanopartículas, evitando aglomeração entre elas (KRAMBECK et al., 2021).

5.1.2 Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimétrica (TG)

A avaliação das propriedades térmicas (DTA e TG) de amostras sólidas farmacêuticas pode fornecer resultados importantes em relação ao ponto de fusão, cristalinidade, polimorfismo e características endotérmicas e exotérmicas. O processo de produção das NLSs nesse estudo promoveu etapas de aquecimento e homogeneização capazes de verificar tais propriedades, o que se faz importante uma avaliação minuciosa do produto final por tais técnicas (ESQUIVEL et al., 2022).

Tabela 5 - Dados de TG para NLSs de rutina, mistura física e seus componentes.

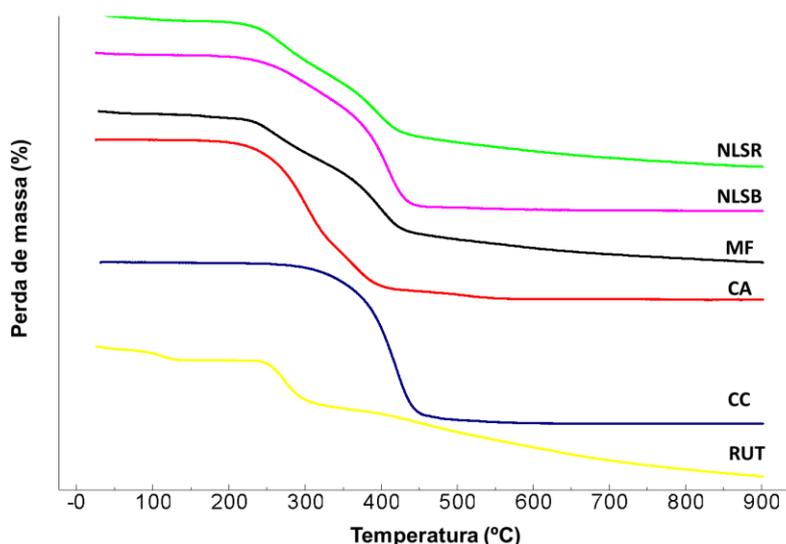
Amostras	Etapas	Início-Fim (°C)	Perda de massa (%)
NLSR	1	25,00 – 139,00	5,53
	2	139,00 – 304,00	26,50
	3	304,00 – 511,00	51,46
	4	511,00 – 892,00	14,77
NLSB	1	25,00 – 511,70	98,46
MF	1	25,00 – 139,00	2,31
	2	139,00 – 304,00	24,97
	3	304,00 – 430,99	54,80
	4	304,00 – 511,00	13,92
CA	1	25,00 – 436,38	95,78
	2	436,38 – 600,00	4,22
CC	1	25,00 – 511,00	100,00
RUT	1	25,00 – 139,00	8,50
	2	139,00 – 304,00	25,88
	3	304,00 – 511,00	20,98
	4	511,00 – 892,00	26,63

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A curva TG para a rutina (RUT), mistura física (MF) e das NLSR mostraram que a decomposição térmica ocorreu em quatro etapas (Tabela 5 e Figura 9). Na primeira etapa, a perda de massa da rutina foi de 8,5% e as NLSR foi de 5,59%, já a MF apresentou uma perda de massa de 7,53%.

Mesmo com valores diferentes, o padrão de perda de massa foi similar ao da rutina pura. Essa etapa de decomposição está diretamente relacionada à perda de água referente à hidratação desse flavonóide (COSTA et al., 2002). O mesmo ocorreu na segunda etapa, na qual a perda de massa ficou com valores muito semelhantes entre 30,84 (MF), 25,88% (RUT) e 27,10 (NLSR) mostrando um padrão semelhante de decomposição da rutina pura. Na etapa 3, o processo das NLSR foi de 51,46 e 36,28 % de perda de massa, respectivamente, enquanto que a RUT apresentou uma perda de massa de 20,98%. Finalmente na etapa 4, as NLSR apresentaram uma perda de 43,25%, a MF apresentou uma perda de massa de 21,57%, já a rutina pura apresentou um valor de 26,63%.

Figura 9 - Curva termogravimétrica das NLSs contendo rutina (NLSR), NLSB sem rutina (NLSB), mistura física (MF), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC) e rutina (RUT).



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Nas etapas 3 e 4, o padrão de decomposição das NLSR sofreram influência de forma mais acentuada dos seus componentes lipídicos CA e CC, onde CC apresentou três etapas e CA quatro etapas com valores específicos apresentados na Tabela 5. Já as NLSB apresentaram quatro etapas e com perda de massa semelhante as ceras que a constituem. Portanto, no ensaio de TG as NLSR não mostraram nenhuma diferença de composição, o qual poderia ter ocorrido durante o

processo de preparo das NLSs, que justificasse mudanças acentuadas no seu perfil de perda de massa, o qual foi semelhante ao da MF.

A Tabela 6 e a Figura 10 mostram os resultados de DTA, observa-se que a rutina pura apresentou um primeiro evento térmico em 117 °C (característico da sua forma hidratada). O segundo pico endotérmico está relacionado ao ponto de fusão que ocorreu por volta de 182,63 °C (VALOR et al., 2021; VANKUDRI et al., 2016). O pico de fusão da rutina também pode ser observado na mistura física (MF) em 172,97 °C com aproximadamente um deslocamento de 10 °C, possivelmente por estar em contato com os outros componentes cerosos (CA e CC) que fundiram antecipadamente em 62,47 e 82,36 °C, respectivamente favorecendo uma dispersão da rutina no líquido fundido e modificando o ponto de fusão (GALVÃO et al., 2020).

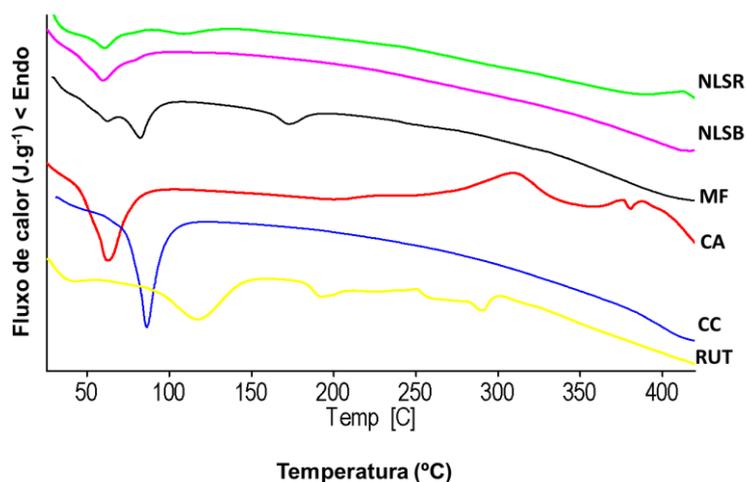
Entretanto, o pico de fusão da rutina não foi observado nas NLSR, evidenciando uma dispersão mais íntima da rutina nos demais componentes do sistema nanoestruturado, impossibilitando sua detecção, o que poderia ser justificado por uma perda de sensibilidade da técnica empregada na análise.

Tabela 6 - Dados de DTA para NLSs de rutina, mistura física e seus componentes.

Amostras	Evento	Pico (°C)	ΔH (J/g⁻¹)
NLSR	1	60,74	40,24
	2	108,99	13,22
NLSB	1	59,67	167,03
MF	1	62,47	9,21
	2	82,36	48,96
	3	172,97	45,64
CA	1	62,81	275,70
CC	1	86,24	325,51
RUT	1	117,00	251,64
	2	182,63	31,13
	3	289,97	66,44

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Figura 10 - Curva calorimétrica das NLSs contendo rutina (NLSR), NLSB sem rutina (NLSB), mistura física (MF), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC) e rutina (RUT).



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

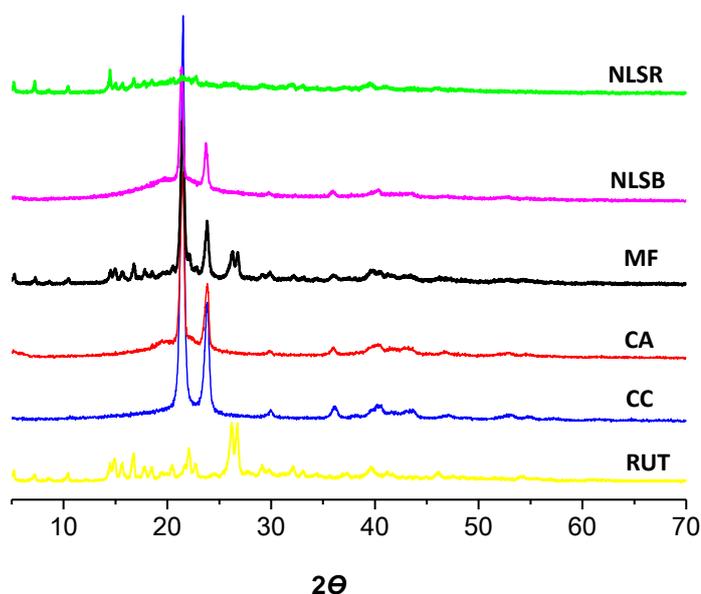
5.1.3 Análise de Difração de Raios-X

As análises de DRX foram realizadas com o intuito de avaliar as possíveis alterações na cristalinidade dos componentes presentes nas NLSs produzidas. A Figura 11 mostra os difratogramas dos componentes cerosos, a mistura física e as NLSs. O difratograma da cera de carnaúba (CC) apresentou dois picos de difração em $21,50^\circ$ e $23,80^\circ$ bem intensos, e a cera de abelha (CA) também apresentou dois picos típicos em $21,46^\circ$ e $23,84^\circ$, e esses picos são representativos das suas respectivas formas cristalinas, já citados na literatura (ROCHA et al. 2020; SORITA et al., 2021). Similarmente, a rutina apresentou um pico característico em $26,20^\circ$ que é típico para rutina com altas propriedades cristalinas (NAEEM et al., 2023).

Os mesmos picos das ceras e da rutina foram observados na MF ($21,52^\circ$, $23,88^\circ$ e $26,32^\circ$). As NLSB não apresentaram mudanças nos picos referentes à cristalinidade de CC e CA ($21,40^\circ$ e $23,78^\circ$), evidenciando que o processo de preparo das NLSs não modificou a recristalização dos materiais cerosos na ausência da rutina. Já para as NLSR os picos característicos das ceras mostraram-se em $21,34^\circ$ e $23,78^\circ$ e para rutina em $26,74^\circ$, porém com uma intensidade bastante reduzida, o que evidencia que a rutina se encontra dispersa ao ponto de diminuir sua

cristalinidade e favorecendo sua presença na forma amorfa. Isto pode ser sustentado pelos valores de entalpia (ΔH) apresentados na Tabela 6, obtidos por DTA, onde as NLSB apresentaram um valor de liberação de energia $167,03 \text{ J/g}^{-1}$ enquanto que as NLSR foram de apenas $40,24 \text{ J/g}^{-1}$, o que poderia ser explicado por uma diminuição da cristalinidade das ceras de carnaúba e de abelha. Portanto, a presença da rutina nas NLSs proporcionou sua amorfização em quantidades consideráveis (Figura 11).

Figura 11 – Difratograma das NLSs contendo rutina (NLSR), NLSs sem rutina (NLSB), mistura física (MF), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC) e rutina (RUT).

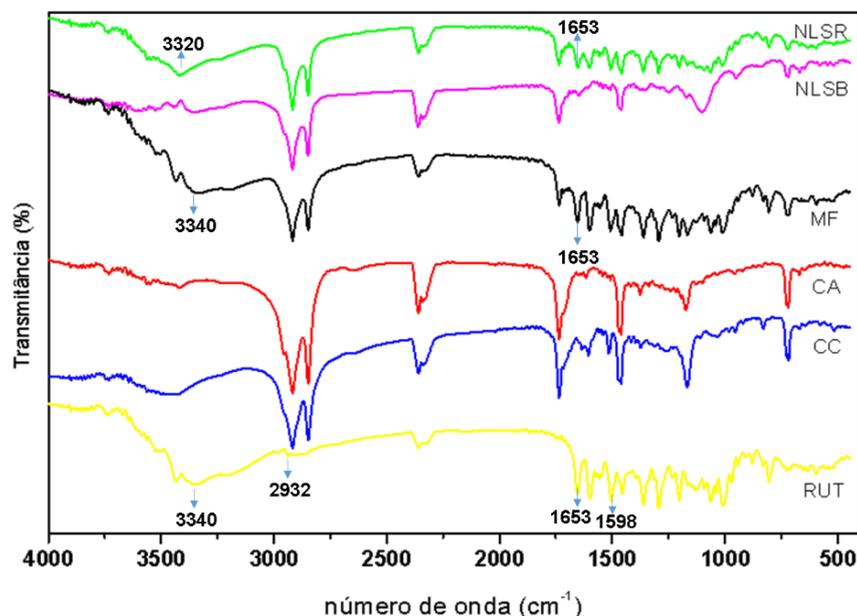


Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

5.1.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para confirmar a presença de grupos funcionais específicos presentes na NLSs contendo rutina e uma possível interação de seus componentes (Figura 12).

Figura 12 - Espectro de FTIR para NLSs com rutina (NLSR), NLSs sem rutina (NLSB), mistura física (MF), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC) e rutina (RUT).



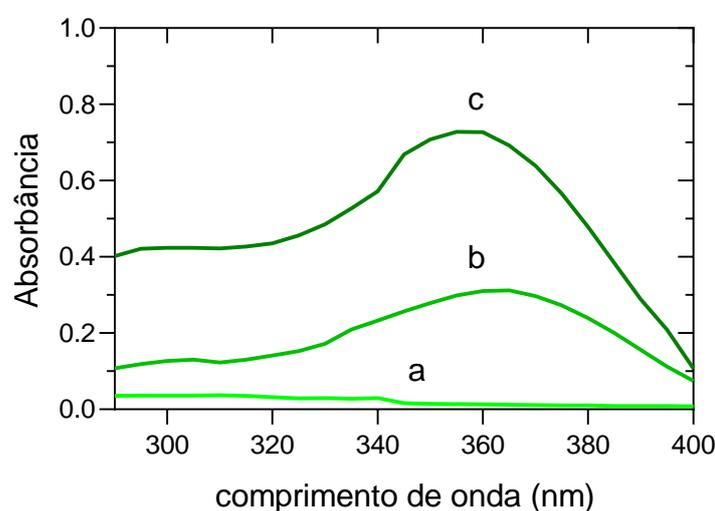
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Semelhantes aos picos demonstrados em Wu et al. (2020), o espectro do FTIR da rutina apresentou picos específicos em 3432 cm⁻¹, resultante da presença de grupos OH, 2932 cm⁻¹ referente à presença de CH₂ e em 1653 cm⁻¹ referente à presença de C=O (SHANMUGAM et al., 2017). Em adição, a banda de absorção devido à ligação C=C em 1598 cm⁻¹ mostra a presença do grupo alceno aromático do núcleo flavonoídico (HOAI et al., 2020). Os picos relacionados à presença de C=O e vibração da hidroxila (OH) também aparecem nas NLSR e mistura física (MF), mantendo as posições originais, o que mostra que não houve nenhum tipo de interação entre os componentes com a rutina. Os picos característicos da cera de abelha e carnaúba mostram picos entre 2916 a 2847 cm⁻¹ representativos de estiramentos CH (alcanos) e o pico característico da carbonila (C=O) em 1735 cm⁻¹. Pode-se observar que nas NLSR, NLSB e MF também apresentaram picos atribuídos à presença destes grupos funcionais sem nenhuma alteração, evidenciando ausência de interações entre esses grupos funcionais característicos (LOPES; FASCIO, 2004).

5.2 Avaliação *in vitro* do potencial fotoprotetor e FPS Espectrofotométrico

A partir de uma varredura espectrofotométrica UV-Vis, obteve-se uma análise qualitativa e comparativa do potencial efeito fotoprotetor das NLSR (Figura 13). Pode-se observar um aumento acentuado da absorbância quando a rutina foi incorporada à NLSs (c), especificamente no comprimento de onda entre 340-370 nm, desenvolvendo uma capacidade de absorção maior quando comparada com a rutina livre (b).

Figura 13 - Espectros de absorção de NLSs sem rutina (a), rutina (b) e NLSs contendo rutina (c).



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A absorbância das NLSB permaneceu próximo a níveis basais em toda faixa analisada. As NLSR foram capazes de apresentar um maior espectro de absorbância, provavelmente por um fenômeno de sinergismo entre seus componentes estruturais. Este fato pode estar relacionado, principalmente, à presença de cera de carnaúba e de abelha em sua composição. As ceras apresentam uma similaridade entre seus componentes, tendo uma composição qualitativamente semelhante. Suas composições químicas consistem em diferentes quantidades de ésteres de ácidos, ácidos livres, álcoois graxos e hidrocarbonetos. Mais especificamente, a cera de carnaúba contém menor porcentagem de ácidos graxos livres, maior porcentagem de ésteres graxos (valor de éster de 75-85 %) e 5% de resina. Já a cera de abelha é composta por uma maior porcentagem de

gordura ésteres e uma porcentagem de ésteres graxos de 72-79% (OZYAZICI et al., 2006). Medeiros e colaboradores (2020) mostraram um aumento na capacidade de absorção de nanocarreadores contendo bemotrizinol, um filtro solar de amplo espectro e cera de carnaúba. Os autores afirmam que o sinergismo pode ter ocorrido pela presença da cera de carnaúba que, além de suas propriedades de barreira, possuem em sua composição cinamatos, capazes de absorver radiação UV (VILLALOBOS-HERNÁNDEZ; MÜLLER-GOYMANN, 2006).

O FPS_{UVB} *in vitro* das formulações em estudo foi determinado pelo método espectrométrico, com leituras realizadas no intervalo de 290 a 320 nm. Os resultados dos cálculos do FPS_{UVB} foram obtidos através da metodologia de Mansur et al. (1986) e demonstrados na Tabela 7. Esse método é realizado por meio de espectrofotometria, no qual o filtro solar é avaliado de acordo com a altura, largura e localização da sua curva de absorção dentro do espectro do ultravioleta. É uma técnica *in vitro*, rápida e eficaz, que apresenta uma boa correlação com os resultados *in vivo*, garantindo a confiabilidade da técnica (SECCO; BELTRAME; SCHWANZ, 2018).

Tabela 7 - Quantificação *in vitro* dos valores de FPS das formulações avaliadas.

Formulação	FPS obtido por espectrofotometria
Rutina	0,82 ± 0,38
NLSR	5,44 ± 2,45
NLSB	0,56 ± 0,28
Protetor solar comercial (FPS 60)	56,88 ± 1,31

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Onde: NLSR- nanopartículas lipídicas sólidas contendo rutina e NLSB- nanopartículas lipídicas sólidas sem rutina.

Em relação ao FPS_{UVB} *in vitro* observado nas análises, a formulação NLSR obteve um maior FPS (5,44 ± 2,45) quando comparado com a formulação contendo apenas rutina, que exibiram valores de FPS igual a 0,82 ± 0,38 promovendo um aumento de FPS maior que 6 vezes. Da mesma forma, como foi observado nos resultados de varredura em que as NLSB apresentaram baixa capacidade de absorção, seus valores de FPS foram de 0,56 ± 0,28. Nesse estudo foi usada uma formulação comercial (FPS 60) para demonstrar seus reais valores na determinação

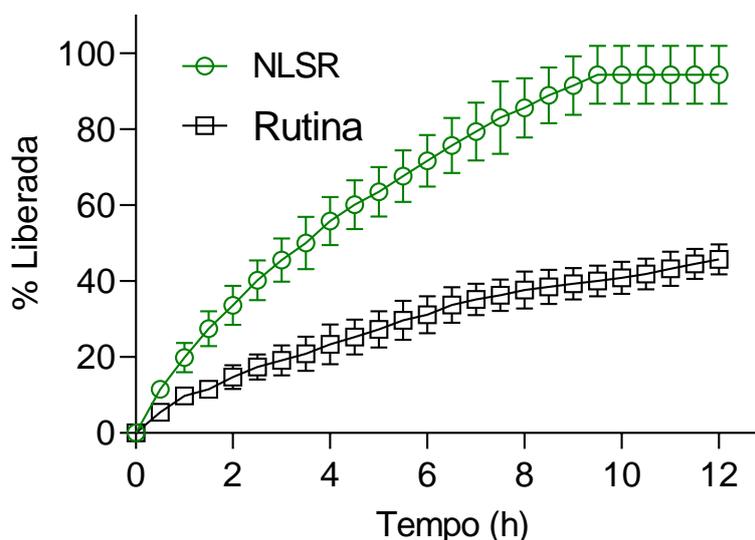
por espectrofotometria, os quais foram bem próximos do apresentado comercialmente mostrando o valor de FPS $56,88 \pm 1,31$.

De acordo com a ANVISA, levando em consideração o FPS_{UVB} determinado pela RDC 30, de 01 de junho de 2012, o uso dessas formulações com finalidade fotoprotetora é viável, pois o fator mínimo de proteção segundo essa resolução é de FPS = 6.

5.3 Liberação do ativo *in vitro*

A liberação de rutina das NLSs foi investigada pela diálise de suspensões de NLSR, usando uma mistura de solução tampão fosfato (pH 7,4) e etanol (15%) como meio num tempo de 12 horas. Desta forma, a solubilização da rutina no meio de diálise ($370,71 \pm 96,43$ à 37°C) foi assegurada e as condições *sink* foram mantidas (DE GAETANO et al., 2021). Como mostrado na Figura 14, a rutina apresentou uma liberação de $9,63 \pm 0,84\%$ em 1 h, atingindo apenas $45,70\% \pm 3,93$ em 12 h. Já as NLSR mostraram uma liberação da rutina de $19,86 \pm 3,91\%$ nesse período de 1 h.

Figura 14 - Estudo comparativo *in vitro* da liberação das NLSR e da rutina livre.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

As NLSs foram capazes de liberar a rutina na sua totalidade por volta de 12 h com $94,28 \pm 7,63\%$. Portanto, a dissolução *in vitro* indicou que a composição das NLSs promove a liberação da rutina de forma sustentada e com maior percentagem

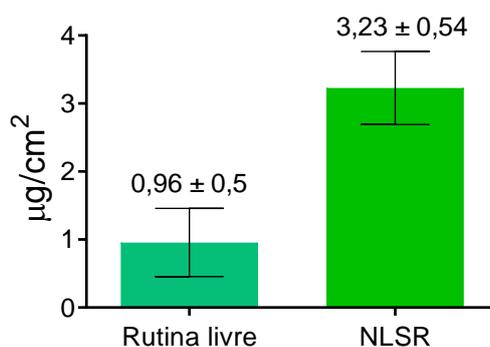
do que a rutina livre por 12 h. Esse fato pode potencializar as propriedades de penetração da rutina nas camadas mais profundas da pele, o que aumentaria a capacidade de a rutina atuar como antioxidante em processos oxidativos causados pela exposição à radiação UV.

A cinética de liberação e o mecanismo de liberação da rutina das NLSs foram avaliados. O modelo que melhor se ajustou à liberação da rutina foi o modelo de Higushi, indicado pelo maior valor do coeficiente de regressão ($R^2=0,9151$). Para estudar este modelo é necessária a construção de um gráfico de porcentagem acumulada de fármaco liberado por raiz quadrada do tempo. Obtendo-se, então, um gráfico linear, tendo um coeficiente angular igual a $K_H=1,37$. Pode-se inferir que o principal mecanismo de liberação é controlado por difusão. Com base nesse modelo, a constante de velocidade é proporcional à concentração de ativo sendo liberado, ou seja, quanto maior a concentração, mais rápida é a liberação (COSTA; LOBO, 2001).

5.4 Estudo da retenção/permeação usando pele de orelha de porco

Para avaliação da permeação cutânea, as formulações foram aplicadas em orelha de porco. Segundo Pulsoni et al. (2022), recomenda-se pele de orelha de porco para estudos de penetração cutânea, pois é um substituto adequado para simular a penetração percutânea humana. Apresenta semelhanças em morfologia e habilidades de penetração correspondente à pele humana, obtendo, assim, resultados compatíveis.

Figura 15 - Estudo da permeação/retenção usando pele de orelha de porco.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Os perfis de retenção/permeação são ilustrados na Figura 15. O fluxo de retenção da rutina livre foi de $0,96 \pm 0,5 \mu/\text{cm}^2$. Tal efeito deve estar relacionado à baixa solubilidade em meio aquoso da rutina. Segundo Aanisah et al. (2023), essa limitação resulta em uma redução da capacidade de permeação na pele, o estrato córneo atua como uma barreira de penetração, impedindo a liberação de ingredientes ativos na pele, com características semelhantes à rutina, limitando sua permanência apenas na camada mais superficial do estrato córneo.

Já o fluxo das NLSR foi igual a $3,23 \pm 0,54 \mu/\text{cm}^2$ promovendo um aumento maior que 3 vezes na penetração da rutina nas camadas mais profundas da pele, mostrando que, possivelmente, as NLSs formam um sistema depósito na pele favorecendo sua penetração, pois contribui para um aumento da solubilidade da rutina. Esses dados são importantes para explicar a ação fotoquimioprotetora mostrada por Martins e colaboradores (2022) que avaliaram a ação de NLSs contendo rutina em dois modelos alternativos *in vitro*: explante de pele normal e pele reconstituída (cultura de fibroblastos e queratinócitos). Os autores mostraram que as NLSs de rutina foram capazes de evitar/reverter os danos causados pela radiação UVB. Com a capacidade de penetração da rutina, a possibilidade de sua ação antioxidante fica realçada em promover proteção aos danos oxidativos causados pela radiação UV. NLSs são muito vantajosas para utilização em aplicação tópica, por possuir várias características, incluindo o auxílio para penetração de compostos lipofílicos na camada epidérmica da pele após aplicação, devido seu pequeno tamanho e área de superfície maior. A importância da capacidade de atingir a epiderme é que compostos podem desenvolver suas atividades, como proteção contra o estresse oxidativo e o fotoenvelhecimento (AANISAH et al., 2023).

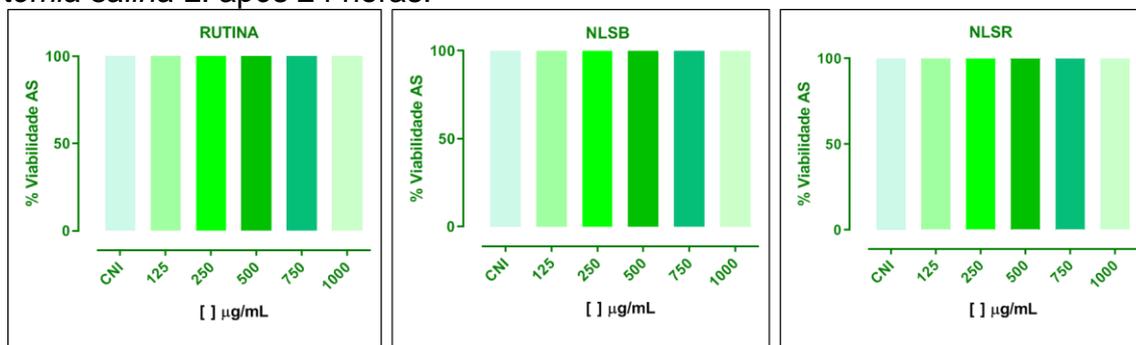
O D_{50} de $185,31 \pm 12,19$ das NLSR obtidas neste estudo são fator crucial para que a penetração ocorresse de maneira aumentada, já que as propriedades de adesão de partículas com tamanho menores que 400 nm são melhores, quando comparadas com as maiores. Tal fato pode favorecer a retenção destas partículas no estrato córneo e epiderme, evitando sua permeação para as camadas mais profundas e circulação sistêmica (MEDEIROS et al, 2020). Isso corrobora com os resultados de análise do permeado, no qual não foi mensurado valores de rutina nesse compartimento, mostrando que não ocorreu permeação de rutina no modelo estudado.

5.5 Avaliação da toxicidade das NLSR frente a *Artemia salina* L.

Formulações cosméticas podem desenvolver efeitos tóxicos e consequentes complicações à saúde humana. Neste sentido, deve haver uma preocupação especial para incorporação de substâncias de natureza não tóxica, para evitar danos (BILAL; IQBAL, 2019). Vários estudos documentaram o efeito tóxico de filtros UV orgânico em vários organismos aquáticos (protozoários, crustáceos e microalgas) (BILAL; MEHMOOD; IQBAL, 2020).

A avaliação da toxicidade das NLSR frente à *Artemia salina* L. resultou em uma viabilidade de 100 % em todas as concentrações testadas. A rutina livre, as NLSB e NLSR se mostraram atóxicas nas concentrações de 125, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL (Figura 16). Segundo Durán et al. (2022), o flavonóide rutina em relação à toxicidade é diferente de outros pertencentes a esta classe, pois é considerado atóxico.

Figura 16 - Efeitos da rutina livre, NLSB e NLSR na avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* L. após 24 horas.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Estudos testaram a segurança para utilização da rutina e demonstraram que a rutina não é tóxica em várias concentrações, alguns revelam que a rutina é segura até 2000 mg/kg. E há estudo que demonstra que, em maiores concentrações, até 5.000 mg/kg também é considerada segura e não apresenta nenhum sinal de toxicidade (TIWARI et al., 2020).

Em estudo realizado por Nouri et al. (2022) a viabilidade celular foi vista pelo ensaio MTT, em que as células PC12 foram expostas a várias concentrações de rutina livre, NLSs em branco e NLSs de rutina. O estudo revelou que a rutina não

apresentou toxicidade na faixa de concentração 2-32 µg/mL, nenhuma toxicidade foi observada na faixa de concentração de 2–16 µg /mL de NLSs de rotina e NLSs em branco não tiveram efeito na viabilidade celular até 64 µg/mL.

Os resultados obtidos nesse estudo frente à *Artemia salina* L., mostram-se potencialmente seguros para aplicação tópica, uma vez que não apresentou valores de toxicidade até 1000 µg /mL sendo considerados atóxicos (HAMIDI; JOVANOVA; PANOVSKA, 2014).

5.6 Avaliação da *Artemia salina* para uso em estudos de fototoxicidade e fotoproteção

5.6.1 Estudo de dose resposta frente à radiação UVA e UVB

Anterior à realização dos ensaios de fototoxicidade e fotoproteção foi conduzido uma avaliação da capacidade da radiação UV possivelmente promover mortalidade em *Artemia salina* L. Uma vez determinadas as doses letais que causassem 100 % de mortalidade, as mesmas seriam usadas na avaliação da fototoxicidade e da fotoproteção das NLSs e das formulações tópicas contendo tais sistemas nanoestruturados, respectivamente. Com isso, as *Artemias salina* foram submetidas a doses crescentes de UVA e UVB, separadamente, para a determinação da DL₅₀, que corresponde à dose que mata 50 % da população em estudo (MARKS et al., 2023). A escolha das doses UVA e UVB foram determinados a partir do método empírico.

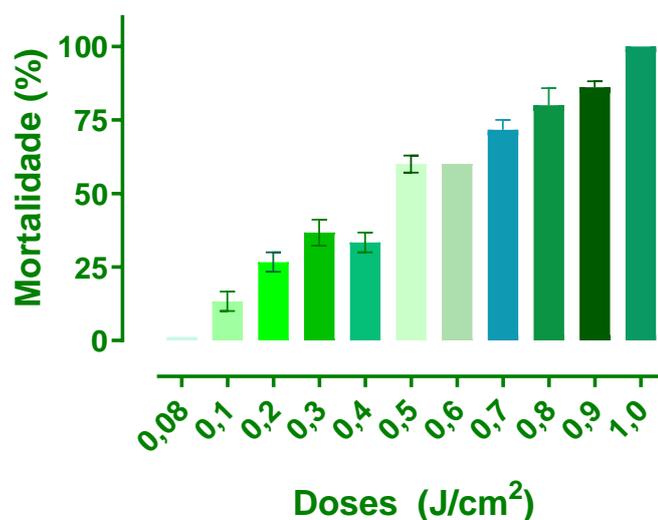
Tabela 8 - Mostra a mortalidade da *Artemia salina* L. frente a doses crescentes de UVB.

Dose (J/cm ²)	% de mortalidade
0,08	0,00±0,00
0,1	13,33±4,71
0,2	26,67±4,71
0,3	36,67±6,23
0,4	33,33±4,71
0,5	60,00±4,08
0,6	60,00±0,00
0,7	71,67±4,71
0,8	80,00±8,16
0,9	86,13±2,81
1,0	100,00±0,00

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Os resultados obtidos referentes à taxa de mortalidade frente à radiação UVB para as doses 0,08; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 J/cm² estão demonstrados na Tabela 8. O valor de DL₅₀ para a radiação UVB foi de 0,45±0,056 J/cm² e o perfil dose/mortalidade é apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Mortalidade da *Artemia salina* L. frente a doses crescentes de UVB.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Para encontrar a DL₅₀ frente à radiação UVA foi necessário expor as *Artemias* a doses bem mais elevadas, quando comparadas com o estudo de dose resposta frente a UVB. Confirmando que respostas frente a UVB são bem mais agressivas que as de radiação UVA.

Segundo Soundharaj, Ramachandran e Silva (2022), a radiação UVA é menos energética do que UVB. No entanto, a radiação UVA penetra em camadas profundas da pele e seu efeito é cumulativo. Ambas as radiações contribuem para o desenvolvimento de danos ao DNA e desordens na saúde quando em níveis elevados de exposição.

Para o estudo de dose resposta frente a UVA foram testadas doses de 50, 60, 70, 100, 125, 130, 135, 140, 150 e 160 J/cm². E os resultados da porcentagem de mortalidade dos microcrustáceos foram expressos na Tabela 9. A dose que corresponde à morte de 50 % foi de 133,2±0,82 J/cm² e o perfil de dose resposta/mortalidade é apresentado na Figura 18. As doses escolhidas para a realização da fotoproteção e fototoxicidade foram as que promoveram 100 % de

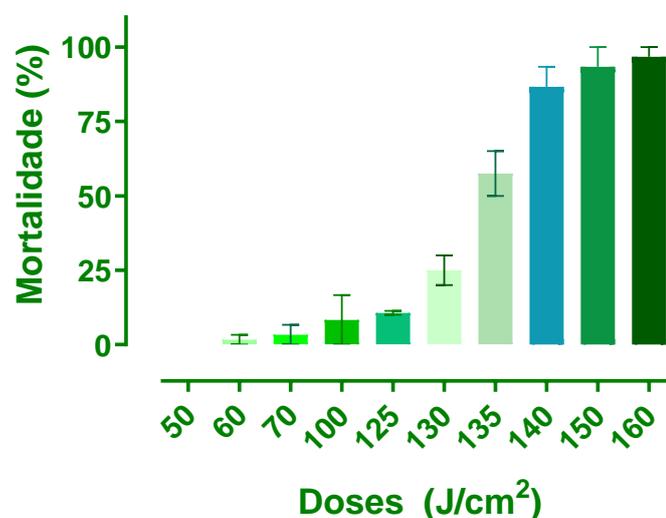
letalidade frente a *Artemia salina* L. sendo de 1,0 J/cm² para os ensaios com UVB e 160 J/cm² para os ensaios com UVA.

Tabela 9 - Mostra a Mortalidade da *Artemia salina* L. frente a doses crescentes de UVA.

Dose (J/cm ²)	% de mortalidade
50	0,00±0,00
60	1,67±2,89
70	3,33±5,77
100	8,33±14,43
125	10,67±1,15
130	25,00±8,66
135	57,50±10,61
140	86,67±11,55
150	93,33±11,54
160	96,67±5,77

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Figura 18 - Mortalidade da *Artemia salina* L. frente a doses crescentes de UVA.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

5.6.2 Estudo de fototoxicidade usando *Artemia salina* L. frente à radiação UVA e UVB

Os protetores solares são desenvolvidos para proteger a pele do consumidor dos raios ultravioletas prejudiciais, mas ingredientes ativos presentes nessas formulações podem ser potencialmente perigosos para o mesmo consumidor.

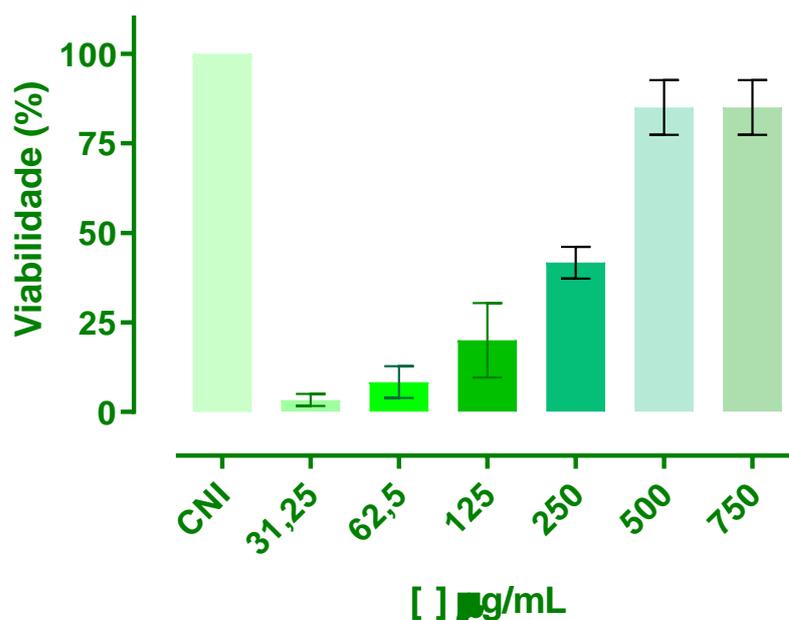
Algumas moléculas presentes nestes produtos tendem a se degradar na presença de luz solar. As fotorreações irreversíveis resultam na diminuição da eficácia da fotoproteção e formação de produtos de fotodegradação que podem desenvolver irritações na pele ou fotodermatoses, incluindo fototoxicidade/fotoirritação e reações fotoalérgicas (ACSOVA et al., 2021). Os eventos fototóxicos geram preocupação a respeito da segurança dos filtros solares UV. Então, os testes de fototoxicidade são obrigatórios para a regulamentação do protetor solar (PAIVA et al., 2020).

Tabela 10 - Mostra a viabilidade da *Artemia salina* L. frente à dose letal UVB em diferentes concentrações de rutina.

[] µg/MI	% de viabilidade
31,25	3,33 ± 2,88
62,50	8,33 ± 7,63
125,00	20,00±18,02
250,00	41,67± 7,63
500,00	85,00±13,22
750,00	85,00±13,22

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Figura 19 - Avaliação da fototoxicidade da *Artemia salina* L. frente à dose letal de radiação UVB em diferentes concentrações de rutina.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Neste estudo, a fototoxicidade foi avaliada em *Artemia salina* L. frente às doses letais de UVA e UVB. Este ensaio foi realizado com os náuplios em contato com a rutina livre e também com NLSR. Frente à radiação UVB, a rutina não apresentou sinais de fototoxicidade, pelo contrário, promoveu fotoproteção. Pode-se observar que a viabilidade dos microcrustáceos aumentou à medida que a concentração de rutina se elevou no meio. A partir da concentração de 500,00 µg/mL a viabilidade foi de 85,00%±13,22 (Tabela 10).

Os resultados (Figura 19) demonstram que a rutina livre teve a capacidade de proteger os náuplios de *Artemia salina* L. dos efeitos nocivos oriundos da radiação UVB.

As NLSR também não apresentaram fototoxicidade frente à radiação UVB. É possível observar que o poder fotoprotetor se sobressaiu em relação à rutina livre. Todas as concentrações testadas foram capazes de proteger os náuplios (Figura 20) contra os efeitos deletérios da radiação UVB, a menor concentração igual a 31,25 µg/mL exibiu uma viabilidade de 88,33%±2,89 (Tabela 11).

Tabela 11 - Mostra a viabilidade da *Artemia salina* L. frente à dose letal UVB em diferentes concentrações de NLSs de rutina.

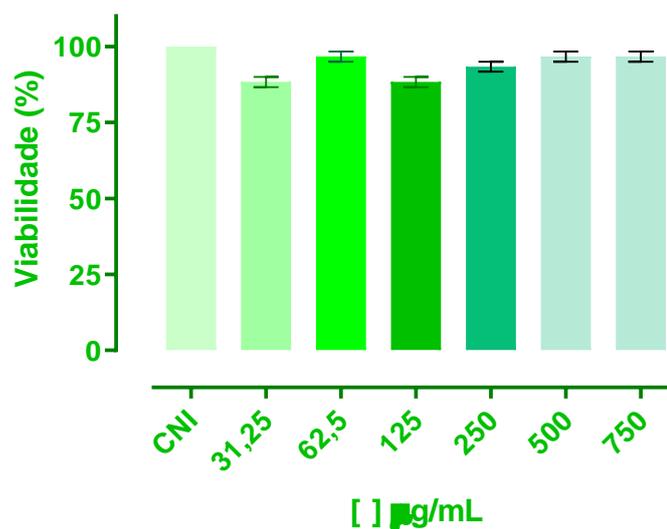
[] µg/MI	% de viabilidade
31,25	88,33±2,89
62,50	96,67±2,89
125,00	93,33±2,89
250,00	93,33±2,89
500,00	96,67±2,89
750,00	96,67±2,89

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Esses resultados mostram que as NLSR foram mais eficazes que a rutina livre, pois atua com um controle de liberação do ativo no meio ao longo do período de 24 horas. A rutina livre já se encontra solúvel no meio e promove seu mecanismo fotoprotetor e antioxidante de imediato, não sendo capaz de manter o meio livre de componentes oxidantes que provavelmente ainda se formem por um período mais prolongado após a radiação UV. Já as NLSR atuam, inicialmente, como fotoprotetora e, ao longo do período de 24 horas, libera a rutina aos poucos (dados demonstrados na liberação *in vitro*) o que permite que esse composto reaja com componentes oxidativos presentes no meio ao longo desse período, neutralizando

sua ação e proporcionando a viabilidade das *Artemias* ao longo das 24 horas de análise.

Figura 20 - Avaliação da fototoxicidade da *Artemia salina* frente à dose letal de radiação UVB em diferentes concentrações de NLSs contendo rutina.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Os resultados com a exposição à radiação UVA obtidos com a rutina livre, demonstraram assim como em UVB, que a rutina promoveu fotoproteção. Os resultados obtidos em relação a viabilidade de todas as concentrações testadas foram expressas na Tabela 12.

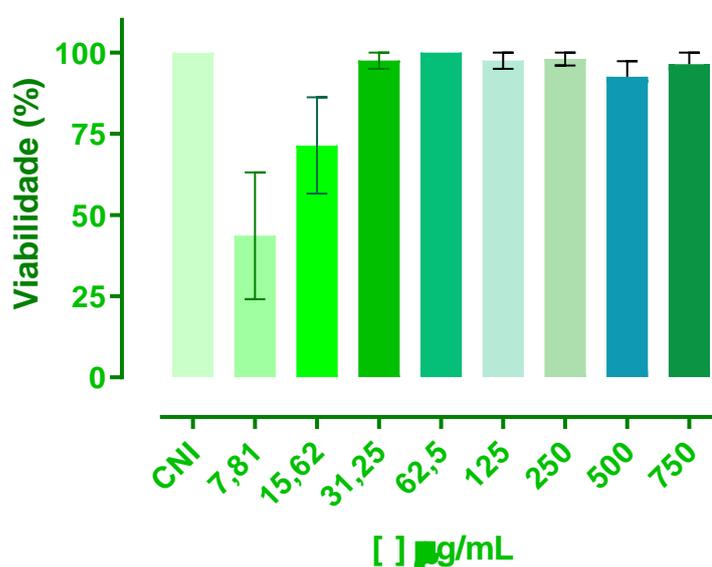
Tabela 12 - Mostra a viabilidade da *Artemia salina* frente à dose letal em diferentes concentrações de rutina.

[] µmg/MI	% de viabilidade
7,81	16,67± 28,56
15,62	39,58± 26,93
31,25	97,50 ± 5,00
62,50	100,00 ± 0,00
125,00	97,50±5,00
250,00	98,00± 4,00
500,00	92,50±9,57
750,00	94,00±10,39

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Semelhante ao que ocorreu frente à radiação UVB, a viabilidade foi crescente em relação ao aumento da concentração de rutina no meio (Figura 21), entretanto isso ocorreu a partir de concentrações menores de rutina, visto que a concentração de 31,25 µg/mL apresentou uma viabilidade de 97,50±5,00 % (Tabela 12) e essa mesma concentração na radiação UVB exibiu uma viabilidade de apenas 3,33%±2,88 (Tabela 10).

Figura 21 - Viabilidade da *Artemia salina* L. frente à dose letal UVA em diferentes concentrações de rutina.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Tabela 13 - Mostra a viabilidade da *Artemia salina* frente à dose letal em diferentes concentrações de NLSR.

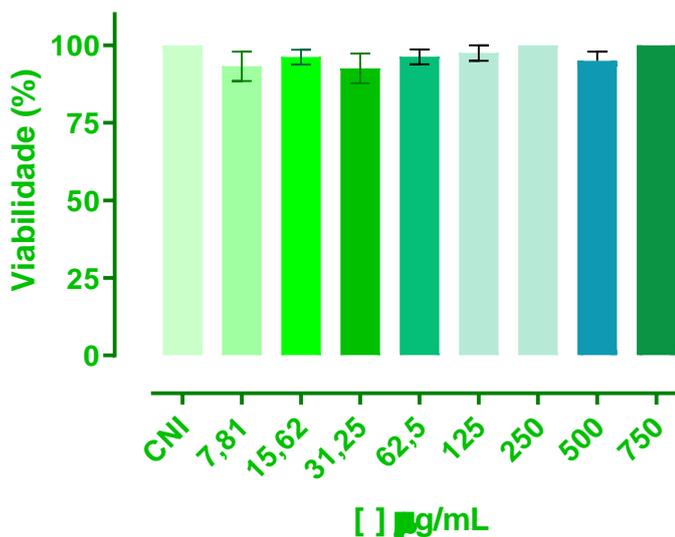
[] µmg/MI	% de viabilidade
7,81	90,95±10,13
15,62	96,18±4,81
31,25	92,50±9,57
62,50	88,75±13,14
125,00	97,50±5,00
250,00	100,00±0,00
500,00	95,00±5,77
750,00	100,00±0,00

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

As NLSR também promoveram uma maior fotoproteção em relação à rutina livre, contra os efeitos nocivos desencadeados pela exposição à radiação UVA

(Figura 22). A menor concentração testada de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ e a maior de 750 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram uma viabilidade de 90% e 100%, respectivamente (Tabela 13).

Figura 22 - Viabilidade da *Artemia salina* L. frente à dose letal UVA em diferentes concentrações de NLSR.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A fotoproteção observada nos resultados de fototoxicidade UVA e UVB corroboram com os resultados de varredura observados para a rutina livre e NLSR apresentados nos estudos de absorvância. As NLSR apresentaram valores aumentados de absorção e FPS_{UVB} quando comparados com a rutina livre, e nas concentrações avaliadas foram também capazes de proteger as *Artemias* da dose letal aplicada (UVB e UVA). Em relação aos resultados frente à radiação UVA fica nítido que as NLSR apresentaram uma fotoproteção mais intensificada do que UVB, visto que estas foram capazes de proporcionar proteção em doses a partir de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ mantendo $90,95\% \pm 10,13$ (Tabela 13) das *Artemias* viáveis, corroborando com a maior intensidade que as NLSR foram capazes de absorver em 370 nm (Figura 13).

A rutina é um flavonóide com diversas propriedades biológicas, das quais a antioxidante pode estar atuando em combinação com a capacidade de absorção da radiação UV aumentada das NLSR. A radiação UV é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), promovendo danos diretos nos lipídios das membranas celulares (peroxidação lipídica), causando danos diretos na composição das células,

diminuição da matriz extracelular, via ação das metaloproteinases e até mesmo nos danos no núcleo celular levando a danos no DNA das células. A ação antioxidante da rutina pode atuar diretamente em tais EROs anulando sua ação danosa e prevenindo a morte das Artemias (MARTINS et al., 2020).

5.6.3 Estudo de fotoproteção usando *Artemia salina* L. frente à radiação UVA e UVB

Os resultados do estudo de fotoproteção frente à radiação UVB, apresentados na Tabela 14 e Figura 23, mostram que a formulação contendo NLSR e a formulação contendo rutina livre, exibiram uma fotoproteção considerável contra os danos provocados pela radiação UVB. A viabilidade dos naúplios para ambas as formulações foram por volta de 86%.

Tabela 14 - Mostra a viabilidade da *Artemia salina* L. frente à dose letal de UVB usando placa de quartzo.

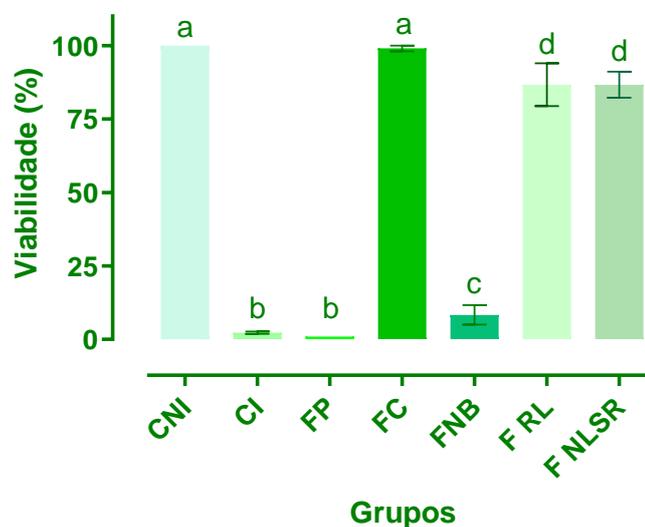
Grupos	% de viabilidade
CNI	100,0±0,00
CI	0,0±0,00
FP	0,0±0,00
FC	98,30±2,88
FNB	8,30±5,77
FRL	86,60±12,58
FNLSR	86,60±7,64

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Onde: CNI-controle não irradiado, CI- controle irradiado, FP-formulação placebo, FC-formulação comercial (FPS-60), FNB-formulação contendo NLS sem rutina, FRL-formulação contendo rutina livre, FNLSR- formulação contendo NLS de rutina.

Esse fato, assim como no ensaio de fototoxicidade, pode estar associado à capacidade antioxidante da rutina. O consumo natural de oxigênio pelos seres vivos resulta em processos oxidativos que é neutralizado pelo próprio organismo quando, em condições normais, por sistemas antioxidantes fisiológicos. No entanto, há um desequilíbrio entre a produção de EROs e os sistemas antioxidantes, quando em situações patológicas ou sob efeitos da exposição excessiva à radiação ultravioleta resultando em um estresse oxidativo que pode desenvolver danos celulares na pele (BALOGH et al., 2011). Segundo Ávila e Primo (2021), há vários estudos que correlacionam a capacidade antioxidante de substâncias e o fornecimento de efeitos fotoprotetores contra a radiação UV.

Figura 23 - Viabilidade da *Artemia salina* L. frente à dose letal de UVB usando placa de quartzo.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Onde: CNI- controle não irradiado, CI- controle irradiado, FP- formulação placebo, FC- formulação comercial (FPS 60), FNB- formulação contendo NLS sem rotina, FRL-formulação contendo rotina livre, FNLSR-formulação contendo NLS com rotina. Os valores representados por letras diferentes foram significativamente diferentes pelo teste *t Student*, com $p < 0,05$.

Foi visto que a rotina além de exibir atividade antioxidante também previne, parcialmente, a apoptose induzida por UVB, mantendo o equilíbrio dos níveis de proteínas responsáveis pelo controle do crescimento e proliferação celular (MARTINS et al., 2020).

As formulações controle apresentaram resultados coerentes e mostram que os resultados são confiáveis, a formulação comercial exibiu $98,30 \pm 2,88\%$ de viabilidade enquanto que a formulação placebo não exibiu fotoproteção, já a formulação contendo NLSB apresentou uma viabilidade de $8,30\%$. O que pode ser atribuído a propriedades das NLSs e sua composição contendo componentes cerosos capazes de absorver pequena quantidade de radiação UVB e atuarem ao mesmo tempo como uma barreira física (reflexão e espalhamento) (Figura 23) (MARTINS et al., 2014).

Os resultados de viabilidade no estudo de fotoproteção frente a UVA são apresentados na Tabela 15. Ambas, NLSR e rotina livre, apresentaram fotoproteção frente à radiação UVA e maneira semelhante, mantendo a viabilidade das Artemias

em torno de 58 %. A formulação contendo NLSB também conferiu fotoproteção (Figura 24), com uma viabilidade de $27,20 \pm 10,82\%$.

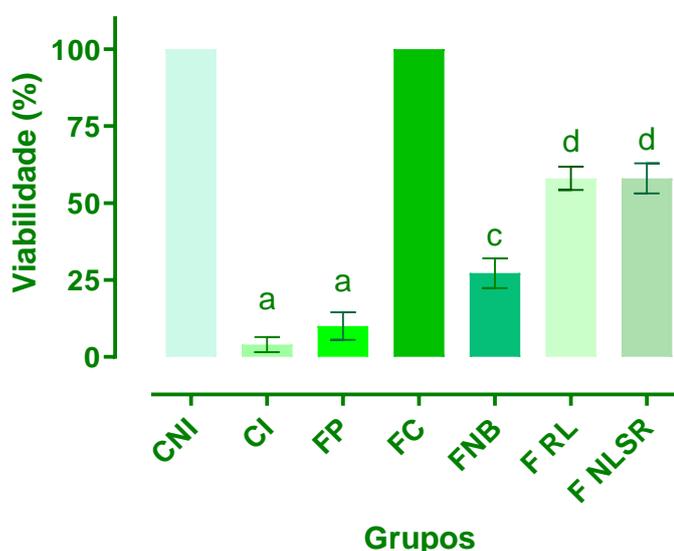
Tabela 15 - Mostra a viabilidade da *Artemia salina* L. frente à dose letal UVA usando placa de quartzo.

Grupos	% de viabilidade
CNI	100,0 \pm 0,00
CI	4,00 \pm 5,44
FP	10,00 \pm 10,00
FC	100,00 \pm 0,00
FNB	27,20 \pm 10,82
FRL	58,00 \pm 8,37
FNLSR	58,00 \pm 10,95

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Onde: CNI-controle não irradiado, CI- controle irradiado, FP-formulação placebo, FC-formulação comercial (FPS-60), FNB-formulação contendo NLS sem rotina, FRL-formulação contendo rotina livre, FNLSR- formulação contendo NLS de rotina.

Figura 24 - Viabilidade da *Artemia salina* L. frente à dose letal UVA usando placa de quartzo.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Onde: CNI- controle não irradiado, CI- controle irradiado, FP- formulação placebo, FC- formulação comercial (FPS 60), FNB- formulação contendo NLS sem rotina, FRL-formulação contendo rotina livre, FNLSR-formulação contendo NLS com rotina. Os valores representados por letras diferentes foram significativamente diferentes pelo teste *t Student*, com $p < 0,05$.

Os resultados de fotoproteção frente à radiação UVA mostram que as formulações contendo NLSs com rotina e rotina livre não foram capazes de proteger com maior intensidade do que frente à radiação UVB. Entretanto, no ensaio de

fototoxicidade mostraram fotoproteção em doses baixas de 7,81 µg/mL, mantendo 90,95%±10,13 da viabilidade das *Artemias* (Tabela 13). Isso mostra que a fotoproteção das NLSR é mais intensa frente à radiação UVB no quesito de fotoproteção por absorção. Já frente à radiação UVA, a fotoproteção ocorre de forma mais evidente pela ação fotoquimiopreventiva e ação antioxidante.

6 CONCLUSÃO

As NLSR apresentaram características satisfatórias para aplicação tópica. O tamanho de partícula obtido esteve entre a faixa considerada ideal e apresentou uma distribuição estreita com partículas homogêneas que favorecem a penetração da rutina na epiderme para o desenvolvimento de sua ação antioxidante, que resulta em vários benefícios para a pele. Os resultados obtidos através do PZ indicaram que há estabilidade entre as nanopartículas, parâmetro importante para impedir a aglomeração entre elas. Ademais, a eficiência de encapsulamento foi bastante satisfatória.

A caracterização físico-química mostrou que não houve interações entre a rutina e seus componentes. A técnica de DRX mostrou que, possivelmente, houve uma amorfização da rutina nas NLSR, o que pode estar diretamente associado a seu aumento de penetração.

A capacidade de absorção da radiação UV, mostrando potencial para a fotoproteção, foi aumentada para as NLSR como evidenciado pelo método espectrofotométrico.

A penetração da rutina foi aumentada pela aplicação das NLSR na pele, como mostrado no ensaio usando pele de porco, o que justifica sua capacidade fotoquimiopreventiva da rutina na pele em outros trabalhos na literatura. Além disso, as NLSR mostraram ser atóxicas frente ao teste de toxicidade usando *Artemia salina* L.

O modelo utilizando a *Artemia salina* L., demonstrou ser uma ferramenta eficaz e promissora para exploração do potencial fototóxico e fotoprotetor de substâncias em estudos preliminares, pois o microcrustáceo foi sensível à radiação UV possibilitando a execução desses ensaios. Além disso, apresenta várias vantagens quando comparado com os métodos alternativos já usados, principalmente no tocante ao custo, já que o valor para o desenvolvimento destes são elevados. O uso das Artemias mostrou ser uma metodologia simples e de fácil execução, com pré-requisitos mínimos relacionados a condições experimentais com baixo custo operacional e tempo de execução.

Pode-se concluir que o modelo empregado nesse estudo para a avaliação de fotoproteção e fototoxicidade é uma ferramenta muito útil e promissora para ser usado como modelo alternativo em avaliações de produtos com finalidade de fotoproteção,

já que mostrou ser bastante sensível na avaliação dos grupos estudados, possibilitando determinar diferenças entre sistemas nanoestruturados usando um composto natural como modelo de substância avaliada.

REFERÊNCIAS

- AANISAH, N. et al. Development of Solid Lipid Nanoparticle-Loaded Polymeric Hydrogels Containing Antioxidant and Photoprotective Bioactive Compounds of Safflower (*Carthamus tinctorius L.*) for Improved Skin Delivery. **Langmuir**, v. 39, n.5 p. 1838-1851, 2023.
- ACSOVA, A. et al. The real UVB photoprotective efficacy of vegetable oils: in vitro and in vivo studies. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 20, p. 139-151, 2021.
- AGRAWAL, G. et al. Devices and techniques used to obtain and analyze three-dimensional cell cultures. **Biotechnology Progress**, v. 37, n. 3, p. 1-18, 2021.
- AMASYA, G. et al. QbD guided early pharmaceutical development study: Production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. **International journal of pharmaceutics**, v. 563, p. 110-121, 2019.
- AMPARO, T. R. et al. *In vitro* and in silico investigation of the photoprotective and antioxidant potential of Protium spruceanum leaves and its main flavonoids. *In: Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 431, p. 1-12, 2022.
- ANBUALAKAN, K. et al. A Scoping Review on the Effects of Carotenoids and Flavonoids on Skin Damage Due to Ultraviolet Radiation. **Nutrients**, v. 15, n 1, p. 1-17, 2022.
- ANTUNES, A. S. et al. *In vitro* Photoprotective Evaluation and Development of Novel Nanoemulsion with Chromone Derivative. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 1813-1821, 2021.
- APOLINÁRIO, A. C. et al. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais 'espaço lá embaixo'. **Química nova**, v. 43, p. 212-225, 2020.
- ARCK, P. C. When 3 Rs meet a forth R: Replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 132, p. 54-59, 2019.
- ARYANI, R. et al. Effect of solid lipid nanoparticles system on the stability of Green Tea leaves (*Camellia sinensis L. Kuntze*) extract as sunscreen. *In: Journal of Physics: Conference Series*. v. 1375, p. 1-7, 2019.
- ASSIS, L. V. M. et al. How does the skin feel sunlight? An integrative view of light sensitive molecules. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 47, p. 1-17, 2021.
- ÁVILA, L. A.; PRIMO, F. T. A utilização de antioxidantes orais na fotoproteção: revisão sistemática. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 33, n. 2, p. 97-108, 2021.

BALOGH, T. S. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 732-742, 2011.

BANTI, C. N.; HADJIKAKOU, S. K. Evaluation of Toxicity with Brine Shrimp Assay. **Bio-protocol**, v. 11, n. 2, p.1-7, 2021.

BARNES, J. L. et al. Carcinogens and DNA damage. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 5, p. 1213-1224, 2018.

BERNERD, F. et al. The damaging effects of long UVA (UVA1) rays: a major challenge to preserve skin health and integrity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 1-33, 2022.

BHATTACHARJEE, D. et al. A comparison of natural and synthetic sunscreen agents: a review. **International Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n.1, p. 3494-3505, 2021.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. An insight into toxicity and human-health-related adverse consequences of cosmeceuticals—a review. **Science of the total environment**, v. 670, p. 555-568, 2019.

BILAL, M.; MEHMOOD, S.; IQBAL, H. M. N. The beast of beauty: environmental and health concerns of toxic components in cosmetics. **Cosmetics**, v. 7, n. 1, p. 13, 2020.

BORGES, A. et al. Solid Lipid Nanoparticles as Carriers of Natural Phenolic Compounds. **Antioxidants**, v. 9, n. 10, p.1-24, 2020.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução, RE nº 30, de 01 de junho de 2012. Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências, 2012.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução, RE nº166, de 24 de julho de 2017. Aprova a validação de métodos analíticos e dá outras providências. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 237, de 22 de agosto de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Protetores Solares em Cosméticos. 2002.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 09, de 14 de março de 2011. Dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia e dá outras providências, 2011.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor, 2012.

CAMELO, P. T. L.; KELLERMANNI, R. C. S. Uso de fotoprotetores na prevenção de danos por exposição solar: conceitos, avaliação histórica e recomendações. **Scire Salutis**, v. 11, n. 2, p. 171-180, 2021.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

CASTRO, T. N.; MOTA, M. D.; LAIGNIER, E. C. Atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos: uma revisão sistemática de testes in vitro. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 51, n. 2, p. 557-588, 2022.

CEFALI, L. C. et al. Evaluation of In Vitro Solar Protection Factor (SPF), Antioxidant Activity, and Cell Viability of Mixed Vegetable Extracts from *Dormophandra mollis* Benth, *Ginkgo biloba* L., *Ruta graveolens* L., and *Vitis vinífera* L. **Plants**, v. 8, n. 11, p. 1-13, 2019.

COSTA, E. M. et al. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. **Thermochimica Acta**, v. 392, p. 79-84, 2002.

DAHABRA, L. et al. Sunscreens containing cyclodextrin inclusion complexes for enhanced efficiency: A strategy for skin cancer prevention. **Molecules**, v. 26, n. 6, p. 1-22, 2021.

DATTILO, A. M. et al. Estimate of the effects of ultraviolet radiation on the mortality of *Artemia franciscana* in naupliar and adult stages. **International Journal of Biometeorology**, v. 49, p. 388-395, 2005.

DEEPIKA, M. S. et al. A novel rutin-fucoidan complex based phytotherapy for cervical cancer through achieving enhanced bioavailability and cancer cell apoptosis. **Biomedicina & Farmacoterapia**, v. 109, p. 1181-1195, 2019.

DOULGKEROGLOU, M. N. et al. Automation, monitoring, and standardization of cell product manufacturing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1-12, 2020.

DUDHIPALA, N.; GORRE, T. Neuroprotective effect of ropinirole lipid nanoparticles enriched hydrogel for parkinson's disease: In vitro, ex vivo, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 1-24, 2020.

DURÁN, L. B. et al. Rutin-stevioside and related conjugates for potential control of grapevine trunk diseases. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 61, n. 1, p. 65-77, 2022.

EGAMBARAM, O. P.; PILLAI, K. S.; RAY, S. S. Materials Science Challenges in Skin UV Protection: A Review. **Photochemistry and photobiology**, v. 96, n. 4, p. 779-797, 2020.

ESQUIVEL, R. A. H. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN). *In*: SHARMA, A. **Nanocomposite Materials for Biomedical and Energy Storage Applications**. IntechOpen, 2022. ISBN 978-1-80355-619-2.

FAN, P. et al. Poor Status of Vitamin D: A Survey of Area With Lowest Sunlight Radiation in Sichuan, China. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 1-10, 2021.

FOGAÇA, L. A. **Encapsulação de compostos com fator de proteção solar e atividade antioxidante pela técnica de polimerização em miniemulsão para aplicação cosmética**. 2019. Dissertação (Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

GABROS, S.; NESSEL, T. A.; ZITO, P. M. Sunscreens and photoprotection. **In: StatPearls**. StatPearls Publishing, Treasure Island, 2022.

GAETANO, F. et al. Rutin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Characterization and In Vitro Evaluation. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1-16, 2021.

GALVAO, J. G. et al. Stearic Acid, Beeswax and Carnauba Wax as Green Raw Materials for the Loading of Carvacrol into Nanostructured Lipid Carriers. **Applied Sciences**, v.10, p. 1-13, 2020.

GEOFFREY, K.; MWANGI, A. N.; MARU, S. M. Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 7, p. 1009-1018, 2019.

GRACIA-CAZAÑA, T. et al. Influence of the Exposome on Skin Cancer La influencia del exposoma en el cáncer de piel. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 111, n. 6, p. 460-470, 2020.

HAILUN, H. et al. Natural components in sunscreens: Topical formulations with sun protection factor (SPF). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 134, p. 1-11, 2021.

HAMIDI, M. R.; JOVANOVA, B.; PANOVSKA, T. K. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. **Maced pharm bull**, v. 60, n. 1, p. 9-18, 2014.

HEDAYAT, K. et al. Comparison of UVA Protection Factor Measurement Protocols. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, p. 351-358, 2020.

HNAMTE, S.; KAVIYARASU, K.; SIDDHARDHA, B. Evaluation of Toxicity of Nanoparticles Using Brine Shrimp. **Model Organisms to Study Biological Activities and Toxicity of Nanoparticles**, Springer, Cingapurap, p. 401-415, 2020.

HOAI, T. T. et al. Evaluation of the cytotoxic effect of rutin prenanoemulsion in lung and colon cancer cell lines. **Journal of Nanomaterials**, v. 2020, p. 1-11, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA (Brasil). Exposição Solar. *In*: Instituto Nacional de Câncer – INCA. **Causas e prevenção do câncer**. [Brasília]: Instituto Nacional de Câncer, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt->

br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-solar. Acesso em: 12 mar 2023.

İPEK, S.; ÜSTÜNDAĞ, A.; EKE, B. C. Three-dimensional (3D) cell culture studies: a review of the field of toxicology. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1-11, 2022.

Jl, F. et al. New insights into ESIPT mechanism of three sunscreen compounds in solution: A combined experimental and theoretical study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 207, p. 1-7, 2021.

JOSE, J.; NETO, G. Role of solid lipid nanoparticles as photoprotective agents in cosmetics. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 1, p. 315-321, 2019.

KRAMBECK, K. et al. Design and characterization of Nanostructured lipid carriers (NLC) and Nanostructured lipid carrier-based hydrogels containing Passiflora edulis seeds oil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 600, p. 1-11, 2021.

KHAN, A. et al. A review of UV radiation protection on humans by textiles and clothing. **International Journal of Clothing Science and Technology**, v. 32, n. 6, p. 869-890, 2020.

KIM, S. Y. et al. Evaluation of phototoxicity of tattoo pigments using the 3 T3 neutral red uptake phototoxicity test and a 3D human reconstructed skin model. **Toxicologia In Vitro**, v. 65, p. 1-4, 2020.

KOSTYUK, V. et al. Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. **Rejuvenation Research**, v. 21, n. 2, p. 91-101, 2018.

LAIKOVA, K. V. et al. Advances in the understanding of skin cancer: ultraviolet radiation, mutations, and antisense oligonucleotides as anticancer drugs. **Molecules**, v. 24, n. 8, p.1-27, 2019.

LANGHANS, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1-14, 2018.

LEE, J. W. et al. Deciphering UV-induced DNA Damage Responses to Prevent and Treat Skin Cancer. **Photochemistry and photobiology**, v. 96, n. 3, p. 478-499, 2020.

LISH, R. A, D. et al. On how environmental and experimental conditions affect the results of aquatic nanotoxicology on brine shrimp (*Artemia salina*): A case of silver nanoparticles toxicity. **Environmental Pollution**, v. 255, p.1-9, 2019.

LOPALCO, P. et al. Lipid Profile Changes During the Development of *Artemia franciscana*, From Cysts to the First Two Naupliar Stages. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1-11, 2019.

- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química nova**, v. 27, p. 670-673, 2004.
- MAESTRI, E. The 3Rs principle in animal experimentation: a legal review of the state of the art in Europe and the case in Italy. **BioTech**, v. 10, n. 2, p. 1-11, 2021.
- MANSUR, J. S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Dermatol**, p. 121-4, 1986.
- MARKS, C. A. et al. Sensitivity of High Conservation Value Birds to Para-Aminopropiophenone (PAPP) Determined by Sub-Lethal Dose–Response Assay. **Animals**, v. 13, n. 3, p. 433, 2023.
- MARTINS, R. M. et al. Apple extract (*Malus sp.*) and rutin as photochemopreventive agents: evaluation of ultraviolet B-induced alterations on skin biopsies and tissue-engineered skin. **Rejuvenation Research**, v. 23, n. 6, p. 465-475, 2020.
- MARTINS, R. M. et al. Photoprotective effect of solid lipid nanoparticles of rutin against UVB radiation damage on skin biopsies and tissue-engineered skin. **Journal of Microencapsulation**, v. 39, n. 7-8, p. 668-679, 2022.
- MARTINS, R. M. et al. Skin penetration and photoprotection of topical formulations containing benzophenone-3 solid lipid microparticles prepared by the solvent-free spray- congealing technique. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 7, p. 644-653, 2014.
- MATSUI, M. S. et al. Non-Sunscreen Photoprotection: Antioxidants Add Value to a Sunscreen. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. v. 14, n. 1, p. 56-59, 2009.
- MATTA, M. K. et al. Effect of Sunscreen Application Under Maximal Use Conditions on Plasma Concentration of Sunscreen Active Ingredients. **Jama**, v. 321, n. 21, p. 2082-2091, 2019.
- MEENA, S. N.; MOHANDASS, C. Chapter 29 - Application of 3D cell culture techniques in cosmeceutical research. *In*: MEENA, S. N. e NAIK, M. M. **Advances in Biological Science Research**. Academic Press, 2019. p. 469-484. ISBN 978-0-12-817497-5.
- MEDEIROS, T. S. et al. Bemotrizinol-loaded carnauba wax-based nanostructured lipid carriers for sunscreen: optimization, characterization, and *in vitro* evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, p. 1-13, 2020.
- MEIGS, L. et al. Animal testing and its alternatives – the most important omics is economics. **ALTEX-Alternatives to animal experimentation**, v. 35, n. 3, p. 275-305, 2018.

MILIGI, L. Ultraviolet Radiation Exposure: Some Observations and Considerations, Focusing on Some Italian Experiences, on Cancer Risk, and Primary Prevention. **Environments**, v. 7, n. 10, p. 1-11, 2020.

MUSIELAK, E.; FELICZAK-GUZIŁ, A.; NOWAK, I. Optimization of the Conditions of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Synthesis. **Molecules**, v. 27, n. 7, p. 1-26, 2022.

NAEEM, A. et al. Synthesis and Evaluation of Rutin–Hydroxypropyl β -Cyclodextrin Inclusion Complexes Embedded in Xanthan Gum-Based (HPMC-g-AMPS) Hydrogels for Oral Controlled Drug Delivery. **Antioxidants**, v. 12, n. 3, p.1-26, 2023.

NEGAHDARI, R. et al. Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 4, p. 1719-1738, 2021.

NETTO MPHARM, G.; JOSE, J. Development, characterization, and evaluation of sunscreen cream containing solid lipid nanoparticles of silymarin. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 17, n. 6, p. 1073-1083, 2018.

NG'ETICH, W. K.; MARTINCIGH, B. S. A critical review on layered double hydroxides: Their synthesis and application in sunscreen formulations. **Applied Clay Science**, v. 208, p. 1-11, 2021.

NGOC, L. T. N. et al. Recent Trends of Sunscreen Cosmetic: An Update Review. **Cosmetics**, v. 6, n. 4, p. 1-15 64, 2019.

NORMAN, G. A. V. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach?. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 4, n. 7, p. 845-854, 2019.

NORMAN, G. A. V. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Part 2: Potential Alternatives to the Use of Animals in Preclinical Trials. **Basic to Translational Science**, v. 5, n. 4, p. 387-397, 2020.

NOURI, Z. et al. Solid Lipid Nanoparticles Enhance Protective Effect of Rutin against STZ-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells through Autophagy Suppression. **Journal of Nanomaterials**, v. 2022, p. 1-13, 2022.

OGUNJIMI, Abayomi Tolulope; CHAHUD, Fernando; LOPEZ, Renata FV. Isotretinoin-Delonix polymeric nanoparticles: Potentials for skin follicular targeting in acne treatment. **International journal of pharmaceutics**, v. 610, p. 1-12, 2021.

OLIVEIRA, C. A. et al. Safety and efficacy evaluation of gelatin-based nanoparticles associated with UV filters. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 531-537, 2016.

OPRIS, O. et al. Optimization of extraction conditions of polyphenols, antioxidant capacity and sun protection factor from *Prunus spinosa* fruits. Application in sunscreen formulation. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 18, n. 10, p. 2625-2636, 2021.

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

PAIVA, J. P. et al. Insights and controversies on sunscreen safety. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 707-723, 2020.

PAN, M. B. et al. Investigation of Cinnamaldehyde Derivatives as Potential Organic UV Filters. **Journal of Chemistry**, v. 2022, p. 1-7, 2022.

PANDEY, A. Solid Lipid Nanoparticles: A Multidimensional Drug Delivery System. *In*: Daima, H., NAVYA, P.N., Ranjan, S., Dasgupta, N., Lichtfouse, E. **Nanoscience in Medicine Vol. 1**. Solid Lipid Nanoparticles: A Multidimensional Drug Delivery System vol 39. Springer, Cham. 2020. ISBN 978-3-030-29206-5.

PATEL, K.; PATEL, D. K. Chapter 26 - The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. *In*: Watson, R. R.; PREEDY, V. R. **Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases**, 2^o edição. 2019. p. 457-479. ISBN 978-0-12-813820-5.

PESSOA A. F. M. et al., vitamina E e nanopartículas lipídicas sólidas (NLSS): parceiras na cicatrização da ferida diabética. **Revista Enfermagem Atual**, v. 95, n. 33, p. 1-6, 2021.

PECORARO, Roberta et al. Artemia salina: A microcrustacean to assess engineered nanoparticles toxicity. **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 3, p. 531-536, 2021.

PINZARU, I. et al. Proniosomal Gel for Topical Delivery of Rutin: Preparation, Physicochemical Characterization and In Vitro Toxicological Profile Using 3D Reconstructed Human Epidermis Tissue and 2D Cells. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, pág. 85, 2021.

PISTOLLATO, F. et al. Current EU regulatory requirements for the assessment of chemicals and cosmetic products: challenges and opportunities for introducing new approach methodologies. **Archives of toxicology**, v. 95, p. 1867-1897, 2021.

PULSONI, I. et al. Comparison between Franz diffusion cell and a novel micro-physiological system for in vitro penetration assay using different skin models. **SLAS technology**, v. 27, n. 3, p. 161-171, 2022.

ROBINSON, J. K. et al. Real-time UV measurement with a sun protection system for warning young adults about sunburn: prospective cohort study. **JMIR mHealth and uHealth**, v. 9, n. 5, p. e25895, 2021.

ROCHA, B. A. et al. Antiinflammatory activity of carnauba wax microparticles containing curcumin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 59, p. 1-7, 2020.

RODRIGUES, L. R.; JOSE, J. Exploring the photo protective potential of solid lipid nanoparticle-based sunscreen cream containing Aloe vera. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 20876-20888, 2020.

ROMANHOLE, R. C. et al. Unplanned absorption of sunscreen ingredients: Impact of formulation and evaluation methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 591, p. 1-22, 2020.

SANDER, M. et al. The efficacy and safety of sunscreen use for the prevention of skin cancer. **Canadian Medical Association journal (CMAJ)**, v. 192, n. 50, p. E1802-E1808, 2020.

SAQR, A. AL et al. Enhanced cytotoxic activity of docetaxel-loaded silk fibroin nanoparticles against breast cancer cells. **Polymers**, v. 13, n. 9, p. 1-18, 2021.

SARKAR, S.; GADDAMEEDHI, S. Solar ultraviolet-induced DNA damage response: Melanocytes story in transformation to environmental melanomagenesis. **Mutagênese ambiental e molecular**, v. 61, n. 7, p. 736-751, 2020.

SATARI, A. et al. Rutin: A Flavonoid as an Effective Sensitizer for Anticancer Therapy; Insights into Multifaceted Mechanisms and Applicability for Combination Therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1-10, 2021.

SAYED, Farheen N.; POLSHETTIWAR, Vivek. Facile and sustainable synthesis of shaped iron oxide nanoparticles: effect of iron precursor salts on the shapes of iron oxides. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2015.

SAYDÉ, T. et al. Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. **Nanomaterials**, v. 11, n. 2, p. 1-27, 2021.

SAYRE, R. M. et al. A comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, n. 3, p. 559-566, 1979.

SCHNEIDER, S. L.; LIM, H. W. Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 35, n. 6, p. 442-446, 2019.

SECCO, G. G.; BELTRAME, B. M.; SCHWANZ, M. Avaliação in vitro do fator de proteção solar (FPS) de cosméticos fotoprotetores manipulados. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 4, p. 242-249, 2018.

SEMWAL, R. et al. Health benefits and limitations of rutin - A natural flavonoid with high nutraceutical value. **Phytochemistry Letters**, v. 46, p. 119-128, 2021.

SHANMUGAM, R. et al. Formulation and characterization of chitosan encapsulated phytoconstituents of curcumin and rutin nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, p. 1807-1812, 2017.

- SHARMA, G. et al. Scope of solid lipid nanoparticles per se as all-purpose moisturising sunscreens. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 75, p. 1-7, 2022.
- SHARIFI-RAD, Majid et al. Síntese verde de nanopartículas de prata usando *Astragalus tribuloides delile*. extrato de raiz: Caracterização, atividades antioxidantes, antibacterianas e anti-inflamatórias. *Nanomaterials*, v. 10, n. 12, pág. 1-17, 2020.
- SHIRODKAR, R. K. et al. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Emerging Lipid Based Drug Delivery Systems. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 53, p. 440-453, 2019.
- SILVA, J. G. et al. Toxicological evaluation of plant species from the Caatinga and determination of the LC50 against *Artemia salina* Leach. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 3, p. 8428-8441, 2022.
- SILVA, W. A. et al. Perfil fitoquímico e avaliação toxicológica *Croton Heliotropiifolius* frente à *Artemia Salina* Leach. **Brazilian Journal of health review**, v. 3, n. 4, p. 10580-10590, 2020.
- SINGER, S.; KARRER, S.; BERNEBURG, M. Modern sun protection. **Current opinion in pharmacology**, v. 46, p. 24-28, 2019.
- SOLANO, F. Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1-18, 2020.
- SORITA, G. D. et al. Lipid composition optimization in spray congealing technique and testing with curcumin-loaded microparticles. **Advanced Powder Technology**, v. 32, n. 5, p. 1710-1722, 2021.
- SOUNDHARAJ, S.; RAMACHANDRAN, M.; SIVA, J. I. C. The Role of Ultraviolet Radiation in Human Race. **Environmental Science and Engineering**, v. 1, n. 2, p. 48-56, 2022.
- STAPPEN, G. V. et al. Review on integrated production of the brine shrimp *Artemia* in solar salt ponds. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 1054-1071, 2020.
- STRACKE, F. et al. Multiphoton microscopy for the investigation of dermal penetration of nanoparticle-borne drugs. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n10, p. 2224-2233, 2006.
- SUH, S. et al. The banned sunscreen ingredients and their impact on human health: a systematic review. **International Journal of Dermatology**, v. 59, n. 9, p. 1033-1042, 2020.
- SVOBODOVÁ, A. R.; ULRICHOVÁ, J.; VOSTÁLOVÁ, J. Human keratinocyte cell line as a suitable alternative model for in vitro phototoxicity testing. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 94, p. 105-106, 2019.

TA, Q. et al. Chitosan nanoparticles for enhancing drugs and cosmetic components penetration through the skin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 160, p. 1-15, 2021.

TEMPLE, J. et al. Current strategies with implementation of three-dimensional cell culture: the challenge of quantification. **Interface focus**, v. 12, n. 5, p. 1-13, 2022.

THROM, C. M. et al. In vivo sun protection factor and UVA protection factor determination using (hybrid) diffuse reflectance spectroscopy and a multi-lambda-LED light source. **Journal of Biophotonics**, v. 14, n. 2, p. 1-8, 2021.

TIWARI, R. et al. An exploratory analysis on the toxicity & safety profile of Polyherbal combination of curcumin, quercetin and rutin. **Clinical Phytoscience**, v. 6, n. 1, p. 1-18, 2020.

TROMPETA, A. F. A. et al. Toxicity testing of MWCNTs to aquatic organisms. **RSC Advances**, v. 9, n. 63, p. 36707-36716, 2019.

TURAN, M.; MAMMADOV, R. Evaluation of the Toxicity Activity of Bioactive Compounds of Some Geophytes against Brine Shrimp (*Artemia salina* L.). **Acta Aquatica Turcica**, v. 17, n. 2, p. 195-201, 2021.

VILLALOBOS-HERNANDEZ, J. R.; MULLER-GOYMANN, C. C. Sun protection enhancement of titanium dioxide crystals by the use of carnauba wax nanoparticles: The synergistic interaction between organic and inorganic sunscreens at nanoscale. **International journal of pharmaceutics**, v. 322, p. 161-170, 2006.

VALOR, D. et al. Determining the Optimal Conditions for the Production by Supercritical CO₂ of Biodegradable PLGA Foams for the Controlled Release of Rutin as a Medical Treatment. **Polymers**, v.13, n. 10, p. 1-16, 2021.

VANKUDRI, R. et al. Preparation and therapeutic evaluation of rutin-phospholipid complex for antidiabetic activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 1, p. 90-101, 2016.

WANG, P. W. et al. Comparison of the Biological Impact of UVA and UVB upon the Skin with Functional Proteomics and Immunohistochemistry. **Antioxidantes**, v. 8, n. 12, p. 1-20, 2019.

WANG, H.; XU, T.; YIN, D. Emerging trends in the methodology of environmental toxicology: 3D cell culture and its applications. **Science of The Total Environment**, v. 870, p. 1-3, 2023.

WU, H. et al. Rutin-loaded silver nanoparticles with antithrombotic function. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1-11, 2020.

YADAV, A. R.; MOHITE, S. K. Toxicological evaluation of *Psidium guajava* leaf extracts using brine shrimp (*Artemia salina* L.) model. **Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology**, v. 12, n. 4, p. 258-260, 2020.

YAMADA, M.; MOHAMMED, Y.; PROW, T. W. Advances and controversies in studying sunscreen delivery and toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 153, p. 72-86, 2020.

YARDMAN-FRANK, J. M.; FISHER, D. E. Skin pigmentation and its control: From ultraviolet radiation to stem cells, **Experimental Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 560-571, 2021.

ZENG, Z. et al. Assessing the human health risks of perfluorooctane sulfonate by in vivo and in vitro studies. **Environment international**, v. 126, p. 598-610, 2019.

ZHOU, H. et al. Current advances of nanocarrier technology-based active cosmetic ingredients for beauty applications. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, p. 867-887, 2021.

ZHU, S. et al. Toxicity evaluation of graphene oxide on cysts and three larval stages of *Artemia salina*. **Science of the Total Environment**, v. 595, p. 101-109, 2017.

ZIELIŃSKA, A. et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 1-20, 2020.