



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**THAYSE SILVA MEDEIROS**

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS COMO ESTRATÉGIA  
PARA INCORPORAÇÃO DO FILTRO SOLAR BEMOTRIZINOL**

CAMPINA GRANDE

2019

**Thayse Silva Medeiros**

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS COMO ESTRATÉGIA  
PARA INCORPORAÇÃO DO FILTRO SOLAR BEMOTRIZINOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Bolívar P. G. de Lima Damasceno

Coorientador:

Prof. Dr. João Augusto Oshiro Júnior

CAMPINA GRANDE

2019

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.

M488c Medeiros, Thayse Silva.

Carreadores lipídicos nanoestruturados como estratégia para incorporação do filtro solar bemotrizinol [manuscrito] / Thayse Silva Medeiros. - 2019.

63 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.

"Orientação : Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia - CCBS."

"Coorientação: Prof. Dr. João Augusto Oshiro Júnior, Departamento de Farmácia - CCBS."

1. Fotoproteção. 2. Nanotecnologia. 3. Radiação solar ultravioleta. 4. Protetor solar. I. Título

21. ed. CDD 615.1

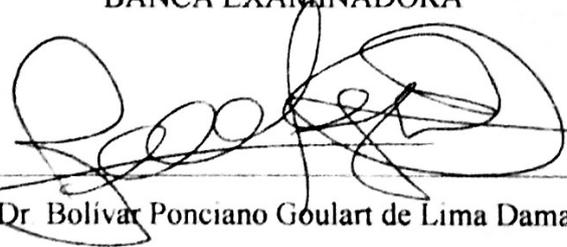
**THAYSE SILVA MEDEIROS**

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS COMO ESTRATÉGIA  
PARA INCORPORAÇÃO DO FILTRO SOLAR BEMOTRIZINOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 23 de agosto de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno  
(Orientador)



---

Prof. Dr. Geovani Pereira Guimarães



---

Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me sustentado e dado forças para caminhar até aqui sem desistir. Por ter colocado tantas pessoas de bom coração no meu caminho, e que foram de fundamental importância.

À minha família, em especial a minha mãe e pai, que tanto acreditam e investem em mim. À minha querida mãe que se faz tão boa ouvinte e é sempre o melhor colo quando tudo insiste em sair dos trilhos.

Aos meus queridos amigos que foram por tantas vezes refúgio quando precisava recarregar as energias.

Aos estimados colegas que o mestrado me presenteou, por sempre estarem na torcida para que tudo corresse bem.

Ao meu professor e orientador, Bolívar Damasceno, pela oportunidade de desenvolver a pesquisa que acredito e por toda contribuição, pelo equilíbrio, calma e paz que consegue nos transmitir. Agradeço por tudo e o parabéns pelo profissional que é.

Ao meu coorientador, João Augusto, por acreditar no meu trabalho, pelo incentivo que me deu, pela tão valiosa orientação, pela sua amizade e por contribuir tanto com o meu crescimento. Parabéns pelo pesquisador e orientador admirável que é.

Aos queridos amigos e ICs Lívia e Thiago, que foram de fundamental importância durante o processo de desenvolvimento da pesquisa. Obrigada pelos feriados, sábados e noites que ficaram ao meu lado e cuidaram do que precisei com o mesmo carinho que eu. Obrigada por toda dedicação!

Aos companheiros do LDCPF, pelo conhecimento e amizade compartilhados, especialmente as amigas queridas Larissa e Joandra. Sentirei saudades de todos!

A todos que fazem o PPGCF pela contribuição que deram à minha formação acadêmica. A Dilma por todo apoio, carinho e suporte.

Aos laboratórios LABDEM (UEPB), LASID (UFRN), CERTIBIO (UFCG e UEPB) por cederem espaço e equipamentos para que muitas das análises fossem realizadas.

A Geovani Pereira e Fábio Formiga por contribuírem com seus valiosos conhecimentos em mais esta etapa da minha vida acadêmica.

E a todos que de alguma contribuíram para que este projeto fosse concretizado. Muito obrigada!

“Mudaste o meu pranto em dança, a minha  
veste de lamento em veste de alegria, para que  
o meu coração  
cante louvores a Ti e não se cale.  
Senhor, meu Deus, eu te darei graças para  
sempre.”

(Salmos 30:11-12)

## RESUMO

O câncer de pele representa, atualmente, o tipo mais comum no mundo, abrangendo 33% dos casos de câncer no Brasil. Deste modo, com o objetivo de prevenir o câncer de pele, o envelhecimento precoce e outros inconvenientes relacionados à exposição à radiação UV, é crescente o interesse e pesquisas sobre fotoprotetores. Porém, o risco de fotodegradação, permeação cutânea e absorção sistêmica desses produtos diminuem sua segurança. Além disso, a alta lipofilia dos filtros solares convencionais e baixa permanência na pele levam ao seu uso inadequado, reduzindo a eficácia. Uma alternativa para ultrapassar tais impasses é a incorporação de filtros solares em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), que são dispersões aquosas de nanopartículas formadas por misturas de lipídios sólidos e líquidos. Neste estudo, CLN contendo o filtro solar orgânico bemotrizinol (BEMT), que apresenta amplo espectro de absorção e fotoestabilidade aumentada, foram desenvolvidos e caracterizados utilizando a cera de carnaúba (lipídio sólido) e o triglicerídeo do ácido cáprico e caprílico (lipídio líquido), através da técnica de ultrassonicação. Um planejamento experimental do tipo Box-Behnken foi realizado para otimizar os CLN e avaliar a influência de três variáveis independentes sobre o tamanho das partículas, então o sistema ideal foi escolhido para caracterização. O tamanho das partículas foi avaliado utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), e diminuiu à medida que a concentração de tensoativos aumentou, sendo analisado até 30 dias de armazenamento, apresentando-se em  $122,4 \pm 0,3$  nm no último dia. A microscopia eletrônica de varredura mostrou partículas esféricas, íntegras e sem aglomerados. As análises de termogravimetria, calorimetria exploratória diferencial, e a espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier confirmam a incorporação do filtro solar nos nanocarreadores. A difração de raios-X permitiu a observação da redução da cristalinidade nos CLN, resultado desejado para o nanossistema. Análises *in vitro* qualitativa e quantitativa realizadas por espectroscopia na região ultravioleta indicaram que um aumento da atividade fotoprotetora do filtro solar foi observado quando incorporado aos CLN. Deste modo, os resultados sugerem que o CLN desenvolvido pode ser um sistema inovador, promissor, estável e biocompatível para o uso em fotoprotetores.

**Palavras-chave:** radiação UV; nanossistemas; fotoproteção; nanotecnologia.

## ABSTRACT

Skin cancer is currently the most common type in the world, accounting for 33% of cancer cases in Brazil. Thus, in order to prevent skin cancer, premature aging and other inconveniences related to exposure to UV radiation, there is growing interest and research on photoprotectors. However, the risk of photodegradation, skin permeation and systemic absorption of these products diminishes their safety. In addition, the high lipophilicity of conventional sunscreens and low skin permanence lead to improper use, reducing effectiveness. An alternative to overcoming such deadlocks is the incorporation of sunscreens into nanostructured lipid carriers (NLC), which are aqueous dispersions of nanoparticles formed by mixtures of solid and liquid lipids. In this study, NLC containing the organic UV filter bemotrizinol (BEMT), which has a broad absorption spectrum and increased photostability, was developed and characterized using carnauba wax (solid lipid) and caprylic and caprylic acid triglyceride (liquid lipid) by ultrasound technique. A Box-Behnken experimental design was performed to optimize the NLC and evaluate the influence of three independent variables on particle size, so the ideal system was chosen for characterization. The particle size was evaluated using the dynamic light scattering (DLS) technique and decreased as the surfactant concentration increased, being analyzed up to 30 days of storage, presenting at  $122.4 \pm 0.3$  nm on the last day. Scanning electron microscopy showed spherical particles, intact and without clusters. Analyzes of thermogravimetry, differential exploratory calorimetry, and Fourier transform infrared spectroscopy confirm the incorporation of sunscreen in nanocarriers. X-ray diffraction allows observing the reduction of crystallinity in the NLC, desired result for the nanosystem. Qualitative and quantitative *in vitro* analyzes performed by ultraviolet spectroscopy indicated that an increase in sunscreen photoprotective activity was observed when incorporated into the NLC. Thus, the results suggest that the developed NLC can be an innovative, promising, stable and biocompatible system for use in sunscreens.

**Keywords:** UV radiation; nanosystems; photoprotection; nanotechnology.

## ABREVIATURAS

a.C.- Antes de Cristo  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
BEMT - Bemotrizinol  
CC - Cera de carnaúba  
CF - Concentração de filtro solar  
CLN - Carreador Lipídico Nanoestruturado  
CLNB - carreador lipídico nanoestruturado branco  
CLNF - Carreador Lipídico nanoestruturado com filtro  
CT - Concentração de tensoativo  
DEM - Dose eritematógena mínima  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
DLS – *Dynamic Light Scattering*  
FDA - *U. S. Food and Drug Administration*  
FPS - Fator de Proteção Solar  
NLS - Nanopartícula lipídica sólida  
PABA - Ácido para-aminobenzoico  
PDI - Índice de Polidispersão  
PPD - *Persistent Pigment Darkening*  
RUV - Radiação Ultravioleta  
S80 - Span<sup>®</sup> 80  
T - Tempo de agitação  
T80 - Polissorbato 80  
TACC - Triglicerídeo do ácido cáprico e caprílico  
UV - Ultravioleta

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação do FPS para rotulagem de fotoprotetores.....	18
Tabela 2 - Fatores e níveis para realização do planejamento Box-Behnken 3 <sup>3</sup> .....	27
Tabela 3 - relação efeito eritemogênico (EE) e intensidade de radiação (I) para cada comprimento de onda. ....	31
Tabela 4 - Tamanho médio das partículas e IPD dos sistemas A, B e C.....	34
Tabela 5 - Matriz de planejamento Box-Behnken e a resposta tamanho. ....	35
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático para a resposta tamanho...	41
Tabela 7 - Valores de transição endotérmica dos componentes isolados e dos CLNB E CLNF. ....	49
Tabela 8 - Dados de TG dos CLNB, CLNF e componentes dos sistemas. ....	50
Tabela 9 - Valores do FPS <i>in vitro</i> . ....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Espectro de radiação no campo eletromagnético da luz solar. ....	15
Figura 2 - Estrutura química do filtro bemotrizinol. ....	21
Figura 3 - Matriz lipídica da NLS (esquerda) e do CLN (direita). ....	23
Figura 4 - Sistemas após agitação. ....	32
Figura 5 - Sistemas após centrifugação. ....	33
Figura 6 - Gráfico de pareto dos efeitos padronizados. ....	36
Figura 7 - Gráfico da superfície de resposta. Interação entre CT e CF. ....	37
Figura 8 - Gráfico da superfície de resposta. Interação entre T e CT. ....	38
Figura 9 - Gráfico da superfície de resposta. Interação entre T e CF. ....	39
Figura 10 - Valores preditos x valores observados. ....	40
Figura 11 - Tamanho médio das partículas ao longo de trinta dias. ....	43
Figura 12 - Fotomicrografia dos nanocarreadores. A: CLNB; B: CLNF. ....	46
Figura 13 - Gráficos de DSC dos componentes isolados e dos CLNB e CLNF. ....	47
Figura 14 - Gráficos de DSC das misturas binárias 1:1 de BEMT e demais componentes. ....	48
Figura 15 - Curvas de TG de todos os componentes e dos CLNB e CLNF. ....	50
Figura 16 - Difratoogramas da cera de carnaúba, BEMT, CLNB e CLNF. ....	52
Figura 17 - Espectro FT-IR dos componentes isolados, CLNB e CLNF. ....	53
Figura 18 - Comparação entre as absorvâncias do CLNF (A) e solução de BEMT (B). ....	54

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>14</b>
2.1 Pele e radiação solar ultravioleta (UV) .....	14
2.2 Fotoproteção .....	16
2.3 Protetor Solar .....	17
2.4 Nanopartículas lipídicas.....	22
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos .....	25
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 Material.....	26
4.2 Métodos .....	26
4.2.1 Estudos preliminares para obtenção dos CLN .....	26
4.2.1.1 Determinação da concentração de fase lipídica e razão de lipídios (sólido:líquido) .....	26
4.2.1.2 Planejamento experimental do tipo Box-Behnken 3 <sup>3</sup> para desenvolvimento do CLN contendo BEMT .....	26
4.2.2 Estabilidade frente à centrifugação .....	27
4.2.3 Obtenção dos CLN .....	27
4.2.4 Caracterização dos CLN.....	28
4.2.4.1 Análise do tamanho das partículas e índice de polidispersão (IPD) .....	28
4.2.4.2 Determinação do potencial Zeta.....	28
4.2.4.3 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	28
4.2.4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	29
4.2.4.5 Análise termogravimétrica (TG) .....	29
4.2.4.6 Difração de raios X (DRX) .....	29
4.2.4.7 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	29
4.2.4.8 Avaliação do potencial fotoprotetor <i>in vitro</i> .....	30
4.2.4.9 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) <i>in vitro</i> .....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>

5.1 Estudos preliminares para obtenção do CLN .....	32
5.1.1 Determinação da concentração de fase lipídica e razão de lipídios (sólido:líquido).....	32
5.1.2 Planejamento experimental do tipo Box-Behnken para incorporação do BEMT .....	34
5.2 Estabilidade frente à centrifugação .....	42
5.3 Caracterização dos CLN .....	42
5.3.1 Análise do tamanho das partículas, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta .....	42
5.3.2 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	45
5.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	46
5.3.4 Análise termogravimétrica (TG) .....	49
5.3.5 Difração de raios X (DRX) .....	51
5.3.6 Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)..	53
5.3.7 Avaliação do potencial fotoprotetor <i>in vitro</i> e FPS espectrofotométrico.....	54
<b>6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>56</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A radiação UV é uma parte do espectro eletromagnético que corresponde a faixa de comprimento de ondas de 100 a 400 nm e é subdividida em três subtipos de radiação: UVA, UVB e UVC. Os raios UVA compreendem a faixa de 320 a 400 nm e não são absorvidos pela camada de ozônio, penetrando profundamente a pele, sendo principais responsáveis pelo envelhecimento precoce da pele. Os raios UVB são de tamanho médio, estando na faixa de 280 a 320 nm. A maior parte da radiação UVB é absorvida pela camada de ozônio, mas a radiação restante consegue ser a principal responsável pelo aumento da produção de melanina e pode causar eritema, edema e dor, os sinais característicos de queimadura solar, em casos de exposição exacerbada. Os raios UVC são os mais curtos, medem de 100 a 280 nm, e são absorvidos pela camada de ozônio e pela atmosfera (WATSON; HOLMAN; MAGUIRE-EISEN, 2016; JANSEN; WANG; BURNETT et al., 2013).

Devido aos efeitos nocivos que uma exposição abundante à radiação solar pode causar à saúde, a humanidade vem desenvolvendo métodos para proteger-se desses raios desde pelo menos 400 a.C. e desde então as pesquisas com foco em fotoproteção evoluíram nos tempos modernos para uma ampla gama de produtos que apresentam fator de proteção solar (FPS) (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017; AL-JAMAL; GRIFFITH; LIM, 2014).

Os filtros ultravioletas são compostos orgânicos ou inorgânicos aplicados topicamente que absorvem, dispersam ou refletem os raios UV (SCHNEIDER; LIM, 2018). Os filtros inorgânicos, também chamados filtros físicos, atuam refletindo e espalhando a radiação UV. Os mais conhecidos e utilizados no mercado cosmético são o óxido de zinco (ZnO) e o dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), considerados biologicamente inertes, fotoestáveis e raramente induzem reações alérgicas. Os filtros orgânicos ou químicos, por sua vez, absorvem radiação UV e por reação fotoquímica diminuem os níveis de energia, reduzindo os danos celulares (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017; CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

No entanto, existem alguns inconvenientes quanto ao uso desses filtros químicos. Alguns causam toxicidade quando usados constantemente. Além disso, há o risco de permeação cutânea, o que poderia levar o filtro à corrente sanguínea e gerar toxicidade sistêmica ou comprometer a regulação hormonal. Ademais, são vulneráveis a fotodegradação, gerando radicais livre, e são compostos oleosos insolúveis em água, conferindo oleosidade à pele (MORABITO; SHAPLEY; STEELEY et al., 2011; COUTINHO; SANTOS; MANSUR, 2015).

A fim de minimizar tais problemas e garantir que permaneçam no estrato córneo (camada mais externa da pele), é crescente o interesse em nanotecnologia para aplicação em fotoprotetores. Atualmente há muitos estudos envolvendo nanopartículas poliméricas, lipossomas, ciclodextrinas, nano e microemulsões, e as nanopartículas lipídicas que são divididas em nanopartículas lipídicas sólidas (primeira geração) e carreadores lipídicos nanoestruturados (segunda geração) (COUTINHO; SANTOS; MANSUR, 2015). Destes, dá-se atenção especial as nanopartículas lipídicas, já que apresentam alta biocompatibilidade, boa estabilidade física, possibilidade de liberação controlada de substâncias ativas, fácil produção em larga escala e baixo custo em grande quantidade de matérias primas (DAUDT; EMANUELLI; KÜLKAMP-GUERREIRO et al., 2013).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), apresentam maior estabilidade do que as nanopartículas lipídicas sólidas, pois evita a recristalização dos lipídios e impede a expulsão do ativo (SATO; OSHIRO-JUNIOR; MACHADO et al., 2017). Além disso, CLN demonstram potencial para aplicação tópica devido à sua adesividade, onde aderem à superfície da pele formando um filme, proporcionando o efeito oclusivo (MITRI; SHEGOKAR; GOHLA, 2011; JAIN; RAHI; PANDEY, 2017).

Finalmente, a incorporação do bemotrizinol (Tinosorb<sup>®</sup> S), filtro solar orgânico com amplo espectro de absorção, a CLN pode apresentar vantagens, como proteção do ativo da fotodegradação, aumento do FPS de formulações fotoprotetoras, manutenção da formulação no estrato córneo, pode impedir permeação para camadas mais internas da pele, além de permitir posterior veiculação desse ativo em diferentes formas cosméticas, melhorando a estética e aceitação do produto.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados utilizando um planejamento experimental do tipo Box-Behnken, contendo o filtro solar orgânico bemotrizinol (BEMT) e realizar caracterização físico-química e avaliação do FPS *in vitro* dos sistemas obtidos.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Pele e radiação solar ultravioleta (UV)

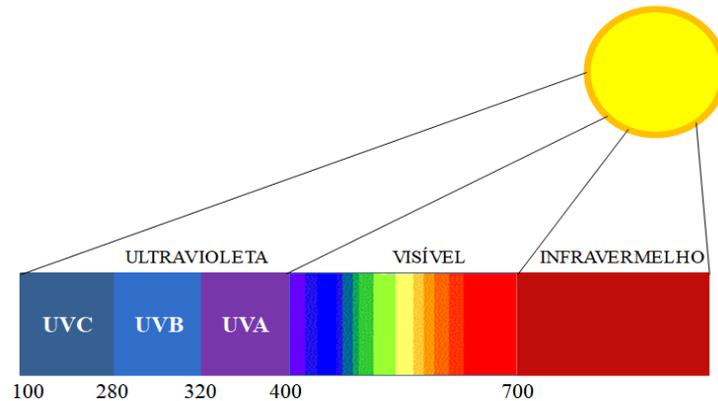
Grande fonte de energia natural, o sol também é essencial para a saúde humana, pois, atua no controle de processos químicos, bioquímicos e metabólicos, ritmos biológicos e bem-estar psicológico. Em resumo, a luz solar é capaz de induzir muitos efeitos a depender da intensidade da exposição a seus raios ultravioletas (UV) (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

A radiação solar UV é um importante parâmetro ambiental que afeta organismos vivos, materiais e atua em processos químicos atmosféricos. A quantidade de radiação UV que atinge a superfície da Terra depende do tempo e da localização, ou seja, do ângulo do zênite solar e de vários parâmetros meteorológicos, como nuvens, aerossóis, albedo de superfície e ozônio total. Uma redução de 10% no ozônio poderia levar a um aumento de 15 a 20% na exposição aos raios UV, dependendo do processo biológico, aumentando a incidência de danos à pele (MEDHAUG; OLSETH; REUDER, 2009; WANG; GE; GAO et al., 2014).

Apenas 5-10% dos raios emitidos pelo sol estão na faixa ultravioleta, mas é a quantidade suficiente para representar perigo para a saúde humana, com efeitos adversos agudos, como queimaduras solares e doenças crônicas, como o câncer de pele, além de possíveis efeitos deletérios nos olhos (COZZI; PERUGINI; GOURION-ARSIQUAUD, 2018; AL-JAMAL; GRIFFITH; LIM, 2014).

A radiação UV está compreendida no campo eletromagnético de 100 a 400 nm (Figura 1), sendo subdividida em três classes: UVA, UVB e UVC. A radiação UVC tem a faixa de comprimento de onda mais curto, medindo de 100-280 nm, e é completamente absorvida pela camada de ozônio e não chega à superfície terrestre. A radiação UVB apresenta o comprimento de onda médio, entre 280-320 nm e é responsável por apenas 5% da RUV (radiação ultravioleta) terrestre, mas seus efeitos são tipicamente maiores. A radiação UVA, por sua vez, mede de 320-400 nm e representa cerca de 95% da radiação UV (WATSON; HOLMAN; MAGUIRE-EISEN, 2016; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017; SAMBANDAN; RATNER, 2011).

**Figura 1 – Espectro de radiação no campo eletromagnético da luz solar.**



Fonte: autor.

A radiação UVA tem mais energia que a UVB e é moderadamente constante ao longo do dia. Por ter comprimento de onda mais longo, consegue penetrar e atingir as camadas profundas da pele através da junção epidérmica, onde os melanócitos residem na camada basal, e são os principais responsáveis pelo envelhecimento precoce da pele (SAMBANDAN; RATNER, 2011; HEO; HWANG; JEONG et al., 2018; WATSON; HOLMAN; MAGUIRE-EISEN, 2016, WANG; GE; GAO et al., 2014; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017).

A radiação UVB penetra nas camadas superiores da pele e atinge seu pico de intensidade em torno do meio-dia. Induz um bronzeado aumentando a produção de melanina, que confere uma quantidade mínima de fotoproteção, e também ocasiona dano à pele (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017). A superexposição a essa radiação causa eritema, edema e dor, que são sinais característicos de queimadura solar, podendo levar várias horas para se desenvolver. Além desses efeitos agudos, também ocasiona a supressão da imunidade adquirida e o aumento da imunidade inata. O principal benefício amplamente estabelecido da RUV (radiação ultravioleta) na pele é a fotossíntese da vitamina D que é iniciada pela conversão de 7-desidrocolesterol epidérmica em pré-vitamina D, induzida pelo UVB (COZZI; PERUGINI; GOURION-ARSIQUAUD, 2018; WATSON; HOLMAN; MAGUIRE-EISEN, 2016).

Tanto a radiação UVA quanto a UVB interagem com o DNA. Quando o DNA das células da pele absorve a radiação UV, pode ocorrer reticulação das bases da pirimidina, se os dímeros de DNA danificados não são reparados, mutações são criadas e podem levar ao câncer de pele (COZZI; PERUGINI; GOURION-ARSIQUAUD, 2018; CESTARI; DE OLIVEIRA; BOZA, 2012; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017).

Os efeitos da RUV na pele são iniciados em um nível molecular envolvendo cromóforos epidérmicos e dérmicos que absorvem radiação UV ou visível, cada um com um espectro de absorção característico. Quando esse cromóforo absorve a energia dos fótons, ele se move para um estado de energia mais alta ("excitado") e se torna instável. Isso pode resultar em uma mudança estrutural, na ligação a outras moléculas (efeito direto), para a radiação UVB, ou agindo como um sensibilizador que acelera a produção de espécies reativas de oxigênio levando a danos celulares e induzindo a produção de citocinas imunossupressoras e, ainda danificando biomoléculas adjacentes, como DNA ou proteínas (efeitos indiretos), para radiação UVA (HEO; HWANG; JEONG et al., 2018; AGARWAL, 2018; JANSEN et al., 2013a).

No estado excitado, os cromóforos são os iniciadores de todas as respostas fotobiológicas de curto e longo prazo. Os cromóforos endógenos da pele incluem DNA, melaninas e seus precursores, ácido urocânico, aminoácidos aromáticos, flavinas e porfirinas. Já os cromóforos exógenos incluem drogas e fotossensibilizantes (HEO; HWANG; JEONG et al., 2018; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017; JANSEN et al., 2013a).

O corpo humano tem barreiras naturais para evitar a penetração de radiação UV. O couro cabeludo, o pelo do corpo e o estrato córneo fornecem proteção física. O suor e o sebo ajudam a bloquear a radiação solar, absorvendo e refletindo a radiação UV e a luz visível. O mecanismo de defesa fisiológico intrínseco humano é composto pela melanina, o sistema anti-radicais livres e o complexo natural de reparo do DNA. Apesar disso, proteção adicional é sempre necessária, levando em consideração características individuais, como tipo de pele e tempo de exposição ao sol (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012; JANSEN et al., 2013b).

Dados apresentados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) (2018) e Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD) (2018) revelam que o câncer de pele é o tipo mais comum no mundo, correspondendo a 33% dos casos de câncer no Brasil, onde o não-melanoma (forma mais branda) é o mais frequente. O INCA estimou ainda para o biênio 2018-2019 mais 160 mil novos casos da doença no Brasil, e em torno de 6 mil novos casos de câncer de pele melanoma, forma que apresenta maior letalidade, números que alertam para a prevenção com uso de agentes fotoprotetores.

## **2.2 Fotoproteção**

Fotoproteção pode ser definida como um método terapêutico e profilático essencial, considerando as mudanças nos hábitos comportamentais da sociedade humana. Além do

cuidado com a saúde e os danos severos que uma exacerbada exposição ao sol pode causar, o cuidado com a estética e a prevenção do envelhecimento precoce tem gerando grande interesse no estudo e desenvolvimento de fotoprotetores (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008; SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Há diversos meios de fotoproteção, incluindo os agentes fotoprotetores biológicos, agentes fotoprotetores ambientais, agentes fotoprotetores físicos e formulações cosméticas contendo filtros solares, os protetores solares (AL-JAMAL; GRIFFITH; LIM, 2014).

Dentre os agentes fotoprotetores biológicos destacam-se os cromóforos encontrados na pele. São moléculas capazes de absorver fótons solares, refletir ou espalhar. Os principais são melanina, hemoglobina, bilirrubina, ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos e ácido urocânico. Os fatores ambientais influenciam a intensidade da irradiação UV solar. Esses fatores incluem a concentração de moléculas atmosféricas reflexivas ou absorventes, intensidade de radiação determinado pela hora do dia, cobertura terrestre e qualidades reflexivas das superfícies circundantes, bem como latitude e altitude. Dentre os agentes fotoprotetores físicos, estão incluídos óculos de sol, com proteção UVA e UVB, roupas que refletem ou espalham a radiação UV, chapéus e guarda-sol que protegem a pele dos raios solares (AL-JAMAL; GRIFFITH; LIM, 2014; JANSEN et al., 2013b).

### **2.3 Protetor Solar**

Os protetores solares estão disponíveis no mercado desde 1928. Surgiram inicialmente nos EUA como uma emulsão contendo benzil-salicilato e benzil-cinamato, porém, nos anos seguintes pouca atenção foi dada a esses agentes, tendo seu uso restrito. Em 1943, o ácido para-aminobenzoico (PABA) foi patenteado como o primeiro filtro solar estabelecido, marcando uma nova etapa da fotoproteção. Foi somente na década de 70 do Século XX que o uso de fotoprotetores se tornou popular, com a incorporação de filtros UVB em diferentes emulsões. Em 1979 iniciou-se o uso de filtros para proteção UVA, e entre 1979 e 1992 houve a introdução de compostos inorgânicos, levando a uma proteção otimizada. Constituem a primeira linha de prevenção e proteção da pele e são destinados à aplicação tópica e podem apresentar-se sob diferentes formas galênicas (BAILLO; LIMA, 2012; SCHALKA; REIS, 2011; NORONHA, 2014, SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Os protetores solares foram originalmente desenvolvidos para minimizar o eritema, desse modo, eram principalmente absorvedores de UVB. No entanto, estudos realizados com animais e humanos mostraram que outros efeitos patogênicos agudos e crônicos podem

ocorrer após exposição cumulativa a doses variadas de, também, radiação UVA. Foi, portanto, reconhecido que, para proteção contra danos que não sejam queimaduras solares, um protetor solar ideal deve proteger contra toda a faixa solar de UVB e UVA (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017; AL-JAMAL; GRIFFITH; LIM, 2014).

Padrões regulatórios para protetores solares diferem em todo o mundo. Nos Estados Unidos, os protetores solares são considerados medicamentos de venda livre e no Canadá são considerados medicamentos, a menos que contenham apenas dióxido de titânio, óxido de zinco ou PABA, onde são definidos como produtos de saúde naturais. A maioria dos protetores solares na Austrália é considerada como bens terapêuticos. Em outros países, incluindo a União Europeia, China, Índia, Japão e membros da Associação das Nações do Sudeste Asiático e do Mercosul (inclusive Brasil), os protetores solares são definidos como cosméticos, embora por critérios diferentes (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017).

No Brasil, a RDC nº 30 de 01 de junho de 2012 define protetor solar como qualquer preparação cosmética destinada a aplicação na pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação (ANVISA, 2012).

Para medir o potencial fotoprotetor dessas formulações, usa-se, principalmente, o fator de proteção solar (FPS), que é definido pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2013), como a relação numérica entre a dose eritematogênica mínima (DEM) de pele protegida por 2 mg/cm<sup>2</sup> com o substrato testado e a pele desprotegida após exposição a quantidades padronizadas de uma radiação solar simulada. Essa definição é aceita por todo o mundo, porém só pode ser usada para avaliar a proteção contra radiação UVB. A classificação quantitativa e qualitativa varia de baixa a muito alta (Tabela 1) (AL-JAMAL; GRIFFITH; LIM, 2014, NORONHA, 2014).

**Tabela 1 - Classificação do FPS para rotulagem de fotoprotetores.**

<b>PROTEÇÃO</b>	<b>FPS</b>
<b>BAIXA</b>	6-10
<b>MÉDIA</b>	15-25
<b>ALTA</b>	30-50
<b>MUITO ALTA</b>	50+

Fonte: Adaptado de Noronha, 2014.

Visando os danos que a radiação UVA também é capaz de causar, foram desenvolvidos testes para medição da proteção UVA. É usado o escurecimento persistente do pigmento (Persistent Pigment Darkening) (PPD) como ponto final clínico. O PPD é a razão entre a dose mínima de radiação necessária para induzir as primeiras alterações de pigmentação perceptíveis na pele protegida com o filtro e na pele desprotegida. O PPD, que é estável 2 horas após a exposição, é uma resposta prolongada após a irradiação com radiação UVA. Segundo a Comunidade Europeia, a recomendação para o Fator de Proteção UVA (PPD) é de no mínimo 1/3 do FPS (UVB). Os protetores solares recebem, então, uma classificação não quantitativa, variando de 1 a 4 estrelas. Sendo 1 proteção mínima e 4 proteção máxima (JANSEN et al., 2013b, BAILO; LIMA, 2012).

O método do comprimento de onda crítico, estabelecido pelo FDA exige determinação *in vitro* da absorbância do produto. Apenas formulações que possuem 90% da absorbância a um comprimento de onda a 370 nm podem ser considerados de amplo espectro de ação (proteção UVA e UVB) (AL-JAMAL; GRIFFITH; LIM, 2014; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017).

Os filtros UV são os principais componentes dos protetores solares, e são divididos em dois tipos: físicos ou inorgânicos, que a refletem ou dispersam os raios solares e podem representar até 10% da fotoproteção global, e químicos ou orgânicos, onde o principal mecanismo é de absorção. Uma vez que um fóton UV é absorvido, a energia deve ser liberada como fluorescência, fosforescência, calor, vibração, transferência de energia para outra molécula, ou fotorreação antes de aceitar outro fóton. Quanto mais rápida a taxa de retorno ao estado fundamental original, mais vantajoso é o filtro solar. No entanto, se o substrato sofrer uma fotorreação irreversível, a degradação por UV do substrato ocorre. É o tipo de filtro solar mais abundante no mercado (AL-JAMAL; GRIFFITH; LIM, 2014; CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

Os filtros inorgânicos são minerais e os mais utilizados na atualidade são o óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). São considerados biologicamente inertes, fotoestáveis e raramente induzem reações alérgicas. Entretanto, esses filtros conferem uma aparência esbranquiçada à formulação, e espalhabilidade diminuída, tornando-os menos aceitáveis esteticamente. Novas tecnologias, como micronização e encapsulamento, que diminuíram o tamanho dessas partículas, permitiram a produção de filtros cosmeticamente mais aceitáveis. A incorporação de TiO<sub>2</sub> e ZnO às nanopartículas trouxe melhorias, e os filtros solares tornaram-se mais transparentes, fluidos e com melhor espalhabilidade. Porém o uso desses nanossistemas gerou preocupações quanto a permeação e segurança percutânea, deste

modo, recomenda-se cuidado no uso desses filtros nanoparticulados (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012; GILBERT et al., 2016; MORABITO et al., 2011).

Os filtros solares orgânicos são compostos essencialmente aromáticos conjugados contendo grupos carboxílicos ou carbonilas e, geralmente, dissubstituídos, possuindo grupos aceptores e doadores de elétrons, como por exemplo, uma amina ou metoxila no anel aromático que absorvem a radiação em diferentes regiões espectrais. O tipo de substituinte e sua posição no anel aromático são os responsáveis pelos diferentes padrões de absorção observados para cada filtro. Por meio de um mecanismo de ressonância, os filtros químicos são capazes de absorver a radiação UV e reduzir sua energia, dissipando-a em forma de calor, menos nocivo ao organismo. São divididos em filtros UVA, UVB e de amplo espectro, cobrindo tanto a faixa UVA quanto UVB (JANSEN et al, 2013; AO; YUAN; GAO et al., 2018; PERES, 2015; COHEN; GRANT, 2016).

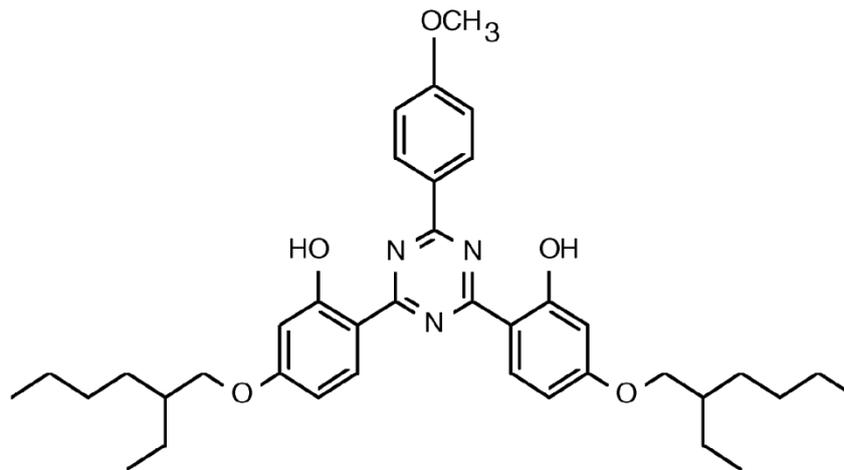
A segurança dos protetores solares está relacionada com a avaliação dos efeitos dos filtros químicos na pele (irritação e sensibilização) e também à possibilidade de permeação cutânea. Estudos comprovam que alguns filtros solares orgânicos são absorvidos pela pele após aplicação tópica e causam efeitos colaterais sistêmicos. Uma vez que chegam a circulação podem induzir reações fototóxicas e fotoalérgicas no organismo. A capacidade de permeação desses filtros está relacionada com o seu peso molecular. Uma vez que o peso molecular médio dos filtros comumente usados é inferior a 500 Da e compostos com pesos moleculares abaixo de 500 Da podem penetrar e ultrapassar o estrato córneo, permitindo a absorção sistêmica. Embora ofereçam vantagens cosméticas significativas em comparação com filtros inorgânicos, eles têm chamado atenção pela sua segurança devido a fraca fotoestabilidade (HEO; HWANG; JEONG et al., 2018; COZZI; PERUGINI; GOURION-ARSIQUAUD, 2018; VIOLANTE; SOUZA; VENTURINI et al., 2009; CHATELAIN; GABARD, 2001; BHUPTANI; PATRAVALE, 2019).

De fato, a fotoinstabilidade desses filtros UV pode levar a reações fotoquímicas que comprometem suas propriedades físicas (cor, aparência) e químicas (eficácia), que por sua vez, podem causar efeitos indesejáveis como a produção de filtros solares inativos ou moléculas altamente reativas que podem reagir com a pele. Após absorção de radiação UV, a molécula excitada pode atingir um equilíbrio estável através da isomerização reversível ou, sob certas condições, retornar à sua forma original (estado fundamental), a energia de ambos os estados excitados pode ser dissipado como calor, luz ou ambos ou transferido para as moléculas circundantes. Quando isso não acontece, a molécula pode quebrar ou se reorganizar (HEO; HWANG; JEONG et al., 2018; COUTINHO; SANTOS; MANSUR, 2015; COZZI;

PERUGINI; GOURION-ARSIQUAUD, 2018; VIOLANTE; SOUZA; VENTURINI et al., 2009; CHATELAIN; GABARD, 2001).

O filtro bemotrizinol (bis-etil-hexiloxifenol metoxifenil triazina), também conhecido pelo seu nome comercial Tinosorb<sup>®</sup> S, é uma molécula com amplo espectro de absorção abrangendo os comprimentos de onda de 280 a 380 nm (UVA e UVB), apresentando picos de absorção em 310 e 343 nm. É uma molécula lipossolúvel e fotoestável. Sua estrutura contém dois grupamentos hidroxila na posição *orto* (Figura 2), que permitem o fenômeno de tautomerismo, responsável pela rápida liberação de energia pela molécula após a absorção da radiação UV e facilita seu retorno ao estágio fundamental. Seu uso é permitido nos países do Mercosul, Japão, Austrália e União Europeia e em diversos outros países (TUCHINDA; LIM; OSTERWALDER et al., 2006; ASHBY; TINWELL; PLAUTZ et al., 2001).

**Figura 2 – Estrutura química do filtro bemotrizinol.**



Fonte: Ashby et al., 2001.

A fim de melhorar os inconvenientes de muitos filtros solares, muitas pesquisas têm sido feitas no âmbito da nanotecnologia. Como por exemplo, micro e nanoemulsões, nanopartículas poliméricas, lipossomas ou nanopartículas lipídicas (nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados), com enfoque maior no último (MANAÍA; KAMINSKI; SOARES et al., 2012; GUTIÉRREZ-HERNÁNDEZ; ESCALANTE; MURILLO-VÁZQUEZ et al., 2015; BACCARIN; MITJANS; RAMOS et al., 2015; FRIZZO; FEUSER; BERRES et al., 2019; LV; CONG; LIU et al., 2018; ALVARÉZ-ROMÁN; BARRÉ; GUY et al., 2001; NIKOLIC; KECK; ANSELMINI et al., 2011;

OLIVEIRA; PERES; GRAZIOLA, 2015; VILLALOBOS-HERNÁNDEZ; MÜLLER-GOYMANN, 2006, PUGLIA; DAMIANI, OFFERTA, 2014).

## 2.4 Nanopartículas lipídicas

No início da década de 90 alguns grupos de pesquisa começaram a voltar às atenções para um nanossistema alternativo às nanopartículas poliméricas e aos lipossomas, a primeira geração de nanopartículas lipídicas denominadas hoje como nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009).

As NLS são dispersões aquosas de partículas formadas por lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal, e que são bem tolerados pelo organismo. São estabilizadas por um ou vários agentes tensoativos, apresentando tamanho dentro da escala manométrica (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; SILVA, 2013; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000).

Têm ampla aplicabilidade na tecnologia farmacêutica, cosmética e de alimentos devido a sua estabilidade química, estabilidade física e compatibilidade com grande número de ativos. A sua matriz lipídica sólida permite modular a liberação das substâncias encapsuladas, protegê-las contra degradações e melhorar a sua passagem através das barreiras fisiológicas, pois o aprisionamento dos compostos bioativos dentro da matriz lipídica solidificada impede a sua difusão para a fase externa, como nas emulsões, onde eles são propensos a reações oxidativas (DAUDT et al., 2013; JAIN; RAHI; PANDEY et al., 2017; SALMINEN; HELGASON; AULBACH et al., 2014).

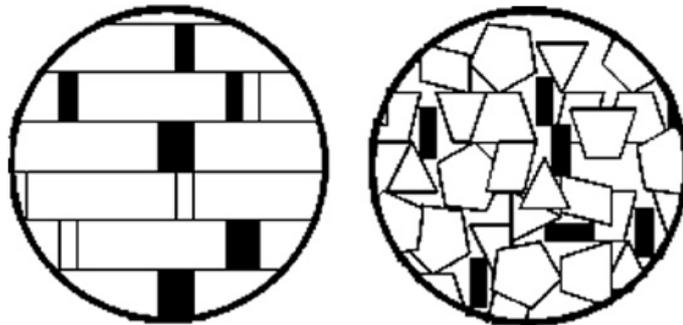
São usados triglicerídeos, misturas de glicerídeos ou ceras como matriz sólida para desenvolvimento das NLS. No entanto, a utilização de lipídios com alto grau de cristalinidade leva à formação de cristais perfeitos, limitando capacidade dessas nanopartículas de incorporar ativos, sendo mais predisponente a expulsão durante o armazenamento. Isso acontece porque o lipídio cristaliza em modificações lipídicas altamente energéticas,  $\alpha$  e  $\beta$ , imediatamente após a preparação dos NLS. No entanto, esses cristais podem sofrer modificações de baixa energia,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , em longo prazo, gerando uma matriz lipídica mais ordenada, não acomodando bem o ativo, levando à expulsão (DAN, 2016; DAS; NG; TAN, 2012).

A fim de superar as limitações apresentadas pelas NLS foram desenvolvidos os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), uma segunda geração de nanopartículas lipídicas. São nanopartículas que mantiveram as vantagens das NLS, mas sua matriz lipídica é

desorganizada, com cristais imperfeitos. O CLN é composto por uma mistura de lipídio sólido mais lipídio líquido, numa proporção de 70:30 até 99,9:0,1 promovendo, assim, uma melhor acomodação do ativo e aumentando a estabilidade durante o armazenamento. Os lipídios sólidos envolvidos na mistura devem apresentar ponto de fusão maior ou igual a 40 °C, obtendo-se uma matriz sólida a temperatura ambiente e corporal (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009, KHURANA; JAIN; BEDI, 2013).

A incorporação de lipídios líquidos causa imperfeições estruturais de lipídios sólidos, pois sua estrutura cristalina perfeita é desviada para a formação de uma rede cristalina com muitos espaços e estruturas amorfas (Figura 3). Estes espaços são os responsáveis por acomodar o ativo. Por isso, o lipídio líquido a ser utilizado determina o estado dos nanocarreadores, bem como a sua capacidade de carga e o padrão de liberação dependem da mistura de lipídios sólido e líquido (JAIN; RAHI; PANDEY et al., 2017; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002)

**Figura 3 – Matriz lipídica da NLS (esquerda) e do CLN (direita).**



Fonte: Pardeike; Hommoss; Müller, 2009.

Tanto as NLS quanto os CLN demonstram potencial para aplicação tópica devido a sua adesividade. Esta propriedade foi aumentada com os carreadores lipídicos nanoestruturados, eles aderem à superfície da pele formando um filme e proporcionando a oclusão. Este efeito oclusivo é desejado em formulações dermocosméticas, pois mantém a hidratação da pele impedindo a evaporação da água. A oclusão depende do tamanho das partículas e da quantidade de partículas existentes. Partículas maiores não conseguem ter um alto efeito, assim como uma quantidade pequena nos sistemas (MITRI; SHEGOKAR; GOHLA et al., 2011; JAIN; RAHI; PANDEY et al., 2017).

Os CLN são sistemas adequados para incorporação de agentes fotoprotetores, uma vez que são incorporados na matriz lipídica, tendo uma liberação controlada e prolongada do

ativo. Além disso, os lipídios sólidos utilizados na preparação desses carreadores atuam como filtros físicos, proporcionando um efeito sinérgico e, por isso, a quantidade necessária do ativo para efeito fotoprotetor diminuirá. Outra razão para serem uma boa escolha quanto a fotoproteção, é que devido a boa adesividade, o produto passará mais tempo na pele, não sendo perdido na transpiração ou na água (SALA; DIAB; ELAISSARI et al., 2018; JAIN; RAHI; PANDEY et al., 2017; NIKOLIC; KECK; ANSELMINI et al., 2011).

Villalobos-Hernández e Müller-Goymann (2006) obtiveram aumento no fator de proteção solar (FPS) ao incorporar  $\text{TiO}_2$  à NLS. Do mesmo modo, Puglia et al. (2014) e Nikolic et al. (2011) desenvolveram CLN contendo mistura de filtros solares orgânicos e obtiveram FPS maiores do que o encontrado em protetores solares convencionais, relacionando tal fato ao sinergismo existente entre o lipídio sólido utilizado no desenvolvimento desses nanocarreadores e o filtro solar.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar nanocarreadores lipídicos contendo o filtro solar orgânico bemotrizinol (Tinosorb<sup>®</sup> S).

#### 3.2 Objetivos Específicos

Este estudo buscou atender aos seguintes objetivos específicos:

- a) realizar estudos preliminares para determinação dos parâmetros fixos na obtenção do sistema;
- b) realizar planejamento experimental do tipo Box-Behnken 3<sup>3</sup> para otimização dos nanossistemas;
- c) caracterizar os nanocarreadores obtidos quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta;
- d) realizar análises térmicas e espectroscopia na região de infravermelho a fim de avaliar possíveis interações entre os componentes, bem como estabilidade dos sistemas frente às condições de elevadas temperaturas;
- e) realizar análise de difração de raios-X para avaliar características quanto à cristalinidade dos sistemas;
- f) avaliar a morfologia das partículas via microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- g) avaliar o potencial fotoprotetor dos nanossistemas *in vitro* de modos qualitativo e quantitativo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

Cera de Carnaúba (All Chemistry, São Paulo, Brasil)

Bemotrizinol (Tinosorb<sup>®</sup> S) (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha)

Polissorbato 80 (All Chemistry, São Paulo, Brasil)

Triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (All Chemistry, São Paulo, Brasil)

Span<sup>®</sup> 80 (Sorbitane monooleate, Sigma-Aldrich, Alemanha)

Água destilada (Destilador de água Pilsen, modelo SP5L, Presidente Prudente, Brasil)

### 4.2 Métodos

Os métodos utilizados para desenvolvimentos dos carreadores lipídicos nanoestruturados, incorporação do filtro solar e posterior caracterização são descritos abaixo.

#### 4.2.1 Estudos preliminares para obtenção dos CLN

##### 4.2.1.1 Determinação da concentração de fase lipídica e razão de lipídios (sólido:líquido)

Foram desenvolvidas três formulações com concentrações de fases lipídicas distintas (5, 10 e 20 %). Após o preparo, os sistemas foram submetidos à centrifugação durante 10 min com velocidade de 5.000 rpm (rotações por minuto) a fim de escolher a concentração que permitiria um CLN macroscopicamente estável.

Escolhida a formulação, foram desenvolvidos mais três sistemas, dessa vez, variando a razão de lipídios sólido:líquido (30:70, 50:50, 80:20). Foi avaliado, então, o tamanho e o índice de polidispersão (IPD) das partículas. O sistema que apresentou tamanho dentro da faixa desejada e menor IPD foi o escolhido para seguir com as etapas seguintes.

##### 4.2.1.2 Planejamento experimental do tipo Box-Behnken 3<sup>3</sup> para desenvolvimento do CLN contendo BEMT

O planejamento de experimentos foi desenvolvido a princípio com o objetivo de obter o máximo de informações eficientes de um conjunto de dados com o mínimo de simulações

possível, principalmente em casos de processos químicos com múltiplas reações e múltiplos reagentes (PEREIRA, 2002; LI et al., 2017).

Com base nisso, foram escolhidos três principais fatores, como variáveis independentes: concentração de filtro solar (X1), concentração de tensoativo (X2) e tempo de homogeneização em sonicador (X3), para avaliar a interação e os efeitos deles nas formulações, como descrito na tabela 2. O tamanho de partícula foi a variável dependente (Y), escolhida como resposta. Então, o planejamento Box-Behnken com 3 fatores e 3 níveis foi usado para otimizar o desenvolvimento do sistema, e um total de 16 corridas experimentais foram geradas utilizando o software Statistica 10 (StatSoft).

**Tabela 2– Fatores e níveis para realização do planejamento Box-Behnken 3<sup>3</sup>.**

Fatores	Faixas e Níveis		
	-1	0	1
<b>X1</b>	0,3	0,4	0,5
<b>X2</b>	2	3	4
<b>X3</b>	3	5	7

Fonte: autor.

#### **4.2.2 Estabilidade frente à centrifugação**

Após definição dos parâmetros para obtenção dos nanocarreadores, o sistema branco e contendo BEMT foram submetidos à centrifugação em microcentrífuga modelo NI1801 (Nova Instruments, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 5000 rpm por dez minutos, no intervalo de 1, 7, 15, 30 e 60 dias após preparação.

#### **4.2.3 Obtenção dos CLN**

Finalizada a primeira etapa do desenvolvimento, foram determinados os parâmetros ideais para obtenção dos CLN, estabelecendo um protocolo de desenvolvimento.

Os lipídios foram aquecidos a uma temperatura maior do que ponto de fusão do lipídio sólido (aproximadamente 80 °C). Os tensoativos e o filtro solar também foram aquecidos na fase lipídica. A porção aquosa, contendo apenas águas destilada, foi aquecida à mesma temperatura.

Posteriormente, a fase aquosa foi vertida na lipídica e levada à agitação mecânica em desruptor de células ultrassônico (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) por dois ciclos de sete minutos cada um, para fragmentação das partículas a potência de 200 W. Posteriormente, os frascos foram levados a resfriamento em banho de gelo para solidificação dos nanocarreadores.

#### **4.2.4 Caracterização dos CLN**

##### **4.2.4.1 Análise do tamanho das partículas e índice de polidispersão (IPD)**

As análises dos tamanhos das partículas e dos IPD foram realizadas utilizando a técnica do espalhamento de luz do raio hidrodinâmico ou dynamic light scattering (DLS) das partículas em suspensão utilizando o equipamento Zetasizer Nano (Malvern Montgomeryville, USA). As amostras foram diluídas em água destilada na proporção de 1:100 (v/v) e as leituras realizadas 1, 7, 15 e 30 dias após desenvolvimento dos sistemas.

##### **4.2.4.2 Determinação do potencial Zeta**

O potencial Zeta das partículas foi determinado pela medição da mobilidade eletroforética das partículas em suspensão utilizando o equipamento Zetasizer Nano (Malvern, Montgomeryville, USA). As análises foram repetidas três vezes a 25 °C com força de campo de 20 V/cm. As amostras foram diluídas em água destilada na proporção de 1:100 (v/v) e as leituras realizadas 1, 7, 15 e 30 dias após desenvolvimento dos sistemas.

##### **4.2.4.3 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A técnica utilizada para análise da morfologia das nanopartículas foi microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) em equipamento JEOL JSM-7500F (JEOL, Boston, USA).

As amostras foram diluídas na proporção 1:30 (v/v) em água destilada. Posteriormente, uma gota do material foi disposta sobre suporte metálico e seco em temperatura ambiente por três dias em dessecador. O suporte foi então revestido com material condutor e as fotomicrografias foram obtidas com um aumento de 50000x.

#### 4.2.4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises DSC dos componentes das formulações, dos sistemas liofilizados e das misturas binárias (1:1) do BEMT com os outros componentes foram realizadas pesando-se 4 mg de cada amostra e selando-as em cadinhos herméticos de alumínio, sendo submetidas a condições de temperatura entre 20 e 300 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min em fluxo de nitrogênio de 50 mL/min. Foi utilizado o módulo calorimétrico modelo Q20 (TA Instruments, New Castle, Delaware, EUA).

#### 4.2.4.5 Análise termogravimétrica (TG)

As curvas TG dos componentes das formulações e dos sistemas liofilizados foram obtidas utilizando o analisador térmico simultâneo TG modelo SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, Delaware, EUA), sob fluxo de nitrogênio (100 mL/min), razão de aquecimento de 10 °C/min, faixa de temperatura entre 25 – 900 °C, utilizando 4 mg de amostra previamente pesadas em cadinho de alumina.

#### 4.2.4.6 Difração de raios X (DRX)

As informações sobre a cristalografia ou amorfização da cera de carnaúba (CC), BEMT e dos carreadores lipídicos nanoestruturados brancos (CLNB) e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo filtro solar (CLNF) liofilizados foram determinadas através da análise de espectroscopia por difração de raios X (DRX).

Os dados foram obtidos utilizando difratômetro modelo XRD 7000 (Shimadzu, Kyoto, Japão), com varredura de raios X em ângulo aberto de  $2\theta$  entre 5 e 60°, sistema  $\theta$ - $\theta$ , utilizando-se radiação de Cu ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), no passo de 0,02° ( $\theta$ ) e intervalo de 1,0 s para cada amostra.

#### 4.2.4.7 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os picos característicos do filtro fornecem a informação de qualquer possível interação entre ele e os excipientes da formulação das nanopartículas. Foram realizadas análises do BEMT e todos os outros componentes separadamente, bem como dos CLNB e CLNF.

Foi realizada análise por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR) na faixa de 4000 cm<sup>-1</sup> a 600 cm<sup>-1</sup>, utilizando o equipamento Spectrum 400 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA).

#### 4.2.4.8 Avaliação do potencial fotoprotetor *in vitro*

Utilizando espectrofotômetro UV-VIS-NIR Lambda 750 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA), foram obtidos espectros de absorvância do CLNF e uma solução de BEMT em álcool isopropílico de iguais concentrações, nos comprimentos de onda de 290 a 400 nm. Tanto o CLNF quanto a solução de BEMT foram diluídos em água destilada na proporção de 1:500 (v/v).

#### 4.2.4.9 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro*

A determinação do FPS *in vitro* foi realizada seguindo o método de Mansur e colaboradores (1986), utilizando o espectrofotômetro UV-VIS 12-40 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Foram avaliados os CLNF, CLNB, solução de BEMT em álcool isopropílico na mesma concentração do nanossistema carregado com filtro e um protetor solar comercial de FPS conhecido.

As formulações foram diluídas em álcool isopropílico até a concentração final de 0,2 mg/mL. As absorvâncias foram determinadas na faixa de 290 a 320 nm com intervalos de 5 nm, sendo realizadas em triplicata para cada comprimento de onda e o valor do FPS foi determinado através da Equação 1:

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

Em que: FPS corresponde ao fator de proteção solar; FC é o fator de correção, que é 10, determinado de acordo com dois filtros solares de FPS conhecidos de tal forma que um creme contendo 8% de homossalato resultasse no FPS 4; EE é o efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda ( $\lambda$ ); I é a intensidade da luz solar no comprimento de onda ( $\lambda$ ); Abs ( $\lambda$ ) corresponde à absorvância da solução da formulação contendo filtro solar no comprimento de onda ( $\lambda$ ). Os valores de EE ( $\lambda$ ) e I ( $\lambda$ ) (Tabela 3) foram previamente calculados por Sayre et al. (1979).

**Tabela 3 – Relação efeito eritemogênico (EE) e intensidade de radiação (I) para cada comprimento de onda.**

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

Fonte: Mansur et al. (1986).

O cálculo para obtenção do valor corrigido do FPS com base no protetor solar comercial (PC), foi realizado seguindo a Equação 2:

$$FPS_{\text{corrigido}} = \frac{FPS_{\text{espectrofotométrico}} \times FPS_{\text{rotulado}}}{FPS_{\text{pc}}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo,  $FPS_{\text{espectrofotométrico}}$  o valor obtido para cada formulação pelo método de Mansur et al. (1986);  $FPS_{\text{rotulado}}$  o valor expresso no rótulo do fotoprotetor comercial;  $FPS_{\text{pc}}$  o valor obtido do protetor solar comercial no método.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudos preliminares para obtenção do CLN

Um estudo prévio foi realizado a fim de determinar parâmetros ideais para desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados e otimizar o tempo desse desenvolvimento.

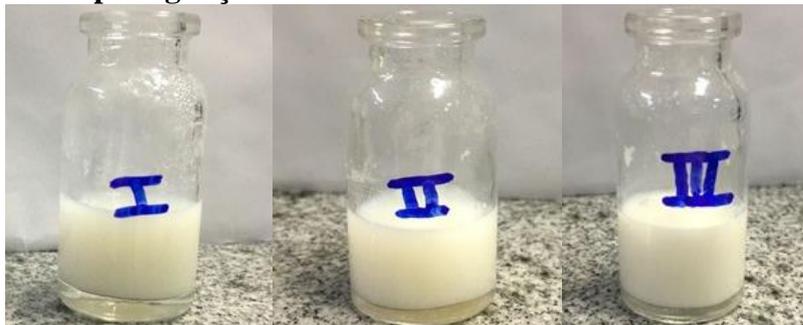
#### 5.1.1 Determinação da concentração de fase lipídica e razão de lipídios (sólido:líquido)

O primeiro passo do estudo foi determinar a concentração de fase lipídica que resultaria em um sistema macroscopicamente estável após agitação e centrifugação. Para esta etapa, fixou-se razão de lipídios 50:50 (sólido:líquido), a concentração de tensoativos a 3% e os parâmetros para agitação: dois ciclos de cinco minutos com potência a 200 W. Nesta etapa não houve adição do filtro solar.

Os sistemas I (5% de lipídios), II (10% de lipídios) e III (20% de lipídios) mostraram-se homogêneos após desenvolvimento, não havendo separação de fases em nenhum deles após agitação. Na figura 4 têm-se os sistemas prontos após agitação e banho de gelo.

Para confirmar a integridade das formulações, sua estabilidade frente à centrifugação foi avaliada a 5000 rpm por 10 minutos.

**Figura 4 – Sistemas após agitação.**



Fonte: autor.

Quando submetidos à centrifugação na segunda etapa do estudo, os sistemas obtiveram comportamentos distintos. O sistema I foi o único que não apresentou separação de fases. O que mostra que a concentração de tensoativo foi suficiente para estabilizar a formulação quando em 5% de lipídios. Isso sugere que as partículas não se agregaram e,

mesmo após o estresse da centrifugação, o sistema se manteve homogêneo. Sendo, então, a concentração lipídica de 5% escolhida para dar seguimento ao desenvolvimento dos CLN.

Os sistemas II e III apresentaram uma separação de fases (Figura 5), onde um excesso de lipídio pode ser observado na parte superior do tubo. Isso aconteceu porque a concentração de tensoativo utilizada não foi suficiente para estabilizar o sistema e mantê-lo homogêneo, devido ao alto teor lipídico. Então, a diminuição da tensão interfacial na superfície das fases provocou agregação e precipitação das partículas, um fenômeno denominado cremação (LACHMAN et al., 2001; LACERDA, 2009).

**Figura 5 – Sistemas após centrifugação.**



Fonte: autor.

Na segunda etapa do estudo preliminar foram definidas as proporções de lipídios a serem utilizadas como parâmetro fixo.

Três proporções de lipídios sólidos e líquidos foram testadas e três sistemas preparados. A concentração total de lipídios a 5% foi mantida fixa e os demais parâmetros também, variando apenas a proporção. O sistema A tinha a proporção 50:50 (sólido:líquido), sistema B tinha a proporção 70:30 e o sistema C a proporção 80:20.

Não houve separação de fases, como já era esperado, e dessa vez foi determinada a razão de lipídios ideal para o tamanho das partículas menor que 200 nm e índice de polidispersão até 0,3.

O sistema A teve o tamanho de partículas maior (349,5 nm) e mais heterogêneo, evidenciado por um valor de IPD acima de 0,4.

O sistema B apresentou um tamanho de partícula menor (273,9), próximo à faixa de tamanho desejada, porém com IPD semelhante ao sistema A, indicando tamanho de partículas mais heterogêneo que o sistema C. O sistema C obteve tamanho dentro da faixa desejada para obtenção dos CLN (166,4 nm) e índice de polidispersão entre 0,2 e 0,3 sugerindo a formação

de partículas com tamanho mais homogêneo que os dois anteriores (Tabela 4). Assim, foi definida a razão de lipídios fixada para as próximas etapas.

Estes resultados corroboram com Pardeike, Hommoss e Müller (2009), quando afirmaram que as proporções ideais para obtenção de CLN variam de 70:30 até uma proporção de 99,9: 0,1.

**Tabela 4– Tamanho médio das partículas e IPD dos sistemas A, B e C  $\pm$  desvio padrão.**

SISTEMA	TAMANHO (nm)	IPD
A	351,5 $\pm$ 1,8	0,42 $\pm$ 0,01
B	277,1 $\pm$ 3,5	0,37 $\pm$ 0,02
C	166,4 $\pm$ 2,1	0,26 $\pm$ 0,00

Fonte: autor.

### 5.1.2 Planejamento experimental do tipo Box-Behnken para incorporação do BEMT

Na etapa anterior, foram determinados os parâmetros fixos para seguir com o desenvolvimento dos CLN, com o objetivo de obter um sistema branco que estivesse dentro dos padrões desejáveis, que foram tamanhos de partícula inferior a 200 nm e IPD inferior a 0,3.

Para a incorporação do ativo cosmético, o filtro solar orgânico BEMT, foi realizado um planejamento experimental do tipo Box-Behnken com três variáveis independentes e três níveis para cada variável: baixo, médio e alto.

A variável dependente escolhida como resposta foi o tamanho das partículas obtido para cada um dos sistemas. Foram preparadas dezesseis formulações em ordem aleatória, sendo três delas repetições do ponto central. Os resultados são mostrados na tabela 5.

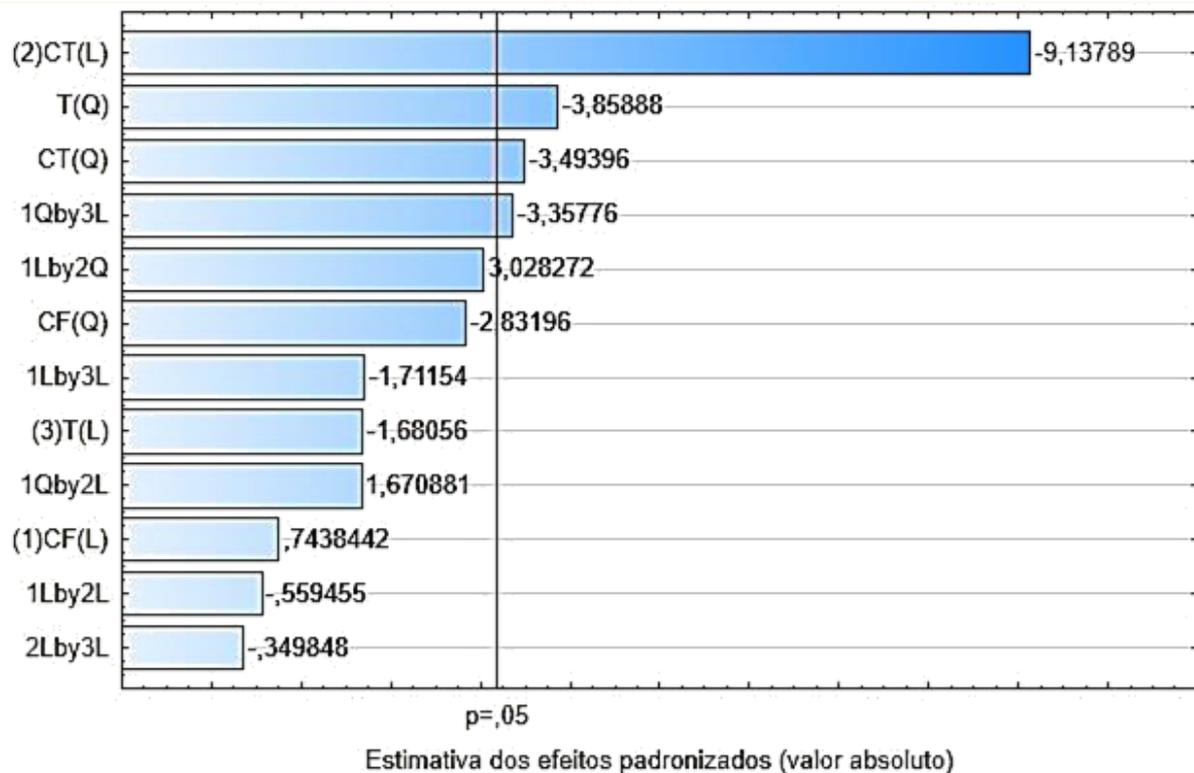
**Tabela 5 – Matriz de planejamento Box-Behnken e a resposta tamanho.**

<b>Formulação</b>	<b>X1 CF (%)</b>	<b>X2 CT (%)</b>	<b>X3 T (min)</b>	<b>Resposta Tamanho (nm)</b>
<b>1</b>	0,3	2	5	429,90
<b>2</b>	0,5	2	5	419,50
<b>3</b>	0,3	4	5	196,50
<b>4</b>	0,5	4	5	149,00
<b>5</b>	0,3	3	3	214,40
<b>6</b>	0,5	3	3	384,20
<b>7</b>	0,3	3	7	282,10
<b>8</b>	0,5	3	7	338,40
<b>9</b>	0,4	2	3	470,00
<b>10</b>	0,4	4	3	308,00
<b>11</b>	0,4	2	7	335,10
<b>12</b>	0,4	4	7	149,90
<b>13</b>	0,4	3	5	170,40
<b>14</b>	0,4	3	5	204,10
<b>15</b>	0,4	3	5	164,70
<b>16</b>	0,4	3	5	236,20

Fonte: autor.

Foi gerado o gráfico de Pareto (Figura 6), das superfícies de resposta e a análise de variância (ANOVA) para avaliar quais variáveis ou interações significativas que de fato influenciaram na resposta tamanho de partículas.

**Figura 6 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados.**



Fonte: autor.

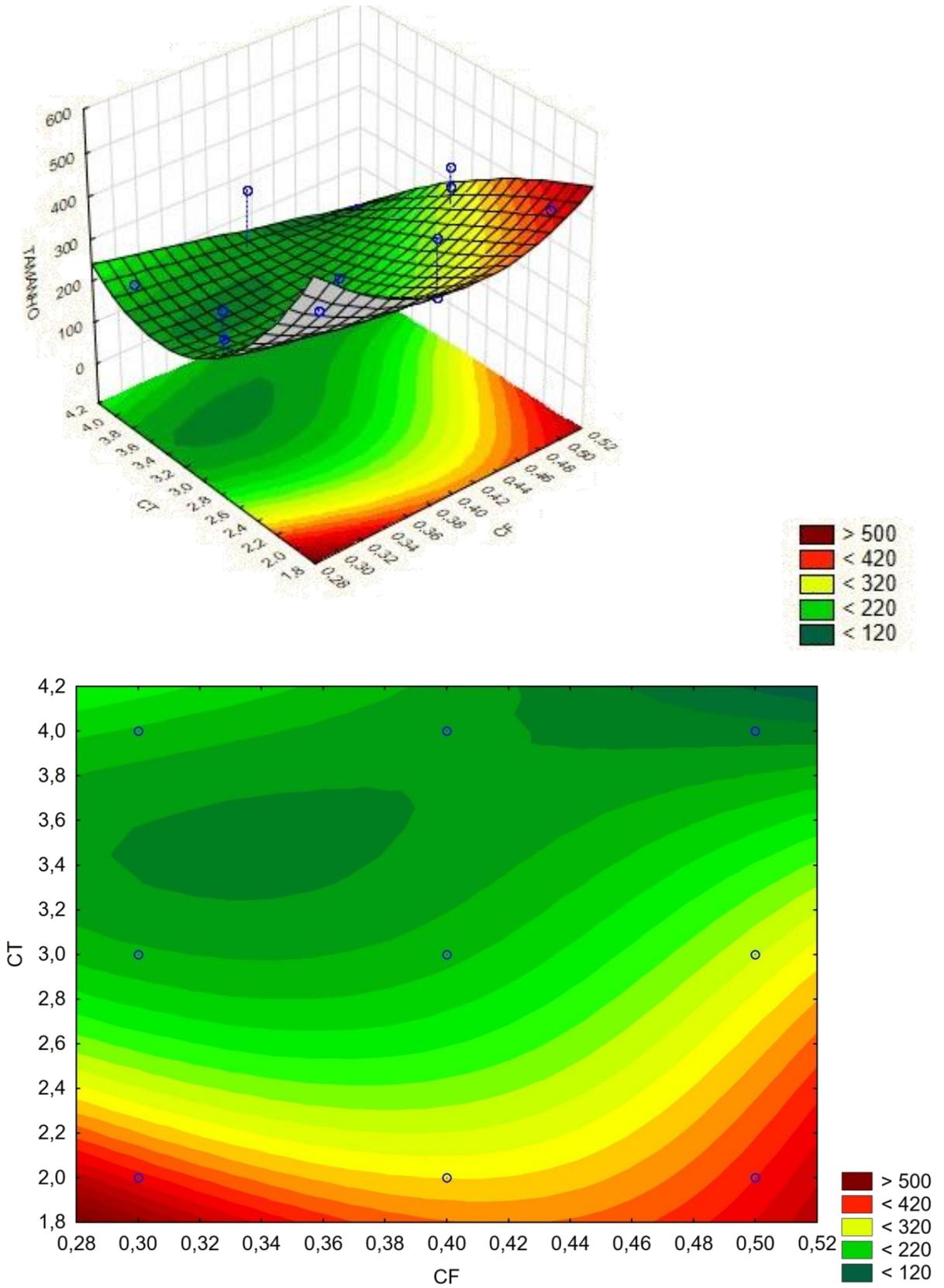
O gráfico de Pareto ordena a frequência das ocorrências da menor para maior, permitindo a priorização dos problemas. Ou seja, o gráfico de Pareto sugere qual a variável significativa dentro das condições avaliadas.

Neste trabalho, a concentração de tensoativos (CT) foi a variável mais significativa ( $p < 0,05$ ), corroborando com o exposto por Pardeike et al. (2011) que afirma que uma concentração mais alta de tensoativos é responsável pela produção de partículas de tamanhos menores. Isso pode ser explicado pelo impedimento estérico criado na superfície das partículas pelo tensoativo, que impediu a coalescência e agregação das partículas menores em maiores, aumentando assim a estabilidade dos carreadores de menor tamanho (RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2010; THAPA; AHAD; AQIL et al., 2018).

Modelos de superfície de resposta podem ser aplicados para definir condições ótimas de trabalho ou a sensibilidade da variável resposta a mudanças dos níveis das variáveis independentes de interesse (PEREIRA, 2002).

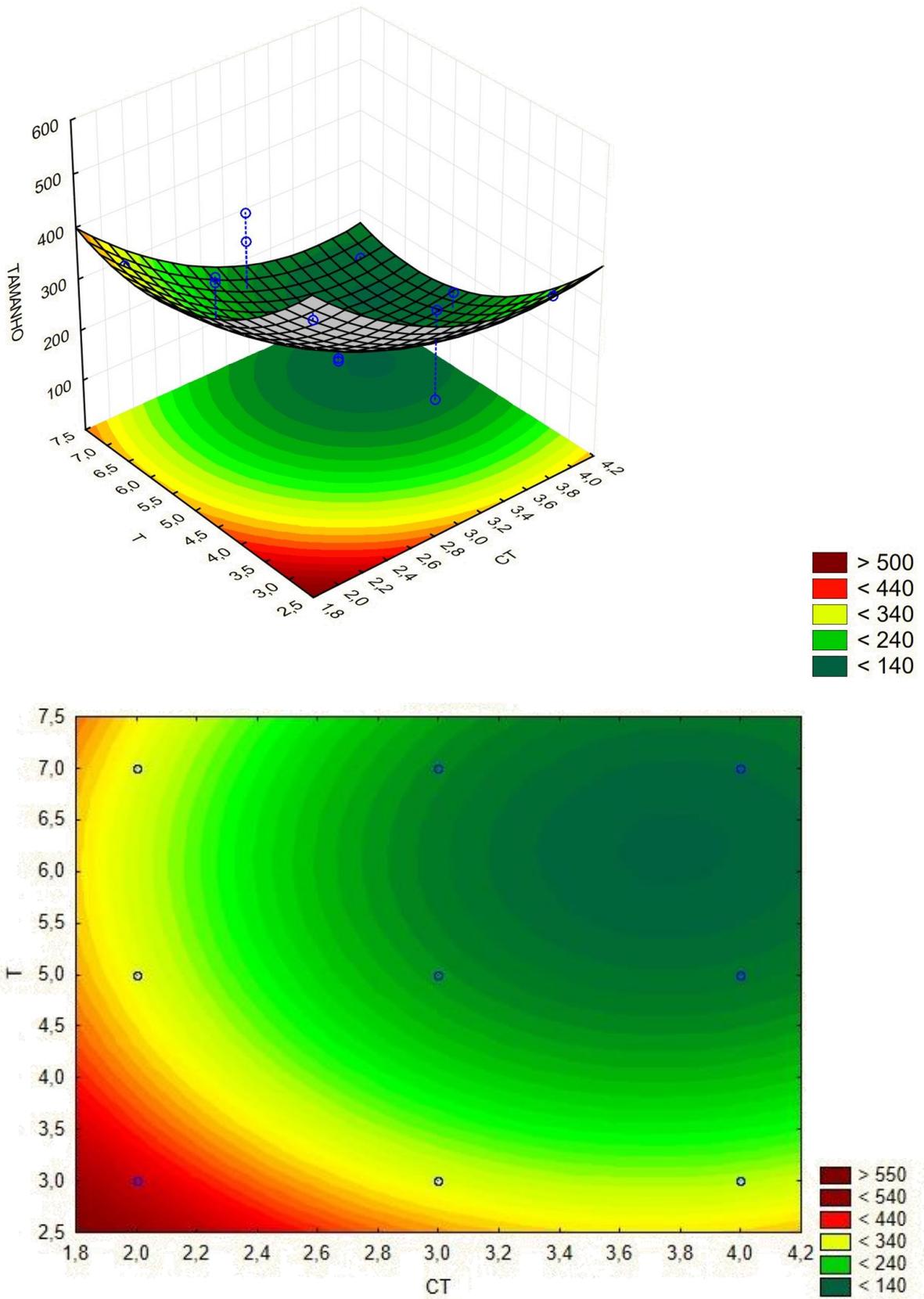
As figuras 7, 8 e 9 mostram os gráficos da superfície de resposta e como a variável dependente (tamanho) reage à mudança dos níveis de cada variável independente.

Figura 7 – Superfície de resposta da interação entre CT e CF. Gráfico 3D e contorno.



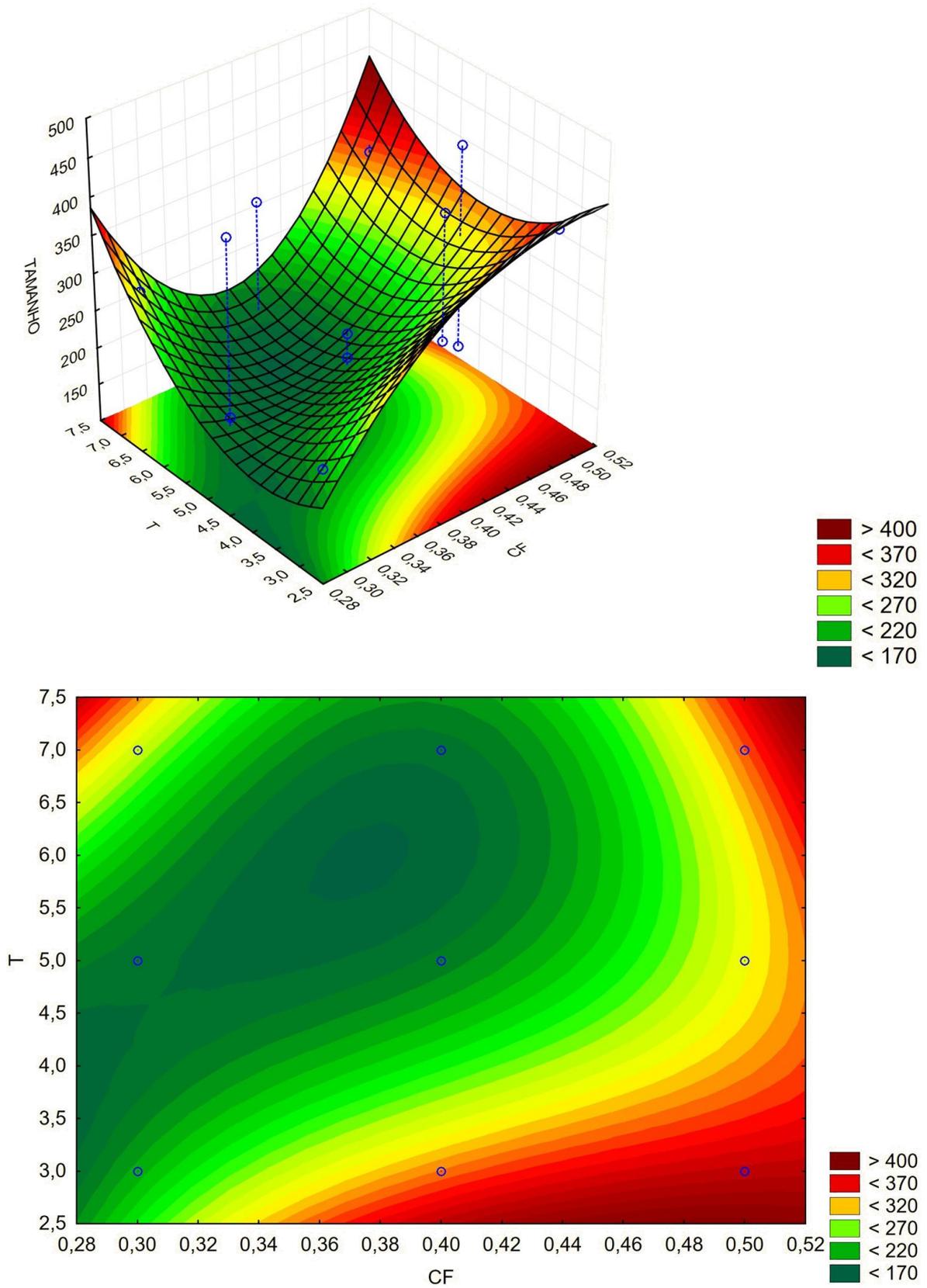
Fonte: autor.

Figura 8 - Superfície de resposta da interação entre T e CT. Gráfico 3D e contorno.



Fonte: autor.

**Figura 9 – Superfície de resposta da interação entre T e CF. Gráfico 3D e contorno.**



Fonte: autor.

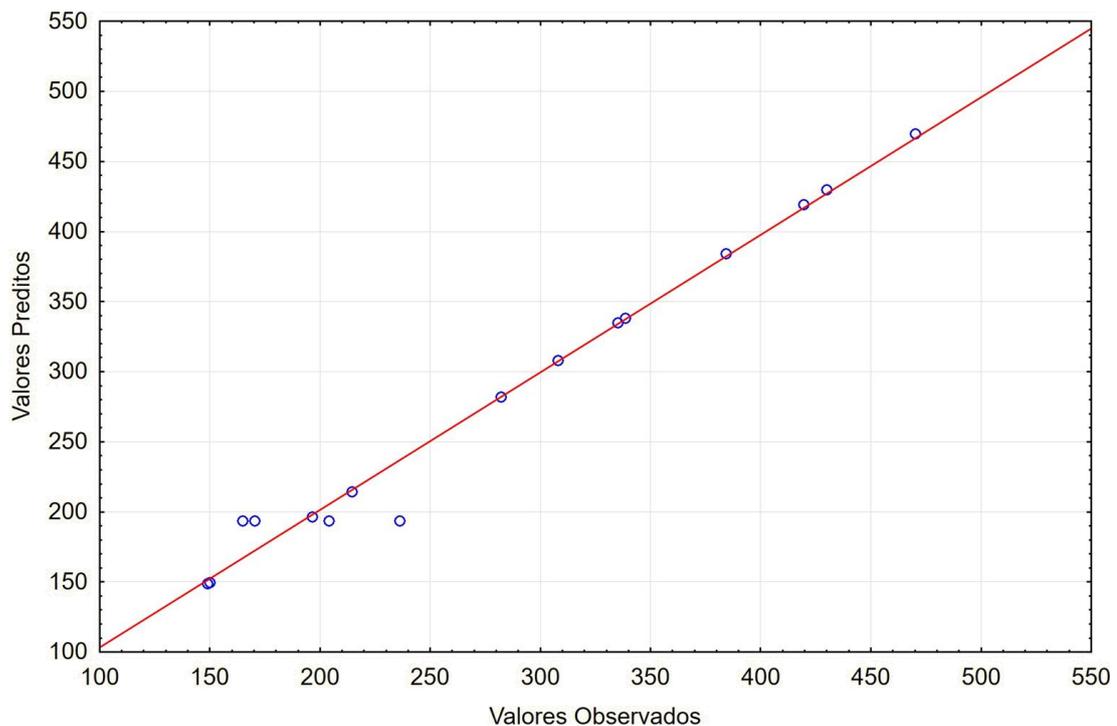
Foi possível observar que, à medida que a concentração de tensoativo diminuiu, maior foi o tamanho das partículas. A inclinação dos gráficos nas figuras 7 e 8 mostram que a variável CT mantém seu valor inalterado, ou seja, o tamanho de partículas será menor em concentrações maiores de tensoativo sem sofrer influência do tempo de agitação ou da concentração de BEMT. O que indica que a interação entre CT e CF e CT e T não é significativa, corroborando com o apresentado no gráfico de Pareto.

Na figura 8, observou-se que tanto a variável CT quanto a variável T são significativas. A região onde serão obtidas partículas com tamanho menor é onde a concentração de tensoativo foi maior, e o tempo de agitação também, diferindo do que foi observado anteriormente, pois, nesse caso a interação não é significativa, apenas as variáveis independentes.

Como mostrado nos dados anteriores, a variável CF não foi significativa. Porém, o gráfico apresentado na figura 9 sugere que a interação entre as variáveis T e CF é significativa ( $p < 0,05$ ), concordando também com o exposto no gráfico de Pareto. A concentração de filtro solar exerce influência sobre o tempo de agitação, o nível médio da variável T foi o mais satisfatório, enquanto que na figura 8 em tempo mais elevado obteve-se partículas menores.

Na figura 10 tem-se os valores preditos x valores observados.

**Figura 10 – Valores preditos x valores observados.**



Fonte: autor.

A linha vermelha representa a equação do modelo matemático e os pontos azuis são os valores obtidos como resposta do planejamento. Quanto mais próximo à reta estiver da resposta, mais aceitável será o modelo.

Pode-se observar na figura 9 que das dezesseis formulações apenas quatro respostas apresentaram pontos fora da reta, o que sugere que o modelo foi satisfatório.

A Tabela 6 apresenta os dados obtidos na análise de variância. Os valores de  $p$ , soma dos quadrados dos desvios, a média quadrática dos desvios, o valor do F calculado, os graus de liberdade dos fatores (linear e quadrático), do erro puro e da falta de ajuste.

**Tabela 6 – Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático para a resposta tamanho.**

<b>FATOR</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b><math>p</math></b>
<b>CF (L)</b>	3536,6	1	3536,4	3,21666	0,1701788
<b>CF (Q)</b>	8817,2	1	8817,21	8,02000	0,066083
<b>CT (L)</b>	90546,4	1	90546,4	82,35958	0,002826
<b>CT (Q)</b>	13421,2	1	13421,22	12,20773	0,039653
<b>T (L)</b>	9186,9	1	9186,9	8,35626	0,062976
<b>T (Q)</b>	16371,2	1	16371,2	14,89099	0,030756
<b>Falta de Ajuste</b>	29245,8	6	4874,31	4,43359	0,124607
<b>Erro Puro</b>	3298,2	3	1099,4		
<b>Total</b>	174423,4	15			

Fonte: autor.

Se o modelo estiver bem ajustado, a falta de ajuste terá a mesma intensidade dos erros aleatórios. Ou seja, para um modelo aceitável, a falta de ajuste não será significativa ( $p > 0,05$ ).

Finalmente, após avaliar todos os dados gerados pelo planejamento experimental, foi escolhido o sistema para dar seguimento às próximas etapas do trabalho. Os sistemas 4 e 12 apresentaram tamanho de partícula menor que os demais, 149 e 149,9 nm, respectivamente. Porém, quando avaliado o índice de polidispersão, o sistema 12 mostrou tamanho de partículas mais homogêneo, sendo então, o sistema selecionado.

Concluído o estudo de pré-formulação foram fixados as concentrações e parâmetros ideais para o desenvolvimento desses CLN. Concentração de fase lipídica 5%, proporção de lipídios 80:20, tempo de agitação dois ciclos de 7,0 min cada, com potência a 40%, concentração de BEMT 0,4% e 4% de polissorbato 80.

## **5.2 Estabilidade frente à centrifugação**

Quando avaliados no primeiro e sétimo dia, os sistemas CLNB e CLNF se mostraram homogêneos, mantendo a estabilidade. Porém, quando avaliados no décimo quinto dia houve separação de fases em ambos os sistemas, mostrando instabilidade após duas semanas.

A fim de eliminar tal inconveniente, foi calculado o EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico) da formulação e adicionado um segundo tensoativo aos nanocarreadores, o Span<sup>®</sup> 80 (monooleato de sorbitano), um tensoativo também não iônico, ideal para o preparo de formulações cosméticas (SILVA; SILVA; PIATNICKI et al., 2015). Manteve-se a concentração total de tensoativos em 4%, na proporção 80:20 de polissorbato 80 e Span<sup>®</sup> 80, respectivamente.

As novas formulações foram submetidas à centrifugação nos dias 1, 7, 15, 30 e 60 após o preparo e permaneceram homogêneas, concluindo-se que a adição do Span<sup>®</sup> 80 contribuiu com a estabilidade dos sistemas.

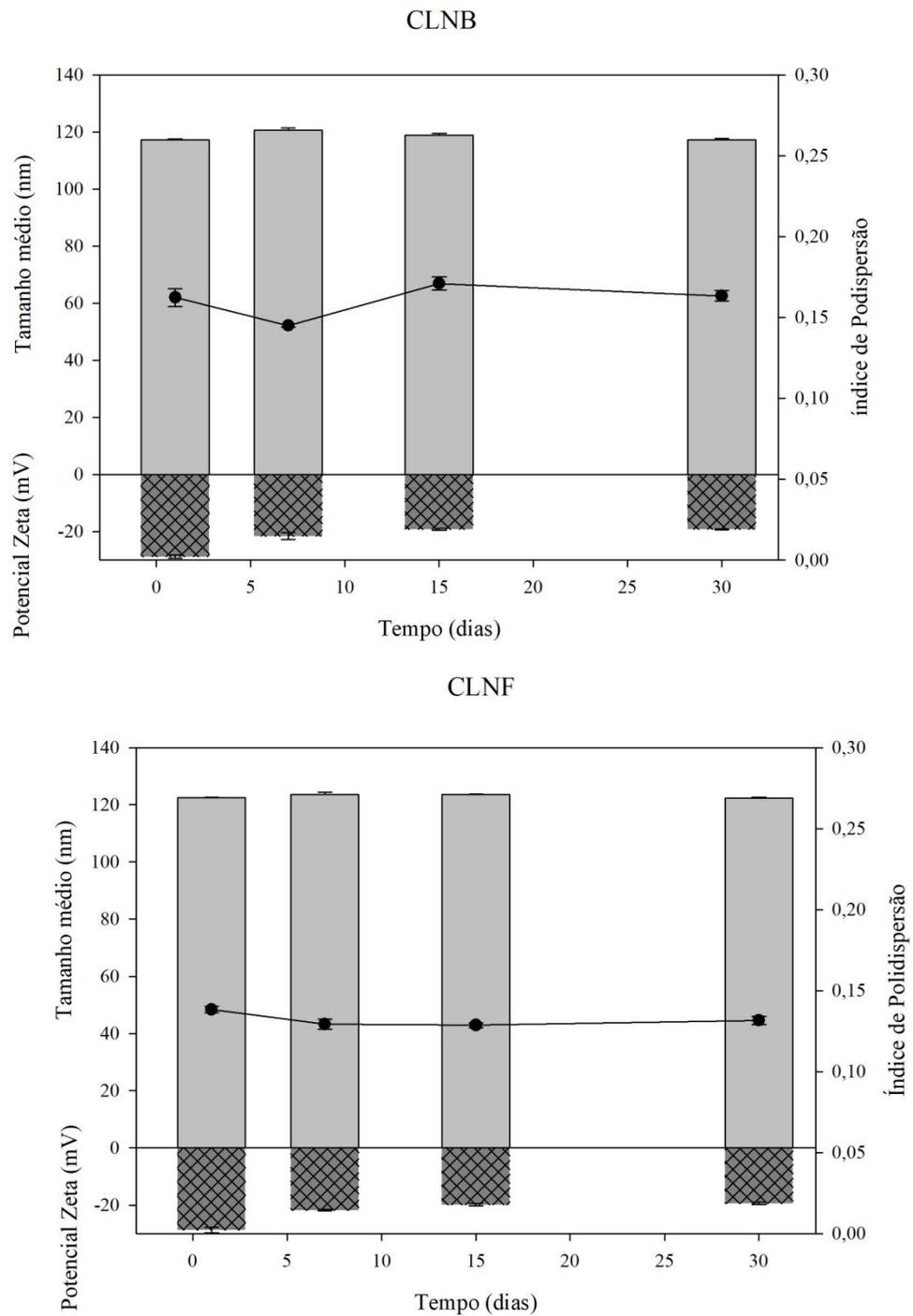
## **5.3 Caracterização dos CLN**

A etapa posterior ao desenvolvimento dos nanocarreadores foi a caracterização físico-química desses sistemas.

### **5.3.1 Análise do tamanho das partículas, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta**

De acordo com as respostas obtidas no planejamento experimental, a formulação NLC12 foi escolhida para incorporação do filtro solar e avaliação da estabilidade durante o armazenamento, com determinação do tamanho médio das partículas, IPD e potencial zeta. Os resultados de tais análises para CLNB e CLNF são expostos na figura 11.

**Figura 11 – Tamanho médio, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta das partículas e desvio padrão (n=3).**



Fonte: autor.

A composição da matriz lipídica tem grande influência no tamanho das partículas. Mitri et al. (2011) relata que, quando a cera de carnaúba foi usada sozinha (NLS) os sistemas apresentaram tamanhos de partículas maiores, porém em associação com um lipídio líquido

(CLN) resultou em partículas menores. Isso se dá devido à redução da viscosidade das gotículas fundidas que facilita a dispersão.

Sendo assim, ao utilizar cera de carnaúba (CC) e triglicerídeo do ácido cáprico e caprílico (TACC) foram obtidas partículas com tamanho inferior a 200 nm. Os resultados revelaram que o tamanho dos CLNB e CLNF após 24 horas foram  $117,2 \pm 0,2$  nm e  $122,4 \pm 0,2$  nm e após 30 dias  $117,3 \pm 0,4$  nm e  $122,4 \pm 0,3$  nm, respectivamente, durante os dias 7 e 15 não foram observadas diferenças estatísticas nos valores, indicando que não houve agregação das partículas. CLN apresentam carreadores com tamanhos compreendidos entre 40 e 800 nm (CZAJKOWSKA-KOSNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2018), assim, estes resultados estão em conformidade com os encontrados na literatura (GABA; FAZIL; KHAN et al., 2015; PUGLIA; DAMIANI; OFFERTA et al., 2014; SATO; OSHIRO-JUNIOR; MACHADO et al., 2017; ADITYA; MACEDO; DOKTOROVOVA et al., 2014).

Como a finalidade do nanocarreador desenvolvido é para futuro protetor solar, o ativo deve ter o máximo de retenção na camada externa da pele, ou seja, não deve permear o extrato córneo. Segundo Jain e colaboradores (2017), a aplicação tópica de CLN forma um filme na pele devido as suas propriedades de oclusão e adesão, promovendo manutenção da hidratação e maior tempo de permanência na pele.

Tais propriedades estão relacionadas com o tamanho de partículas. Wissing et al. (2001) revelou que partículas inferiores a 400 nm apresentam melhor propriedade de adesão quando comparadas a partículas maiores. Sendo assim, o tamanho das partículas obtido, mostra-se promissor para formulações com alto fator de oclusão. Além disso, considerando apenas o tamanho de partícula, o resultado obtido sugere que os CLN não conseguem ultrapassar essas camadas, já que a largura dos espaços intercelulares apresenta entre 19 e 75 nm na pele íntegra e saudável (SALA; DIAB; ELAISSARI et al., 2018).

O tamanho das partículas se manteve estável no decorrer dos trinta dias de análise, tendo uma variação muito pequena e insignificante, o que sugere estabilidade físico-química do CLN desenvolvido.

Os valores do IPD ao fim do estudo foram  $0,16 \pm 0,003$  e  $0,13 \pm 0,002$  para CLNB e CLNF, respectivamente. Valores de IPD menores que 0,2 indicam uma distribuição do tamanho de partículas estreita e uniforme, ou seja, a maioria das partículas está na mesma faixa de tamanho e a técnica utilizada foi eficiente para produção de partículas de tamanho homogêneo (JUNYAPRASERT; TEERANACHAIDEEKUL; SOUTO et al., 2009; KOVACEVIC; SAVIC; MÜLLER et al., 2011). Não houve variação dos valores nos dias

avaliados, sugerindo mínima predisposição para agregação e confirmando a estabilidade física dos CLN.

A carga superficial das partículas é um dos fatores que determina a estabilidade física dos sistemas. Potenciais zeta com valores próximos a zero, configuram ausência de carga superficial, o que pode levar à agregação das partículas. Em contrapartida, valores muito altos de carga, acima de 50, podem fazer com que as partículas se choquem constantemente, promovendo agregação (MITRI; SHEGOKAR; GOHLA et al., 2011).

Ao longo dos 30 dias de armazenamento dos sistemas, a carga das partículas variou (Figura 11), havendo uma queda no valor da carga, mantendo-se em  $-19,2 \pm 0,17$  mV e  $-19,3 \pm 0,42$  mV para o CLNB e CLNF, respectivamente. Villalobos-Hernández e Müller-Goymann (2005) obtiveram resultados semelhantes para o potencial zeta ao desenvolver CLN utilizando cera de carnaúba e decil oleato. À medida que aumentaram a proporção de cera de carnaúba, o potencial zeta também aumentou, sugerindo influência da cera na estabilidade da formulação.

Partículas com potenciais zetas entre 30 e 50 mV são consideradas fisicamente estáveis, enquanto que partículas com cerca de 20 mV favorecem apenas uma estabilidade em curto prazo. Porém, isso só se aplica a partículas estabilizadas apenas eletrostaticamente. Para o caso de partículas que recebem estabilização estérica, com o uso de tensoativos, valores de  $|20|$  mV são suficientes para garantir estabilidade em longo prazo, sugerindo mínima predisposição para agregação em longo período (MITRI; SHEGOKAR; GOHLA et al., 2011).

Como observado na figura 11, de modo geral, o potencial zeta das partículas com filtro solar ou sem filtro solar não foi diferente. O que indica que a carga dos CLN é inerente aos constituintes lipídicos e tensoativos, sem influência do ativo cosmético.

### **5.3.2 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

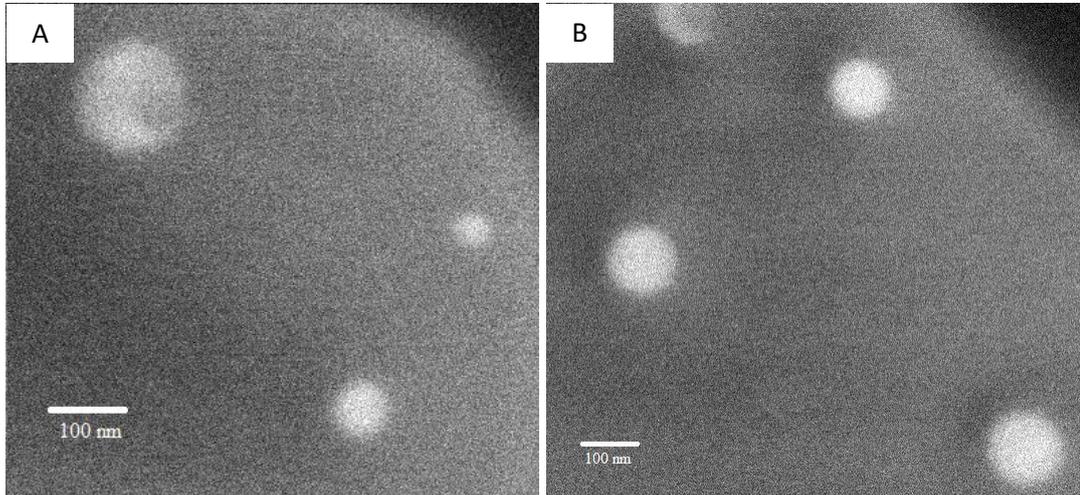
A morfologia das nanopartículas foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), como mostrado na figura 12.

Os NLCB e NLCF, figuras 12A e 12B, respectivamente, apresentaram-se íntegros e na forma esférica. Os tamanhos das partículas corroboram com os obtidos na técnica DLS e as fotomicrografias indicam que não houve aglomeração de nanopartículas.

Os tamanhos observados na técnica variam de 106 a 148 nm aproximadamente para CLNF, apresentando faixa de tamanho estreita como mostrado na avaliação do IPD. Já para CLNB os tamanhos variaram de 53,7 a 157 nm aproximadamente, indicando faixa de

tamanho um pouco mais larga que o anterior, corroborando com os valores de IPD ligeiramente superiores.

**Figura 12– Fotomicrografia dos nanocarreadores. A: CLNB; B: CLNF.**

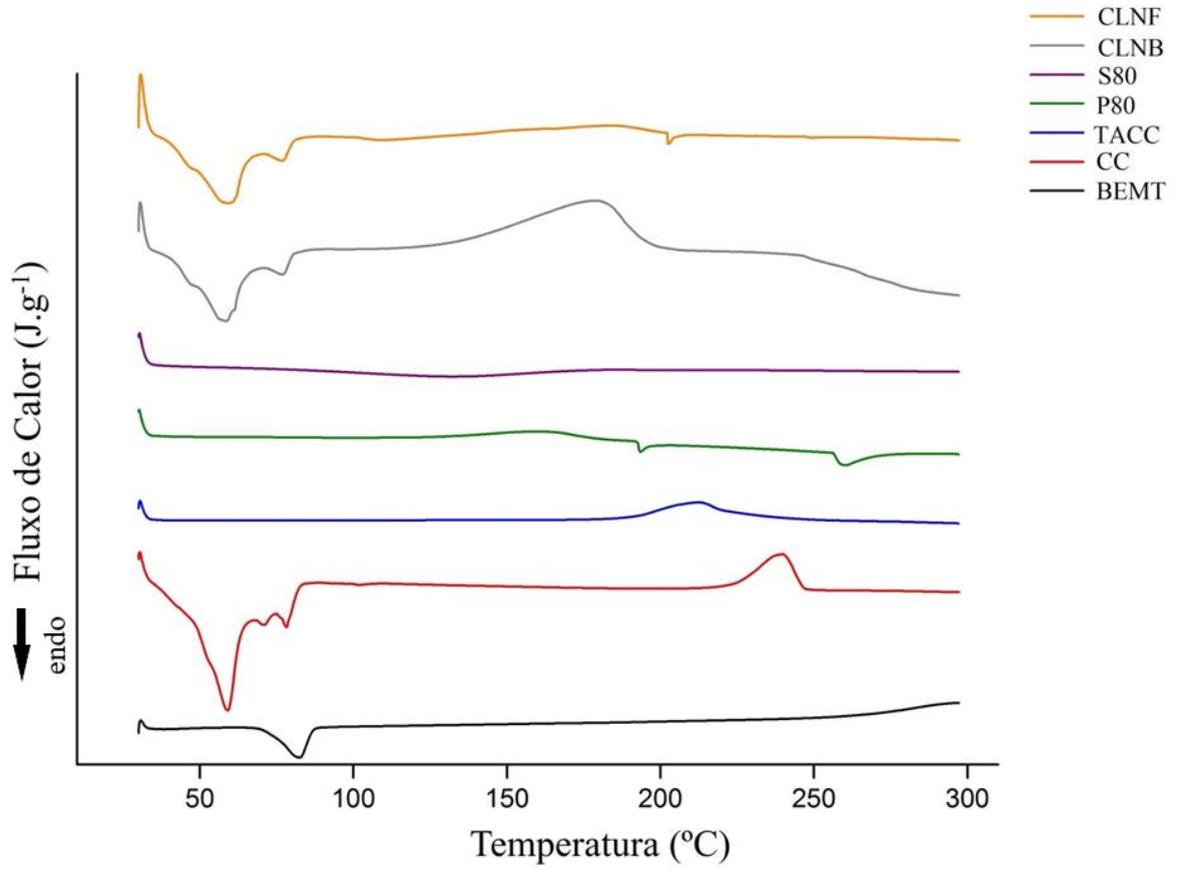


Fonte: autor.

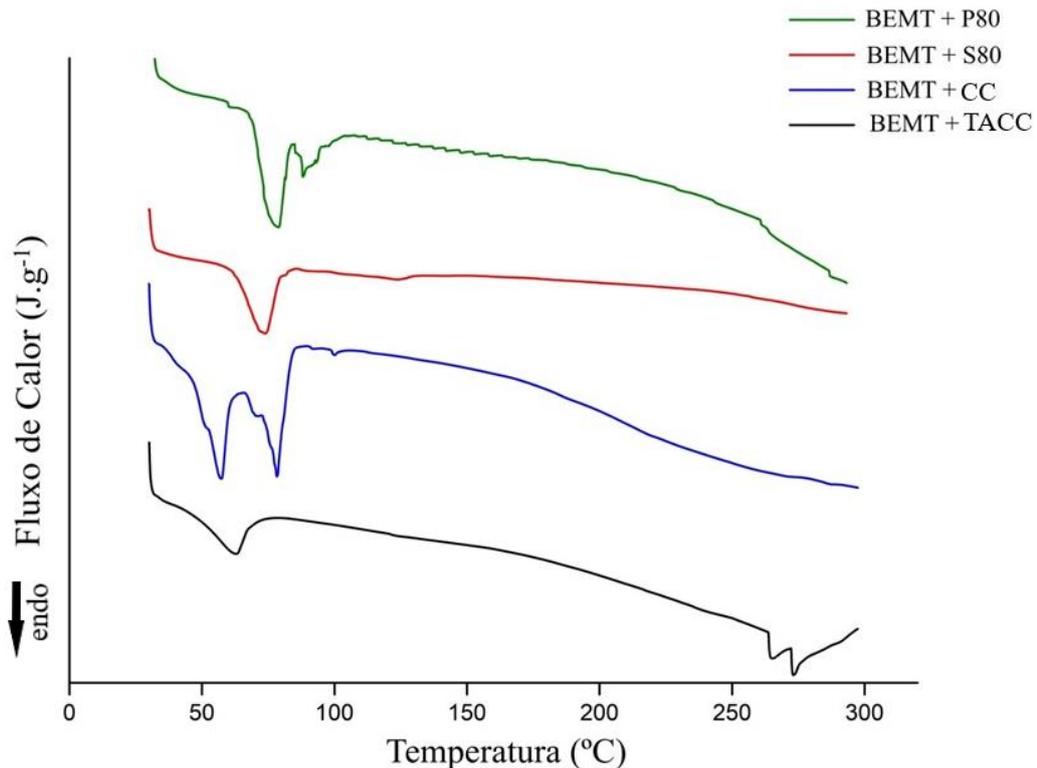
### **5.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

As curvas de DSC dos componentes isolados e dos CLNB e CLNF liofilizados são apresentadas na figura 13. Na figura 14 estão as curvas de DSC das misturas binárias 1:1 entre componentes e filtro solar. As temperaturas de fusão e entalpia são mostradas na Tabela 7.

**Figura 13 - Varreduras de DSC dos CLNF, CLNB e componentes individuais: Span® 80 (S80), Polissorbato 80 (P80), Triglicérideo do ácido caprílico e cáprico (TACC), cera de carnaúba (CC), Bemotrizinol (BEMT).**



**Figura 14 - Varreduras de DSC das misturas binárias 1:1 de BEMT e demais componentes.**



Fonte: autor.

Nas curvas de DSC da CC (Figura 13) foram observados dois eventos endotérmicos. O primeiro 59,52 °C (Tabela 7) e o segundo, de menor energia, em 78,34 °C, relacionados com a fusão do lipídio sólido. O BEMT apresentou um pico endotérmico em 82,53 °C, estando de acordo com os dados do fabricante (BASF).

Na figura 14 são mostradas as curvas de DSC das misturas binárias 1:1 do BEMT e demais componentes dos sistemas, a fim de avaliar as interações que ocorreram entre eles. Na mistura entre BEMT e CC são observados dois picos endotérmicos de energias semelhantes em 57,04 °C e 78,36 °C (Tabela 7) que correspondem à fusão da cera de carnaúba e do BEMT, respectivamente. Na mistura binária entre BEMT e TACC ocorreu uma diminuição na temperatura de fusão, justificada pela dissolução do BEMT no TACC por interações hidrofóbicas, o que promove a desordem da estrutura cristalina do ativo (CASTELLI et al., 2005). Nas demais misturas, não houve alterações significativas nos eventos endotérmicos.

O CLNB apresentou eventos endotérmicos semelhantes ao CLNF. O termograma do NLCF mostrou dois eventos endotérmicos que ocorreram em 58,68 °C e 76,99 °C, fato este

que confirma integridade da cera de carnaúba, sugerindo que não houve alterações na sua estrutura. Os eventos endotérmicos do BEMT não aparecem no termograma do CLNF. Dados da literatura mostram que quando o pico do ativo não aparece na formulação houve a redução da sua cristalinidade ou amorfização, sugerindo que o BEMT foi disperso de forma homogênea nos CLNF (UPRIT et al., 2013).

**Tabela 7 – Valores de transição endotérmica dos componentes isolados e dos CLNB e CLNF.**

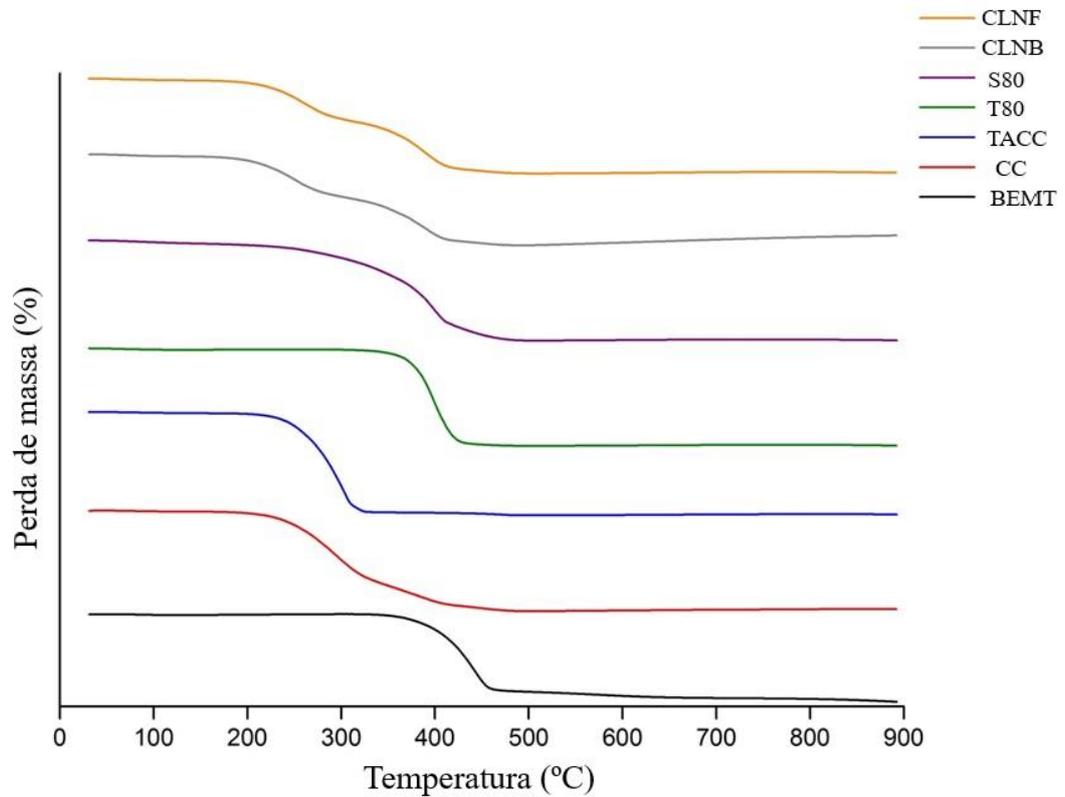
<b>Amostra</b>	<b>Evento</b>	<b>Pico (°C)</b>	<b><math>\Delta H</math> (J g<sup>-1</sup>)</b>
<b>BEMT</b>	Primeiro	82,53	17,17
	Primeiro	59,52	47,17
<b>CC</b>	Segundo	78,34	5,09
	Terceiro	239,84	31,89
<b>BEMT + CC (1:1)</b>	Primeiro	57,04	35,93
	Segundo	78,36	33,44
<b>S80</b>	Primeiro	131,75	24,67
<b>BEMT + S80 (1:1)</b>	Primeiro	74,01	20,59
<b>P80</b>	Primeiro	193,47	1,85
	Segundo	259,78	6,77
<b>BEMT + P80 (1:1)</b>	Primeiro	78,93	25,67
	Segundo	88,12	3,95
<b>TACC</b>	Primeiro	212,41	30,80
<b>BEMT + TACC (1:1)</b>	Primeiro	62,96	15,93
	Primeiro	58,25	56,73
<b>CLNB</b>	Segundo	77,06	4,81
	Terceiro	178,74	127,4
<b>CLNF</b>	Primeiro	58,68	53,76
	Segundo	76,99	3,66
	Terceiro	202,60	1,42

Fonte: autor.

#### 5.3.4 Análise termogravimétrica (TG)

Foram realizadas análises de TG para todos os componentes da formulação e para os CLNF e CLNB a fim de caracterizá-los termicamente (Figura 15).

**Figura 15 – Curvas de TG de todos os componentes e dos CLNB e CLNF.**



Fonte: autor.

**Tabela 8 - Dados de TG dos CLNB, CLNF e componentes dos sistemas.**

Amostra	Estágio	Início – Fim (°C)	Perda de Massa (%)
CC	Primeiro	146,32 – 253,31	72,34
	Segundo	253,31 – 432,11	19,04
	Terceiro	432,11 – 512,82	4,63
BEMT	Primeiro	308,68 – 498,58	74,75
	Primeiro	30,00 – 220,38	5,42
S80	Segundo	220,38 – 419,77	76,15
	Terceiro	419,77 – 516,62	14,78
P80	Primeiro	276,40 – 518,51	92,80
TACC	Primeiro	171,01 – 343,81	95,28
	Segundo	343,81 – 508,07	2,38
CLNB	Primeiro	131,13 – 304,88	39,52
	Segundo	304,88 – 430,21	42,44
CLNF	Terceiro	430,21 – 507,12	3,46
	Primeiro	139,68 – 317,23	40,27
	Segundo	317,23 – 515,67	49,42

Fonte: autor.

CLNB e CLNF mostraram eventos de degradação em temperaturas entre 131 e 139 °C, respectivamente. Apresentam diferença sobre o evento do componente majoritário, CC (146 °C). Tal diferença está relacionada com a provável redução da cristalinidade da cera de carnaúba quando adicionado o lipídio líquido (TACC) na formulação.

Quando analisados os valores entre os CLN, pode-se inferir que a incorporação do BEMT (alta estabilidade térmica) ao núcleo lipídico ocasionou novas interações químicas (hidrofóbica/hidrofóbica).

No entanto, a uma temperatura acima do ponto de fusão da CC (> 59,52 °C), o ativo se funde e apresenta uma discreta perda de massa durante o processo de aquecimento adicional. O filtro solar bemotrizinol apresentou apenas um evento de degradação, que ocorreu no intervalo de 308,68 a 498,58 °C. Tendo um resíduo de mais de 25% mesmo com aquecimento final de 900 °C. Os termogramas TG (Figura 15) mostram que até 300 °C não houve perda de massa do BEMT. A obtenção dos CLN é realizada com aquecimento acima da fusão dos lipídios, que para este estudo ocorreu em cerca de 80 °C. Sendo assim, os resultados indicam que a hipótese de decomposição do BEMT durante o processo de produção das nanopartículas pode ser excluída, devido à sua alta estabilidade térmica.

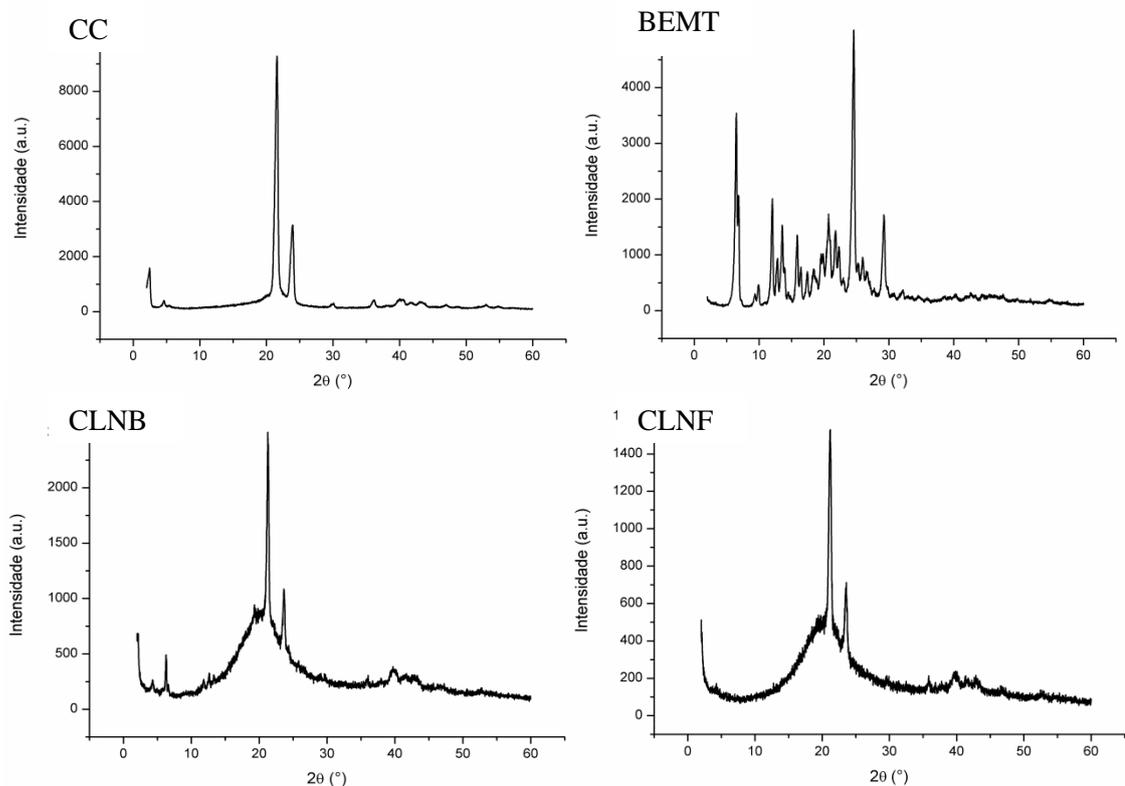
Na análise de TACC, a degradação térmica ocorreu praticamente por completo em um único evento, iniciou em 171,01 °C até 343,81 °C com perda de 95,28% da massa total lipídio.

A análise do Span<sup>®</sup> 80 (S80) mostrou uma pequena perda de massa (5,42%) no início do aquecimento a 30 °C até 220,38°C. O segundo evento de degradação ocorreu de 220,38 a 419,77 °C, com perda de 76,15% de massa. Enquanto que o polissorbato 80 (T80) apresentou um único evento de degradação térmica, que ocorreu no intervalo de 276,4 °C a 518,51 °C, havendo 92,8% de perda de massa.

### **5.3.5 Difração de raios X (DRX)**

As análises de DRX foram realizadas para avaliação da cristalinidade dos principais componentes e dos CLN obtidos, e avaliar a influência do lipídio líquido na formulação. Os difratogramas do lipídio sólido (cera de carnaúba), BEMT e dos CLNB e com CLNF são representados na figura 16.

**Figura 16 – Difratomogramas da cera de carnaúba, BEMT, CLNB e CLNF.**



Fonte: autor.

Os difratogramas da cera de carnaúba apresentaram vários picos de difração, sendo dois mais intensos em  $21^\circ$  e  $24^\circ$  (ângulos dispersos em  $2\theta$ ), confirmando a natureza cristalina no lipídio sólido e concordando com os dados mostrados por Freitas et al. (2016). O bemotrizinol apresentou vários picos de difração, sendo os de maior intensidade em torno de  $7^\circ$ ,  $13^\circ$ ,  $24^\circ$  e  $29^\circ$ , referentes à sua estrutura cristalina.

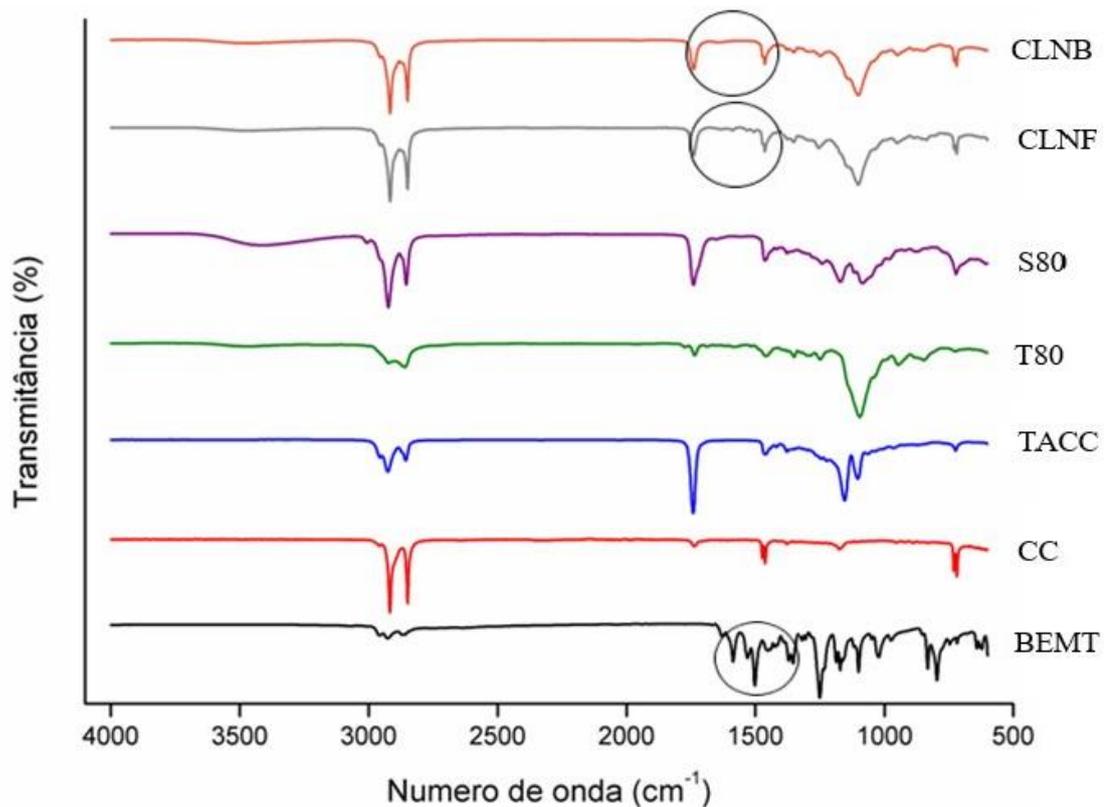
Nos difratogramas dos CLN observou-se o aparecimento de um alargamento localizado no início do pico em torno de  $21^\circ$ . Isso ocorre pela adição do TACC no desenvolvimento da formulação, resultando no surgimento de halos amorfos no sistema, que leva a uma diminuição da organização da estrutura cristalina das cadeias lipídicas. A amorfização sugere a dispersão do ativo no núcleo lipídico do sistema. Tais resultados reforçam a hipótese da diminuição de cristalinidade relacionada ao que foi obtido no DSC.

Os difratogramas obtidos dos carreadores lipídicos nanoestruturados, corroboram com os resultados apresentados por Nikolic et al. (2011), com o aparecimento do halo amorfo no nanocarreador e diminuição da cristalinidade da cera de carnaúba. Essa desorganização da estrutura cristalina caracteriza esse tipo de nanossistema.

### 5.3.6 Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise FTIR-ATR possibilita avaliar interação química entre os componentes. Os espectros FTIR dos componentes da formulação, dos CLNB e CLNF são mostrados na figura 17.

**Figura 17 – Espectro FT-IR dos componentes isolados, CLNB e CLNF.**



Fonte: autor.

Os espectros do BEMT (Figura 17) indicam bandas de 1550 a 850  $\text{cm}^{-1}$  referentes ao estiramento C-C da ligação carbono-carbono e C-O-C de éter. Em 1570  $\text{cm}^{-1}$  bandas referentes a C=N, correspondentes ao grupamento triazina do BEMT. De 2000 a 2600  $\text{cm}^{-1}$  bandas referentes ao estiramento C=C=C dos benzenos. E de 2500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  bandas referentes ao estiramento OH das hidroxilas e CH dos grupamentos alcanos.

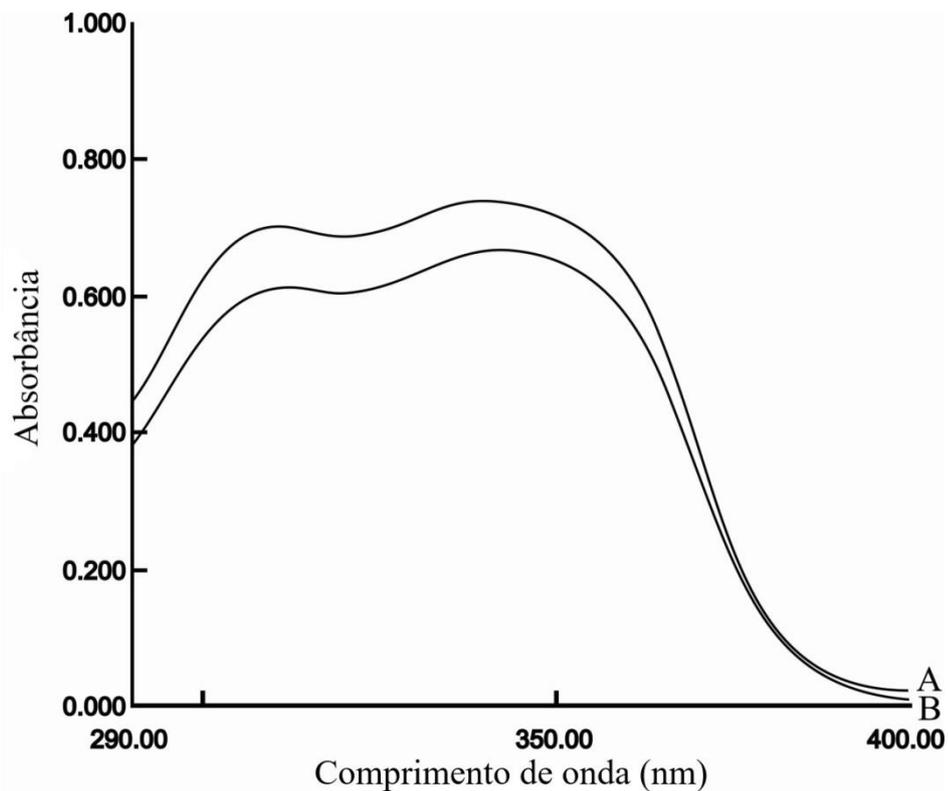
No espectro dos sistemas há a predominância das bandas referentes aos lipídios, principalmente a cera de carnaúba, e dos tensoativos. O que diferencia o CLNB do CLNF é que onde o filtro foi incorporado é possível observar uma vibração no comprimento de onda de 1550 a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente às ligações C=N existentes apenas no BEMT, identificados com círculos na figura 17.

Como a concentração de filtro solar utilizada é menor que dos demais componentes, suas bandas características aparecem em menor intensidade no sistema, contudo é possível identificá-las. Além disso, o sutil aparecimento do BEMT no espectro do CLNF indica que o ativo foi incorporado aos nanocarreadores. Resultados similares foram apresentados por Tahir e colaboradores (2017).

### 5.3.7 Avaliação do potencial fotoprotetor *in vitro* e FPS espectrofotométrico

As varreduras em espectrofotômetro UV-VIS permitiram uma análise qualitativa sobre o efeito potencializador do filtro incorporado ao nanossistema em relação ao filtro solar sozinho.

**Figura 18 - Comparação entre as absorbâncias do CLNF (A) e solução de BEMT (B).**



Fonte: autor.

Os resultados apresentados na figura 18 e tabela 9 apontam uma diferença relevante entre os valores de FPS do filtro solar incorporado ao CLN e a solução de BEMT. Um aumento considerável nas absorbâncias ocorreu quando o filtro solar foi incorporado ao sistema, principalmente na faixa de 290 a cerca de 380 nm. Isso se dá devido ao efeito sinérgico proporcionando pelo lipídio sólido, a cera de carnaúba. Tais dados corroboram com

Nikolic e colaboradores (2011) quando ao avaliarem absorbâncias de diferentes carreadores lipídicos nanoestruturados contendo o mesmo tipo e concentração de filtro solar, mudando apenas o lipídio, obtiveram medidas maiores para a amostra contendo cera de carnaúba. Concordando com Villalobos-Hernández e Müller-Goymann (2006) que detectaram a capacidade de filtrar radiação UV como característica intrínseca da cera de carnaúba.

Para quantificar o FPS, o método *in vitro* foi o espectrofotométrico na região UVB, estabelecido por Mansur e colaboradores (1986). A fim de garantir a confiabilidade do método, foi avaliada uma formulação fotoprotetora comercial com fator de proteção conhecido ( $FPS_{\text{rotulado}} = 30$ ). Os valores de FPS calculados seguindo o método aparecem na Tabela 9.

**Tabela 9 - Valores do FPS *in vitro*.**

<b>Formulação</b>	<b>FPS espectrofotométrico</b>	<b>FPS corrigido</b>
<b>CLNF</b>	3,43	10,29
<b>CLNB</b>	0,19	0,57
<b>SOLUÇÃO BEMT</b>	1,50	4,47
<b>FOTOPROTETOR</b>	10,06	30
<b>COMERCIAL</b>		

Fonte: autor.

O resultado obtido para o protetor solar comercial foi  $FPS_{\text{espectrofotométrico}} = 10$ , estando em desacordo com o valor rotulado pela indústria. Partindo dessa informação, foi realizado um cálculo para ajuste do FPS obtido no nanossistema contendo bemotrizinol, e o resultado aproximado foi  $FPS_{\text{CLNF}} = 10$ .

Os dados após conversão mostram-se satisfatórios, tendo em vista a baixa concentração de filtro solar (0,4% p/v) utilizada para o desenvolvimento do CLNF. O potencial efeito fotoprotetor do CLNF observado na fig. 18 corrobora com os valores de FPS espectrofotométricos, onde o efeito é aumentado quando o filtro solar está incorporado às nanopartículas, garantindo uma otimização da atividade fotoprotetora do BEMT.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Finalizando as etapas de desenvolvimento e caracterização deste trabalho, foi possível afirmar que os resultados obtidos foram satisfatórios. Foi alcançado o objetivo de desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados utilizando a mistura da cera de carnaúba como lipídio sólido mais o triglicerídio do ácido cáprico e caprílico como lipídio líquido, e incorporar o filtro solar orgânico bemotrizinol (Tinosorb<sup>®</sup> S) aos nanocarreadores.

A incorporação do bemotrizinol realizada a partir de um planejamento experimental Box-Behnken do tipo 3<sup>3</sup> permitiu a escolha de apenas um sistema para seguir com os estudos de caracterização e estudos que virão, garantindo menor gasto de materiais e redução no custo do desenvolvimento, bem como redução do tempo utilizado.

A partir dos dados obtidos na caracterização, afirma-se que o sistema desenvolvido é viável para posterior desenvolvimento de um produto final, um protetor solar que poderá ser veiculado em diferentes formas galênicas. Os tamanhos de partículas são ideais para protetor solar e sugerem a adesividade na pele, dado que será confirmado com estudos posteriores.

Os resultados da atividade fotoprotetora dos carreadores com filtro solar foram favoráveis e sugerem um sinergismo benéfico entre o filtro solar e o nanocarreador, promovendo aumento da atividade.

De modo geral, os CLNF mostraram-se promissores para elaboração de fotoprotetores, podendo ser dispersos em diferentes formas cosméticas, incluindo hidrogéis. Estudos para determinação do FPS *in vivo* se fazem necessário para confirmar o desempenho obtido *in vitro*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADITYA, N. P.; MACEDO, A. S.; DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; KIM, S.; CHANG, P.; KO, S. Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 115-121, 2014.
- AGARWAL, N. Photocarcinogenesis and molecular mechanism. In: AGARWAL, N. (Org.). *Photocarcinogenesis & Photoprotection*. Colorado: 2018. p. 29-44.
- AL-JAMAL, M. S.; GRIFFITH, J. L.; LIM, H. W. Photoprotection in ethnic skin. **Dermatologica Sinica**, Taipei, v. 32, n. 4, p. 217-224, 2014.
- ALVARÉZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R. H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agente: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Regensburg, v. 52, p. 191-195, 2001.
- AO, J.; YUAN, T.; GAO, L.; YU, X.; ZHAO, X.; TIAN, Y.; DING, W.; MA, Y.; SHEN Z. Organic UV filters exposure induces the production of inflammatory cytokines in human macrophages. **Science of the Total Environment**, Barcelona, v. 635, p. 926-935, 2018.
- ASHBY, J.; TINWELL, H.; PLAUTZ, J.; TWOMEY, K.; LEFEVRE, P. A. Lack of binding to isolated estrogen or androgen receptors, and inactivity in the immature rat uterotrophic assay, of the ultraviolet sunscreen filters Tinosorb M-Active and Tinosorb S. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 34, n. 3, p. 287-291, 2001.
- BACCARIN, T.; MITJANS, M.; RAMOS, D.; LEMOS-SENNA, E.; VINARDELL, M. P. Photoprotection by Punica granatum seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. **Photochemistry and Photobiology**, Canadá, v. 153, p. 127-136, 2015.
- BAILLO, V. P.; LIMA, A. C. Nanotecnologia aplicada à fotoproteção. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 3, p. 271-278, 2012.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 30, de 01 de junho de 2012. Brasília, 2012.
- BHUPTANI, R. S.; PATRAVALE, V. B. Starch microsponges for enhanced retention and efficacy of topical sunscreen. **Materials Science & Engineering C**, Washington, v. 104, 2019.
- CASTELLI, F.; PUGLIA, C.; SARPIETRO, M. G.; RIZZA, L.; BONINA, F. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*, **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 304, p. 231-238, 2005.
- CESTARI, T. F.; OLIVEIRA, F. B; BOZA, J. C. Considerations on photoprotection and skin disorders. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, Paris, v. 139, n. 4, p. 135-143, 2012.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of Butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and Ethylhexyl methoxycinnamate by Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a New UV Broadband Filter. **Photochemistry and Photobiology**, Canadá, v. 74, n. 3, p. 401-406, 2001.

COHEN, L. E.; GRANT, R. T. Sun protection: current management strategies addressing UV exposure. **Clinics in Plastic Surgery**, Philadelphia, v. 43, n. 3, p. 605-610, 2016.

COUTINHO, C. S. C.; SANTOS E. P.; MANSUR, C. R. E. Nanosystems in photoprotection. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, New York, v. 15, p. 9679-9688, 2015.

COZZI, A. C.; PERUGINI, P.; GOURION-ARSIQUAUD, S. Comparative behavior between sunscreens based on free or encapsulated UV filters in term of skin penetration, retention and photo-stability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Stockholm, v. 121, p. 309-318.

CZAJKOWSKA-KOSNIK, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Nanostructured lipid carriers: a potential use for skin drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, Krakow, v. 71, n. 1, p. 156-166, 2019.

DAN, N. Compound release from nanostructured lipid carriers (NLCs). **Journal of Food Engineering**, California, v. 171, p. 37-43, 2016.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Stockholm, v. 47, n. 1, p. 139-151, 2012.

DAUDT, R. M.; EMANUELLI, J.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; POHLMANN, S. S. G. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 65, n. 3, p. 28-31, 2013.

DUARTE-JUNIOR, A. P. **Preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de cera de carnaúba e óleo de pracaxi contendo dexametasona para tratamento tópico de inflamações cutâneas**. 2016. 190 f. Tese (Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use. United States, 2013.

FRIZZO, M. S.; FEUSER, P. E.; BERRES, P. H.; RICCI-JÚNIOR, E.; CAMPOS, A. E. M.; COSTA, C.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Simultaneous encapsulation of zinc oxide and octocrylene in poly (methyl methacrylate-co-styrene) nanoparticles obtained by miniemulsion polymerization for use in sunscreen formulations. **Colloids and Surfaces A**, New York, v. 561, p. 39-46, 2019.

GABA, B.; FAZIL, M.; KHAN, S.; ALI, A.; BABOOTA, S.; ALI, J. Nanostructured lipid carrier system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, Cairo, v. 53, p. 147-159, 2015.

GILBERT, E.; ROUSSEL, L.; SERRE, C.; SANDOUK, R.; SALMON, D.; KIRILOV, P.; HAFTEK, M.; FALSON, F.; PIROT, F. Percutaneous absorption of benzophenone-3 loaded lipid nanoparticles and polymeric nanocapsules: A comparative study. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 504, n. 1-2, p. 48-58, 2016.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 614-626, 2008.

HEO, S.; HWANG, H. S.; JEONG, Y.; NA, K. Skin protection efficacy from UV irradiation and skin penetration property of polysaccharide-benzophenone conjugates as a sunscreen agente. **Carbohydrate Polymers**, Aveiro, v. 195, p. 534-541, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA. **Incidência de câncer no Brasil**. Brasília, 2018. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 07 de agosto de 2019.

JAIN, P.; RAHI, P.; PANDEY, V.; ASATI, S.; SONI, V. Nanostructure lipid carriers: A modish contrivance to overcome the ultraviolet effects. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, Egito, v. 4, n. 2, p. 89-100, 2017.

JANSEN, R.; OSTERWALDER, U.; WANG, S. Q.; BURNETT, M.; LIM, H. W. Photoprotection: Part II. Sunscreen: Development, efficacy, and controversies. **Journal of the American Academy of Dermatology**, New York, v. 69, n. 6, p. 867.e1-867.e14, 2013b.

JUNYAPRASERT, V. B.; TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; BOONME, P.; MÜLLER, R. H. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: Stability, rheology and *in vitro* skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 377, p. 207-214, 2009.

KHURANA, S.; JAIN, N. K.; BEDI, P. M. S. Development and characterization of a novel controlled release drug delivery system based on nanostructured lipid carriers gel for meloxicam. **Life Sciences**, Ohio, v. 93, n. 21, p. 763-772, 2013.

KOVACEVIC, A. B.; MÜLLER, R. H. SAVIC, S. D.; VULETA, G. M.; KECK, C. M. Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdã, v. 444, p. 15-25, 2014.

LI, W.; JING, S.; XIN, X.; ZHANG, X.; CHEN, K.; CHEN, D.; HU, H. Preparation of CaP/pDNA nanoparticles by reverse micro-emulsion method: Optimization of formulation variables using experimental design. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Tokyo, v. 12, n. 2, p. 179-186, 2017.

LV, X.; CONG, Z.; LIU, Z.; MA, X.; TIAN, Y.; ZHANG, X.; XU, B.; ZHANG, J.; TANG, Z. Improvement of the solubility, photostability, antioxidant activity and UVB photoprotection of trans-resveratrol by essential oil based microemulsions for topical application. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, v. 48, p. 346-354, 2018.

MANAÍA, E. B.; KAMINSKI, R. C. K.; SOARES, C. P.; MENEAU, F.; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V.; CHIAVACCI, L. A. Liquid crystalline formulations containing modified surface TiO<sub>2</sub> nanoparticles obtained by sol-gel process. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, Boston, v. 63, p. 251-257, 2012.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. D.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.

MEDHAUG, I.; OLSETH, J.A.; REUDER, J. UV radiation and skin cancer in Norway. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Quebec, v. 96, n. 3, p. 232-241, 2009.

MITRI, K.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSELMINI, C.; MÜLLER, R. H. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 414, n. 1-2, p. 267-275, 2011.

MORABITO, K.; SHAPLEY, N. C.; STEELEY, K. G.; TRIPATHI, A. Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection. **International Journal of Cosmetic Science**, Paris, v. 33, p. 385-390, 2011.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Regensburg, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, New York, v. 54, p. 131-155, 2002.

MUTHUKUMAR, M.; MOHAN, D.; RAJENDRAN, M. Optimization of mix proportions of mineral aggregates using Box Behnken design of experiments. **Cement and Concrete Composites**, Chennai, v. 25, n. 7, p. 751-758, 2003.

NIKOLIĆ, S.; KECK, C. M.; ANSELMINI, C.; MÜLLER, R.H. Skin photoprotection improvement: synergistic interaction between lipid nanoparticles and organic UV filters. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 414, n. 1, p. 276-284, 2011.

NORONHA M. D. M.; **Tendências mais recentes na fotoproteção**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014.

OLIVEIRA, C. A.; PERES, D. D.; GRAZIOLA, F. CHACRA, N. A. B.; ARAÚJO, G. L. B.; FLÓRIDO, A. C.; MOTA, J.; ROSADO, C.; VELASCO, M. V. R.; RODRIGUES, L. M.; FERNANDES, A. S.; BABY, A. R. Cutaneous biocompatible rutin-loaded gelatin-based nanoparticles increase the SPF of the association of UVA and UVB filters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Stockholm, v. 81, p. 1-9, 2016.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 366, n. 1, p. 170-184, 2009.

PEREIRA, S. C. A. **Tratamento de incertezas em modelagem de bacias**. 2002. 326 f. Tese (Programa de Pós-Graduação de Engenharia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

PERES, D. A. **Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo***. 2015. 166 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

PUGLIA, C.; DAMIANI, E.; OFFERTA, A.; RIZZA L.; TIRENDIA, G. G.; TARICOC, M. S.; CURRERIC, S.; BONINAA F.; PERROTTAC, R. E. Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: Characterization, *in vitro* penetration and photostability studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Stockholm, v. 51, p. 211-217, 2014.

RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Formulation and evaluation of protein-loaded solid dispersions by non-destructive methods. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, New York, v. 12, 2010.

SALA, M.; DIAB, R.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 535, n. 1-2, p. 1-17, 2018.

SALMINEN, H.; HELGASON, T.; AULBACH, S.; KRISTINSSON, B.; KRISTBERGSSON, K.; WEISS J. Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 426, p. 256-263, 2014.

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

SANTOS, F. R. A. **Emulsões Múltiplas: formulação, caracterização, estabilidade e aplicações**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

SATO, M. R.; OSHIRO JUNIOR, J. A.; MACHADO, R. T. A.; SOUZA, P. C.; CAMPOS, D. L.; PAVAN, F. R.; SILVA, P. B.; CHORILLI, M. Nanostructured lipid carriers for incorporation of copper (II) complexes to be used against *Mycobacterium tuberculosis*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 909-921, 2017.

SAYRE, R. M.; AGIN, P. P.; LEVEE, G. J.; MARLOWE, E. A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of suncreening formulas. **Photochemistry and Photobiology**, Canadá, v. 29, p. 559-566, 1979.

SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 507-515, 2011.

SCHNEIDER, S. L.; LIM, H. W. Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, New York, v. 80, p. 266-271, 2019.

SILVA, D. P. P. **Nanopartículas lipídicas**. 2013. 53 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

SILVA, J. D. F.; SILVA, Y. P.; PIATNICKI, C. M. S.; BÖCKEL, W. J.; MENDONÇA, C. R. B. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de Alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 9, p. 1196-1206, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA – SBD. **Câncer de pele**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: < <https://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/cancer-da-pele/64/>>. Acesso em: 07 de agosto de 2019.

TAHIR, N.; MADNI, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; REHMAN, M.; CORREIA, A.; PRÍNCIPE KASHIF, M.; MÄKILÄ, E.; SALONEN, J.; SANTOS, H. A.; Development and optimization of methotrexate-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled drug delivery applications. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 533, p. 156-168, 2017.

THAPA, C.; AHAD, A.; AQIL, M.; IMAM, S. S.; SULTANA, Y. Formulation and optimization of nanostructured lipid carriers to enhance oral bioavailability of telmisartan using Box–Behnken design. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, New York, v. 44, p. 431-439, 2018.

TUCHINDA, C.; LIM, H. W.; OSTERWALDER, U.; ROUGIER, A. Novel emerging sunscreen technologies. **Dermatologic Clinics**, Philadelphia, v. 24, n. 1, p. 105-117, 2006.

UPRIT, S.; SAHU, R. K.; ROY, A.; PARE, A. Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Amsterdam, v. 21, p. 379-385, 2013.

VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, J. R.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Novel nanoparticulate carrier system based on carnauba wax and decyl oleate for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Regensburg, v. 60, n. 1, p. 113-122, 2005.

VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, J. R.; MÜLLER-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**, New York, v. 322, p. 161-170, 2006.

VIOLANTE, I. M. P.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F. S.; SANTOS, R. A. N.; FERRARI, M. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 2A, 452-457, 2009.

WANG, F.; GE, T.; GAO, Q.; HU, L.; YU, J.; LIU, Y. The distribution of biologically effective UV spectral irradiances received on a manikin face that cause erythema and skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Quebec, v. 140, p. 205-214, 2014.

WANG, S. Q.; BURNETT, M.; OSTERWALDER, U.; LIM, H. W. Photoprotection: Part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, New York, v. 69, n. 6, p. 853.e1-853.e12, 2013a.

WATSON, M.; HOLMAN, D. M.; MAGUIRE-EISEN, M. Ultraviolet radiation exposure and its impact on skin cancer risk. **Seminars in Oncology Nursing**, New York, v. 32, n. 3, p. 241-254, 2016.

WISSING, S. A.; LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 52, p. 313-324, 2001.

YOUNG, A. R.; CLAVEAU, J.; ROSSI, A. B. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, New York, v. 76, n. 3, p. 100-109, 2017.