

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

*DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS CONTENDO  
NANOCÁPSULAS*

**Tese de Doutorado**

**Valeria Weiss Angeli**

**Porto Alegre, 2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

***DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS CONTENDO  
NANOCÁPSULAS***

**Valeria Weiss Angeli**

**Porto Alegre, 2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

***DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS CONTENDO  
NANOCÁPSULAS***

Tese apresentada por Valeria  
Weiss Angeli para obtenção do  
TÍTULO DE DOUTOR em Ciências  
Farmacêuticas

**Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Mirian Salvador**

**Porto alegre, 2007**

Tese defendida e aprovada em 15 de junho de 2007, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, perante Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. EDISON SANTANA CARVALHO  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. JOSE CLÁUDIO FONSECA MOREIRA  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES  
Universidade Federal de Pernambuco

### CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

A582d	Angeli, Valeria Weiss Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas / Valeria Weiss Angeli - Porto Alegre: UFRGS, 2007. - xx, 208p.: il.  Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.  1. Quercetina. 2. Metoxicinamato de octila. 3. Fotoproteção. 4. Nanocápsulas. 5. Penetração cutânea. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. II. Salvador, Mirian. III. Título.  CDU: 615.453.4
-------	---

Bibliotecária Responsável:  
Margarida Maria C.F. Ferreira - CRB 10/480

*“Para achar água é preciso descer terra adentro  
encharcar-se no lodo.  
Mas há os que preferem olhar os céus,  
e esperar pelas chuvas...”*

*Oduvaldo Vianna Filho*

*“ Dedico esta T'ESE a minha família, em especial ao meu  
pai René Benhur Weiss e minha mãe Elizabet Rosseto  
Weiss por terem me dado a oportunidade de conhecer as  
primeiras letras deste texto que hoje escrevo. Ao meu  
marido, Sandro, agradeço pelo companheirismo e  
paciência de cada dia”*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Profa. Sílvia pela confiança em mim depositada e pela oportunidade concedida de trabalhar ao seu lado. Por ter comigo compartilhado seus conhecimentos e experiências profissionais e que desde a minha iniciação na pesquisa, como bolsista de iniciação científica, soube me guiar para além das teorias e das técnicas. E acima de tudo por ter me mostrado que ser mestre, é ser um grande amigo.

À Profa. Adriana Pohlmann pela contribuição prestada durante a discussão dos resultados obtidos.

À Profa. Mirian Salvador pela co-orientação, a qual foi de extrema importância para a realização dos trabalhos relacionados aos estudos de potencial antioxidante.

À UFRGS pela oportunidade de realizar meus estudos em Farmácia desde a graduação até o Doutorado.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela concretização deste trabalho bem como pelos ensinamentos transmitidos.

À Capes pela bolsa de estágio de Doutorado concedida durante o período de 5 meses no laboratório de Cosmetologia e Farmácia Galênica da Universidade Claude Bernard, Lyon, França.

Ao professor Hatem Fessi por ter me aceito como estagiária em seu laboratório na Universidade Claude Bernard e por ter se mostrado um grande amigo sempre disposto a discutir os resultados obtidos e preocupado com o meu trabalho.

Aos meus grandes amigos franceses Geneviève, Patrice, Joële e Jocelyne que me ensinaram muitas coisas e me deram todo o suporte para a realização do meu trabalho em Lyon.

Aos meus mestres e amigos franceses Sandrine, Jocelyne, Marie Alexandrine e Stéphanie pelos ensinamentos transmitidos.

À Elza e George Chignier pelo seu carinho e amizade e por terem me recebido em sua casa como uma verdadeira filha brasileira.

Aos colegas do laboratório 405 pela amizade. Em especial agradeço a Lali Ronsoni Zancan por ter me ajudado no início do meu trabalho, como bolsista, sempre disponível, responsável e amiga.

Aos meus colegas da Universidade de Caxias do Sul, em especial a Profa, Rita Callegari Basso, Prof. Eduardo Palma, Profa. Daniele Grazziotin Soares e Kellen C.B. Souza que souberam entender, meus momentos difíceis e me ajudaram na resolução de vários problemas. Aos meus chefes diretos Prof. Dr. Eduardo Pretto Serafini e Prof. Paulo Gedoz de Carvalho agradeço a compreensão e também a divisão de responsabilidades, o que foi fundamental para a realização desta Tese. A minha família que soube entender meus momentos de ausência, e pelo incentivo constante que me prestavam, quando percebiam que o cansaço começava a aparecer.

Ao meu marido Sandro, pelo amor, amizade, confiança e acima de tudo paciência que demonstrou, durante todo o período do Doutorado.

Agradeço a todas aquelas pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a DEUS pela oportunidade concedida e por ter me dado a força, serenidade e equilíbrio necessários para a realização desta TESE.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XVII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIX</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
Revisão de Literatura.....	11
1.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio.....	13
1.1.1 Agentes estressores celulares.....	16
1.1.2 Danos causados pelas ERO.....	17
1.1.3 Avaliação do potencial antioxidante.....	19
1.2 Flavonóides: ação antioxidante.....	20
1.3 Fotoproteção.....	28
1.4 Sistemas nanoparticulados.....	35
1.4.1 Preparação de nanocápsulas.....	38
1.4.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas.....	40
1.5 Penetração cutânea.....	43
1.5.1 Vias de penetração de fármacos na pele.....	51
1.5.2 Avaliação dos parâmetros de liberação, penetração percutânea e retenção cutânea <i>in vitro</i> .....	54
<b>CAPÍTULO II</b>	
Estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas contendo quercetina e metoxicinamato de octila.....	61
2.1 Introdução.....	63
Publicação 1 (submetida): Nanoencapsulation of quercetin using octyl methoxycinnamate as oil in nanocapsules delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation.....	65



### **CAPÍTULO III**

Avaliação do potencial antioxidante de suspensões de nanocápsulas em modelos de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	97
3.1 Introdução.....	99
Publicação 2 (a ser submetido): Antioxidant effect of nanocapsules containing quercetin and octyl methoxycinnamate .....	101

### **CAPÍTULO IV**

Estudo de penetração cutânea de formas farmacêuticas semi-sólidas contendo nanocápsulas.....	127
4.1 Introdução.....	129
Publicação 3 (a ser submetida): Original study of octyl methoxycinnamate release profile from nanocapsules in the skin: comparison with topical formulations containing free OMC.....	131
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	159
<b>CONCLUSÕES</b> .....	169
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	175
<b>BIOGRAFIA</b> .....	195
<b>PARECERES DA BANCA EXAMINADORA</b> .....	203

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Diferentes radicais originados pela redução do oxigênio.....	14
<b>Figura 2.</b> Estrutura geral dos flavonóides.....	20
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da quercetina.....	21
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do metoxicinamato de octila.....	32
<b>Figura 5.</b> Corte esquemático do tecido cutâneo.....	44
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo da liberação de um princípio ativo a partir de uma emulsão.....	50
<b>Figura 7.</b> Diferentes vias de passagem através da pele.....	51
<b>Figura 8.</b> Células de Franz.....	56

### CAPÍTULO II

<b>Figure 1.</b> TEM images (bar = 100 nm) of (a) NC-Epikuron 170 <sup>®</sup> -QUE/OMC (100.000 x and 250.000x) and (b) NC-Span 60 <sup>®</sup> -QUE/OMC (100.000x and 250.000 x ) .....	91
<b>Figure 2.</b> DSC thermograms of (a) PCL, (b) Epikuron 170 <sup>®</sup> , (c) Span 60 <sup>®</sup> , (d) OMC, and (e) Miglyol 810 <sup>®</sup> (first heating cycle, 10 °C/min).....	92
<b>Figure 3.</b> DSC thermograms of (a) NC-Epikuron 170 <sup>®</sup> -QUE/OMC, (b) NC-Epikuron 170 <sup>®</sup> -OMC, (c) NC-Span 60 <sup>®</sup> -QUE/OMC, (d) NC-Span 60 <sup>®</sup> -OMC, (e) NC-Epikuron 170 <sup>®</sup> -QUE, (f) NC-Epikuron 170 <sup>®</sup> , (g) NC-Span 60 <sup>®</sup> -QUE, and (h) NC-Span 60 <sup>®</sup> (first heating cycle, 10 °C/min).....	93
<b>Figure 4.</b> QUE contents in the nanocapsule suspensions after preparation and 15 days under UVA radiation.....	94
<b>Figure 5.</b> OMC contents in the nanocapsule suspensions after preparation and after 15 days under UVA radiation.....	95

### CAPÍTULO III

**Figure 1.** Different survival of *Saccharomyces cerevisiae* between nanocapsules with QUE and OMC and nanocapsules without QUE, comparatively to hydrogen peroxide. NC-Epikuron170<sup>®</sup> (QUE/OMC) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mM; NC- Span 60<sup>®</sup> (QUE/OMC) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mM; NC-Epikuron170<sup>®</sup> (OMC) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mM; NC-Span 60<sup>®</sup> (OMC) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mM..... 126

### CAPÍTULO IV

**Figure 1.** Percutaneous penetration of OMC for the control gel (OMC-Gel) at 3 and 6 hours. Percentages of the OMC applied dose (% ± S.D.) in various skin layers: skin surface (SS), stratum corneum (SC), viable epidermis (VE), dermis(D) and viable skin layers (VSL=VE+D+RF receptor fluid) (n=6)..... 155

**Figure 2.** Percutaneous penetration of OMC for BNC (protocol A) at 3 and 6 hours. Percentages of the OMC applied dose (% ± S.D.) in various skin layers: skin surface (SS), stratum corneum (SC), viable epidermis (VE), dermis (D) and viable skin layers (VSL=VE+D+RF receptor fluid) (n=6)..... 156

**Figure 3.** Percutaneous penetration of OMC for UBNC (protocol B) at 3 and 6 hours. Percentages of the OMC applied dose (% ± S.D.) in various skin layers: skin surface (SS), stratum corneum (SC), viable epidermis (VE), dermis (D) and viable skin layers (VSL=VE+D+RF receptor fluid) (n=6)..... 157

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Table 1. Nanocapsule formulations and their components.....	88
Table 2. Mean particle sizes and zeta potentials.....	89
Table 3. Melting temperatures of nanocapsule suspensions, obtained by differential scanning calorimetry (first heating cycle).....	90

### CAPÍTULO III

Table 1. Nanocapsules components.....	123
Table 2. Size particles and zeta potentials of nanocapsule formulations.....	124
Table 3. Survival of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast cells in the different conditions of treatment.....	125

### CAPÍTULO IV

Table I. Results of nanocapsule characterization (n= 3).....	153
Table II. <i>In vitro</i> skin distribution of OMC (mean of applied dose (%)± S.D., n=6).....	154

## RESUMO

Esta tese de doutorado fundamentou-se na preparação e caracterização de suspensões de nanocápsulas contendo quercetina (QUE) e metoxicinamato de octila (MCO), como componente do núcleo central destes sistemas. As suspensões foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e foram posteriormente caracterizadas através da determinação dos teores totais de QUE e MCO, das taxas de associação da QUE e do MCO às nanocápsulas, dos diâmetros médios de partículas e polidispersões, dos potenciais zeta e análises morfológicas. Avaliou-se neste estudo, a influência do tipo de tensoativo utilizado (Span 60<sup>®</sup> ou Epikuron 170<sup>®</sup>) sobre as características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas. As formulações foram estudadas quanto a sua estabilidade frente à radiação UVA, durante um período de exposição de 15 dias. As suspensões apresentaram tamanhos de partícula inferiores a 500 nm e taxas de encapsulação próximas a 90 % para a QUE e MCO. Este teste permitiu verificar que as nanocápsulas são sistemas capazes de proteger parcialmente as substâncias nela associadas contra a fotodegradação. As formulações preparadas com Span 60<sup>®</sup> foram mais efetivas na proteção contra a fotodegradação tanto da QUE, quanto do MCO, no entanto, evidenciou-se que a presença destas duas substâncias contribuiu para a proteção de ambas. Os testes para avaliação do potencial antioxidante das nanocápsulas contendo QUE e MCO foram conduzidos em células de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* durante um período de 35 h, com coletas em tempos específicos. Os resultados demonstraram que a presença das suspensões de nanocápsulas, contendo ambas as substâncias associadas, foi capaz de minimizar a mortalidade das células de levedura em presença do agente estressor. Além disso, foi possível perceber que este efeito de proteção se manteve ao final das 35 h comprovando a eficiência destes sistemas na liberação lenta de substâncias. As suspensões de nanocápsulas foram associadas a um gel hidrofílico e, após, foram aplicadas sobre a superfície cutânea para avaliação dos perfis de liberação do MCO após 3 e 6 h de incubação. Testes *in vitro* utilizando células de Franz, foram realizados para avaliar a liberação do MCO a partir das nanocápsulas. Para este experimento utilizou-se acetoneitrila como solvente, devido sua capacidade de solubilizar o polímero permitindo estimar a quantidade total de MCO em cada camada da pele. Com a finalidade de avaliar a quantidade de MCO liberado por difusão das nanocápsulas nas diferentes camadas da pele com o passar do tempo (MCO livre) utilizou-se o miristato de isopropila como solvente, pois o mesmo não é capaz de solubilizar o polímero, mas solubiliza o MCO. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o MCO permanece acumulado nas camadas mais superficiais da pele, sendo a epiderme a principal barreira para a passagem deste filtro pela pele. Após aplicação e transcorrido os tempos de estudo não foi possível recuperar MCO na derme e também no líquido receptor. A utilização do miristato de isopropila permitiu demonstrar que a liberação do MCO foi diferente dependendo das camadas da pele. Setenta e oito por cento de MCO foi liberado após 6 h na superfície cutânea e cerca de 40 % no estrato córneo, sendo que este percentual diminuiu em torno de 20 % nas camadas mais profundas da pele. Os resultados permitiram inferir que a liberação do MCO difere entre a superfície da pele e as demais camadas.

**Palavras-chaves:** quercetina, metoxicinamato de octila, nanocápsulas, antioxidantes, *Saccharomyces cerevisiae*, miristato de isopropila e penetração cutânea.

## ABSTRACT

This work has been based on the development and characterization of nanocapsules containing quercetin (QUE) and octyl metoxycinnamate (OMC), used as oil core of these systems. The nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of pre-formed polymer. The suspensions were characterized in terms of QUE and OMC contents and associated drug (QUE) within the nanoparticles, morphology, pH, mean size and polydispersity, as well as the zeta potentials. The influence of the type of surfactant (Span 60<sup>®</sup> e Epikuron 170<sup>®</sup>) on the physicochemical characteristics of suspensions was evaluated. The stability of the different formulations was evaluated under UVA radiation for 15 days. The aim of this test was to evaluate the nanocapsules ability in protecting the loaded substances against the photodegradation. The nanocapsules presented particle sizes lower than 500 nm, negative zeta potential values and QUE and OMC total contents about 90 %. The encapsulation efficiencies for QUE were 100 %. After 15 days, the formulations prepared with Span 60<sup>®</sup> and QUE/OMC showed more than 80 % of QUE content. The formulation prepared exclusively with QUE showed a content of QUE around 50 %. The totality of OMC degraded in solution, while OMC remained around 15 % stable in the nanocapsules prepared with Span 60<sup>®</sup> and QUE. After UVA exposure, QUE and OMC concentrations remained higher for the nanocapsules than for the solutions. Furthermore, the nanoencapsulation of QUE and OMC, using Span 60<sup>®</sup> improved their photostability. The antioxidant properties of the QUE-loaded nanocapsule suspensions were also evaluated and for this test *Saccharomyces cerevisiae* cells were used during 35 h of incubation. QUE and OMC nanocapsule suspensions showed an important *in vivo* antioxidant activity against the damages caused by a stressor agent that lasted for 35 h. The longer bioactivity of those nanocapsules was probably related to the slowly release of the QUE. The nanocapsule suspensions were incorporated in gel or emulsion (O/W) formulations. OMC release profiles from nanocapsules were evaluated for 3 and 6 h. *In vitro* measurements using static Franz diffusion cells were performed to examine the release behavior of OMC from the nanocapsules. It was used acetonitrile as solvent because it is capable to dissolve the polymer shell of nanocapsules and the sunscreen. This method gave an estimation of the total amount of OMC (encapsulated and released) in each skin layer. A new skin treatment was used, which preserved the polymer shell of the particles. Isopropyl myristate was chosen as solvent because it is not able to solubilize the polymer but it is capable to solubilize OMC released from nanocapsules. These results demonstrated that the OMC accumulated in the upper skin layers. The viable epidermis seemed to be the limiting barrier for the progression of nanocapsules penetration in the skin. Independently of the skin treatment, the same amount of OMC was recovered in the dermis and no OMC was detected in the receptor compartment indicating the absence of nanocapsules in both compartments. Moreover, the use of isopropyl miristate showed that the OMC release was different depending on the skin level. Whereas 78 % of OMC was released after 6 h at the surface of the skin and around 40 % in the stratum corneum, this percentage decreased to 20 % in the deeper skin layers. It can be thus concluded that the OMC release profile is different between the surface and the viable skin.

**Key words:** quercetin, octyl metoxycinnamate, nanocapsules, antioxidants, *Saccharomyces cerevisiae*, isopropyl myristate and skin penetration.



# *INTRODUÇÃO*



Recentemente, o aumento no número de casos de câncer de pele detectados pelos órgãos de saúde, em decorrência da diminuição da camada de ozônio e também por uma exposição exagerada de algumas pessoas ao sol, gerou um crescimento nas pesquisas desta área, bem como uma maior preocupação da população com os riscos da exposição solar. Além do câncer, a radiação solar é capaz de causar queimaduras, fotossensibilidade induzida, depleção das células de Langerhans, sardas, talangectasias, elastose e queratose solar (Wissing e Muller, 2001).

A exposição solar também origina o envelhecimento cutâneo pela formação de radicais livres, substâncias extremamente tóxicas, formadas a partir do oxigênio que, no entanto, também são úteis em alguns processos fisiológicos, como a fagocitose. Os antioxidantes são eficazes em bloquear as espécies reativas de oxigênio (ERO) impedindo o estresse oxidativo e a conseqüente destruição tissular (Póvoa, 1995; Tapiero, 2002). Atualmente, substâncias extraídas de plantas e frutas capazes de atuar sobre estes radicais livres, vêm sendo amplamente estudadas, especialmente os flavonóides. Os flavonóides compreendem um grupo de compostos fenólicos que possuem propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorais, entre outras (Trueba e Sánchez, 2001).

Nas duas últimas décadas iniciou-se uma busca intensa por estratégias que garantissem maior proteção contra as radiações solares, através do uso de filtros solares químicos e físicos, substâncias capazes de absorver ou refletir a radiação solar, respectivamente.

Os filtros químicos, capazes de absorver a radiação solar, apresentam sérios problemas de fotoalergenicidade e irritação da pele, além disso, são fotoinstáveis conduzindo à formação de produtos inativos ou muitas vezes tóxicos (radicais livres) quando em contato com a radiação solar (Hanson *et al.*, 2006). O problema da toxicidade e instabilidade destas substâncias fez com que pesquisas fossem desenvolvidas com a finalidade de reduzir, ou até mesmo eliminar estes prejuízos.

O dióxido de titânio e o óxido de zinco, filtros físicos, capazes de refletir a radiação solar têm sido estudados por suas propriedades citoprotetoras em

análises realizadas com células cutâneas. Um exemplo disto foi a pesquisa desenvolvida por Hayashi e colaboradores em 2001 onde o efeito citoprotetor do óxido de zinco frente à radiação UVB em uma cultura de queratinócitos foi avaliado. Este estudo avaliou a espessura de aplicação mais efetiva frente à radiação UVB e a inibição de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelular, responsáveis pela mortalidade ou ruptura da membrana das células, de uma emulsão óleo/água contendo este filtro físico. Os resultados demonstraram que uma espessura de 40 µm desta emulsão é capaz de proteger os queratinócitos da radiação UVB. Paralelamente, comparou-se a capacidade de inibição do rompimento da membrana celular entre uma formulação com óxido de zinco e outra com o ácido ascórbico. Estas substâncias apresentam propriedades de citoproteção e efeito antioxidante, respectivamente. Em relação à capacidade de inibição das ERO foi demonstrado que a formulação com óxido de zinco por refletir cerca de 80-83 % da radiação, permite o espalhamento de parte da radiação e provoca a geração de radicais livres o que não é observado com o ácido ascórbico. Desta forma, o melhor efeito frente à radiação UVB foi alcançado através da associação destes componentes na mesma formulação.

Recentemente, foram propostas formulações que têm por finalidade a redução dos efeitos colaterais de muitas substâncias e ao mesmo tempo o aumento da sua eficácia após administração por diversas vias, incluindo a cutânea. Algumas destas novas formas farmacêuticas são os sistemas dispersos, que incluem os lipossomas, microesferas, microcápsulas, nanoesferas e nanocápsulas (Ammoury *et al.*, 1990; Ammoury *et al.*, 1993; Fawaz *et al.*, 1996). Para exemplificar esta nova abordagem pode-se citar, um estudo desenvolvido com nanopartículas lipídicas sólidas que demonstrou que estas estruturas por si só são capazes de diminuir os efeitos da radiação solar por reflexão. Quando associadas a um filtro químico observou-se um efeito sinérgico desta preparação, possibilitando a redução na concentração do filtro químico na formulação. Evidenciou-se também que as nanopartículas lipídicas sólidas são capazes de formar um filme sobre a pele, aumentando dessa forma, a adesividade das formulações e diminuindo a perda de água transdérmica (Wissing e Muller, 2001).

As nanocápsulas são estruturas poliméricas com um diâmetro variando entre 100 e 500 nm, constituídas por uma cavidade central oleosa, envolvida por uma parede polimérica. Teoricamente, a substância a ser encapsulada encontra-se solubilizada e/ou adsorvida na fase oleosa das nanocápsulas, geralmente distribuída entre núcleo e interface (Fessi *et al.*, 1988; Magenheim e Benita, 1991). São descritos na literatura vários métodos para a preparação de nanocápsulas, entre os quais destaca-se o método baseado na precipitação de polímeros biodegradáveis pré-formados (nanoprecipitação). Este método tem a vantagem de não usar monômeros, evitando a presença de resíduos dos mesmos na formulação. A presença dos monômeros residuais constitui uma desvantagem dos métodos que usam o processo de polimerização interfacial de alquilcianoacrilatos (Fessi *et al.*, 1989).

A estabilidade físico-química é um fator importante que deve ser levado em consideração quando se aborda o tema nanocápsulas, visto que quanto maior a estabilidade das suspensões coloidais, maior o potencial de aplicabilidade no mercado cosmético e farmacêutico. Por tratarem-se de formas líquidas, as suspensões coloidais podem apresentar sedimentação ou agregação de partículas, além da degradação química dos componentes da formulação (Magenheim e Benita, 1991). Apesar desta limitação, a literatura registra um número limitado de trabalhos referentes à avaliação da estabilidade físico-química das suspensões coloidais.

As substâncias destinadas à proteção solar são aplicadas na pele e anexos cutâneos, assim, o conhecimento das características da pele faz-se necessário. O estrato córneo é a camada mais externa da pele e oferece a principal resistência para a penetração de compostos aplicados topicamente. Várias substâncias químicas têm sido estudadas e empregadas com o propósito de aumentar a permeação percutânea, como por exemplo: o dimetilsulfóxido, a dimetilformamida, os agentes tensoativos, os dissolventes (propilenoglicóis, álcoois, etc.), os ácidos graxos, entre outros (Asbill e Machniack, 2000; Santoyo e Ygartua, 2000; Turunen e Urtii, 1992). Entretanto, paralelamente à função destes promotores em aumentar

a penetração cutânea de algumas substâncias, existe o inconveniente da irritação causada à pele (Benthey, 1994).

O desenvolvimento tecnológico de novas formas farmacêuticas tem sido a estratégia mais promissora para aumentar, de forma controlada, a penetração de fármacos através da pele. Segundo Alvarez-Román (2004 a, b) as nanocápsulas apresentam características vantajosas para a aplicação tópica, dentre elas destaca-se, o pequeno tamanho da partícula, o qual assegura um contato íntimo com o estrato córneo, aumentando conseqüentemente à quantidade de agente encapsulado capaz de penetrar na pele viável.

Com base nas pesquisas relatadas na literatura que indicam a eficácia e a adequabilidade da via cutânea como alternativa terapêutica para administração de substâncias (Bernareggi, 1998; Foldvari, 2000; Pandey *et al.*, 1992), reveste-se de importância à realização de estudos que avaliem as potencialidades das nanocápsulas como sistemas reservatórios para a associação de substâncias, tais como filtros químicos e antioxidantes objetivando a preparação de formulações fotoprotetoras.

## *OBJETIVOS*



## Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e a caracterização de suspensões aquosas de nanopartículas e a incorporação destes sistemas nanocarreadores em formas farmacêuticas semi-sólidas, bem como a avaliação do perfil de penetração do sistema formado.

## Objetivos Específicos

- Obtenção de suspensões de nanocápsulas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) contendo o flavonóide quercetina (1 mg/mL) e o filtro químico (UVB) metoxicinamato de octila (32,80 mg/mL), com diferentes composições através do método de nanoprecipitação;
- Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila e quercetina;
- Avaliação da estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo e não contendo quercetina e metoxicinamato de octila, durante 15 dias em exposição à radiação UV;
- Avaliação do potencial antioxidante das suspensões de nanocápsulas poliméricas, contendo quercetina e metoxicinamato de octila, frente ao peróxido de hidrogênio, utilizando um sistema biológico com células de levedura (*Saccharomices cerevisiae*);
- Desenvolvimento de formulações semi-sólidas de uso tópico, para incorporação das suspensões de nanocápsulas;
- Avaliação dos parâmetros de liberação, penetração transcutânea e retenção cutânea do filtro químico associado ao sistema carreador, através da utilização de Células de Franz e da técnica de “tape stripping”.

*CAPÍTULO I*  
*REVISÃO DE LITERATURA*

---



## 1.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio

Os radicais livres são definidos como moléculas ou átomos que possuem um elétron desemparelhado na última camada, ocupando um único orbital atômico ou molecular (Halliwell e Aruoma, 1991; Halliwell e Gutteridge, 2000).

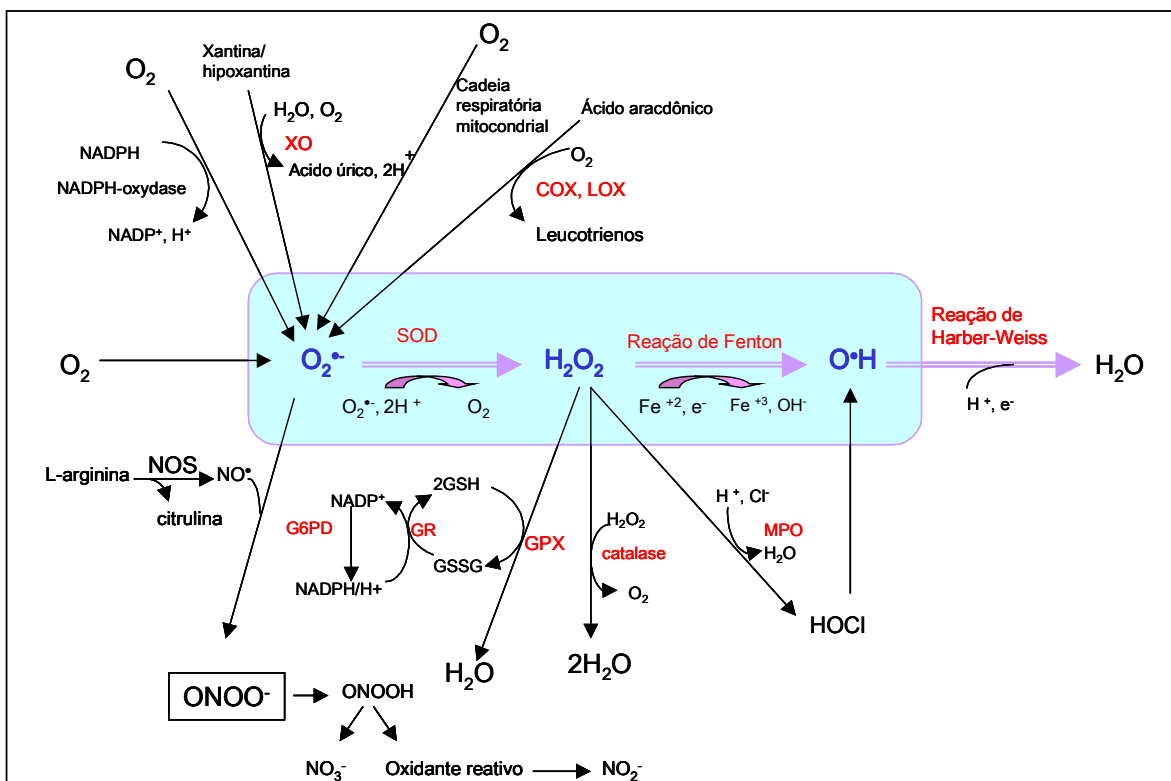
A presença de um elétron desemparelhado confere a estas espécies duas propriedades o paramagnetismo, uma vez que produzem facilmente um campo magnético; e a alta reatividade, relacionada com o tempo de meia vida da reação que é de microssegundos (Fridovich, 1998). O elétron desemparelhado é convencionalmente representado por um ponto sobrescrito (R<sup>•</sup>) à direita da estrutura (Aruoma, 1994; Slater, 1984). Os radicais livres podem ser positiva e negativamente carregados, ou eletricamente neutros (Aust *et al.*, 1993; Halliwell e Gutteridge, 2000; Slater, 1984).

Os radicais livres resultam de processos de fissão hemolítica ou de reações de transferência de elétrons. Em geral, são formados por absorção da radiação (ultravioleta ou visível), por reações redox (reações de transferência de elétrons não-enzimáticas e reações catalisadas por metais) ou por processos de catálise enzimática (Slater, 1984). Várias substâncias podem ser definidas como radicais livres, porém o maior interesse é pelas espécies reativas do oxigênio (ERO) (Felippe Jr. e Percário, 1991; Halliwell e Aruoma, 1991; Kourie, 1998). O termo ERO inclui não somente radicais livres, mas também espécies não radicalares derivadas do oxigênio, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio, que leva a formação do radical hidroxila (Adegoke *et al.*, 1998; Halliwell e Chirico, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1984; Simon *et al.*, 1981).

Tomando por exemplo as células cerebrais, e comparado-as com as demais, estas são mais vulneráveis ao stress oxidativo (utilizam 20% do O<sub>2</sub> consumido pelo corpo), a produção de ERO é controlada por enzimas endógenas como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e a catalase e também por sistemas não enzimáticos como a glutathiona, ácido úrico e vitaminas C e E. A SOD atua contra o estresse oxidativo, catalisando a reação de dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio. A GPX e a catalase protegem as

células dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio, catalisando sua decomposição sem a geração de radicais livres (Dringen, 2000; Lipton, 1999).

As ERO e outros radicais livres podem ser produzidos por fontes exógenas ou endógenas. As fontes exógenas incluem a radiação, o fumo, o estresse, alguns medicamentos e outras substâncias (xenobióticos, compostos azo aromáticos e biperidil) (Halliwell e Gutteridge, 1986). No organismo, as ERO são produzidas durante a fagocitose e como consequência do metabolismo celular normal (Diaz *et al.*, 1998). A redução do oxigênio por um, dois ou três elétrons gera o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, respectivamente (Figura 1).



\*GSH: glutatona reduzida, GR: glutatona redutase, GPX: glutatona peroxidase, GSSG: glutatona oxidada, HOCl: ácido hipocloroso, LOX: lipooxigenase, MPO: mieloperoxidase, NADPH: nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato, NO: óxido nítrico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: nitrato, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: nitrito, NOS: NO sintase; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: ânion superóxido, O•H: radical hidroxila, ONOO<sup>-</sup>: ânion peroxinitrito, ONOOH: ácido peroxinitroso, SOD: superóxido dismutase, XO: xantina Oxidase.

Figura 1. Diferentes radicais originados pela redução do oxigênio (adaptado de Margail *et al.*, 2005).

O radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) é formado no organismo principalmente através da cadeia de transporte de elétrons ou por ação de células fagocitárias (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eusínófilos) para defesa bactericida (Forman

e Thomas, 1986). Seu envolvimento em sistemas biológicos está relacionado com a descoberta da superóxido dismutase (SOD), enzima que catalisa a dismutação de  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$  (Babior, 1997). Nos organismos biológicos o  $O_2^{\cdot -}$  participa na reação de Haber-Weiss (1) gerando oxigênio e ferro reduzido, o qual catalisa a reação de Fenton (2) formando o radical hidroxila (Babior, 1997; Van Lente, 1993).



Acredita-se que a membrana mitocondrial interna é impermeável à cadeia transportadora de elétrons, considerada a maior fonte de  $O_2^{\cdot -}$  (Boveris, 1998). O  $O_2^{\cdot -}$  é dismutado pela SOD para  $H_2O_2$  que atravessa membranas com facilidade por ser uma molécula neutra (Fridovich, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2000). Desta forma, o principal determinante da toxicidade do superóxido às células é a disponibilidade e a localização de íons metálicos que possam catalisar a formação de radical hidroxila (Felippe Jr. e Percário, 1991). A exposição das células ao radical superóxido gera danos aos lipídios (Halliwell e Chirico, 1993), as proteínas (Berlett e Stadtman, 1997) e ao DNA (Imlay e Linn, 1998),

O radical hidroxila ( $O^{\cdot}H$ ), extremamente lesivo para as células, é cerca de  $10^{14}$  vezes mais reativo do que o íon hidroxila (Darr e Pinel., 1997; Felippe Jr. e Percário, 1991). A capacidade deste radical em lesar as células é superior às demais ERO já que o organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra o radical hidroxila (Halliwell e Gutteridge, 2000). A  $OH^{\cdot}$  é produzida pela reação de Haber-Weiss/ Fenton (1, 2) (Fridovich, 1998) e após a formação do  $OH^{\cdot}$ , este reage imediatamente com moléculas biológicas (carboidratos, aminoácidos, fosfolipídios e bases do DNA), produzindo radicais secundários de reatividade variável (Halliwell e Gutteridge, 1984).

O oxigênio singlete ( $O_2^{\cdot}$ ) é gerado a partir do oxigênio molecular por ganho de energia. Esta espécie pode ser formada em várias reações radicalares e iniciar

outras delas. O oxigênio singlete difere do  $O_2$  no estado molecular por não apresentar restrições na transferência de elétrons, sendo altamente reativo (Beckman e Ames, 1998; Darr e Pinnel, 1997; Halliwell e Gutteridge, 2000). O  $O_2^{\cdot}$  causa danos às proteínas devido à oxidação de grupos essenciais de aminoácidos, principalmente do triptofano, metionina, histidina e resíduos de cisteína (Halliwell e Gutteridge, 2000).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é principalmente formado via superóxido, na mitocôndria (Halliwell e Gutteridge, 2000), podendo atravessar a membrana celular, e, uma vez no interior da célula, reagir com o  $Fe^{2+}$ , e possivelmente com o  $Cu^{1+}$ , para formar radicais hidroxila através da reação de Haber-Weiss /Fenton (1, 2), já descrita (Halliwell e Gutteridge, 1986).

### 1.1.1 Agentes estressores celulares

Vários agentes químicos e físicos podem gerar ERO, como por exemplo, o fumo, a radiação, o estresse entre outros. No entanto, com o objetivo de estudar os efeitos oxidantes e antioxidantes em células eucarióticas e procarióticas, alguns compostos capazes de gerar ERO vêm sendo utilizados (Henriques *et al.*, 2001; Lopes, 2000; Maris, 1999). Entre eles estão a apomorfina, o  $H_2O_2$  e o paraquat (1,1 dimetil 4,4' bipyridine).

O alcalóide isoquinolínico apomorfina (5, 6, 6a, 7- tetrahydro-6 metil 4-H dibenzo quinolina-10,11-diol) é capaz de lesar as células por formação de ERO estáveis, como as quinonas e semiquinonas e radical superóxido (Blum *et al.*, 2000; Lai e Yu, 1997). Já os tratamentos com peróxido de hidrogênio provocam lesão celular devido à produção do radical livre hidroxila, que é extremamente reativo (Halliwell e Gutteridge, 1984; Imlay e Linn, 1988; Simon *et al.*, 1981).

Os danos causados pelo herbicida paraquat *in vivo* e em células isoladas dependem da reação deste com o  $O_2$ . A redução do paraquat pela presença de NADPH gera o cátion radical paraquat ( $PQ^{\cdot+}$ ) que estimula a peroxidação lipídica. O radical formado pode se complexar com o ferro, reduzindo-o, ou reagir com o  $O_2$  para formar  $O_2^{\cdot-}$  (Bulkley, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1986).

### 1.1.2 Danos causados pelas ERO

Embora as ERO desempenhem um papel fundamental no organismo, como por exemplo, na fagocitose, o interesse maior está no estudo dos seus efeitos nocivos. Quando há um desequilíbrio entre as ERO e as defesas antioxidantes do organismo, pode ocorrer o ataque das ERO aos diferentes componentes biológicos gerando alterações que podem ocorrer em diferentes tecidos, desde sistema nervoso, sistema cardíaco até a pele (Rustin *et al.*, 1999). Entre os processos patológicos mais comuns envolvendo estes sistemas estão: câncer, processos isquêmicos, demência senil, diabetes, enfermidades pulmonares e pancreáticas, cirrose, esclerose múltipla, artrite reumatóide, arterosclerose, doenças cardiovasculares e enfermidades do sistema nervoso central (Saija *et al.*, 1995).

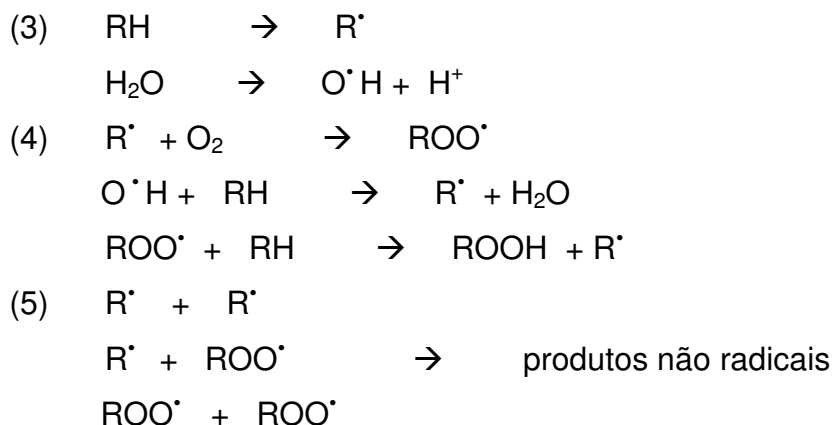
As ERO são capazes de oxidar proteínas celulares, ácidos nucléicos e lipídeos. Estas espécies contribuem para o envelhecimento celular, mutagênese, carcinogênese, doenças coronarianas, desestabilização de membranas, danos ao DNA e oxidação da proteína de baixa densidade (LDL) (Kawanishi *et al.*, 2001; Takabe *et al.*, 2001). Além disso, outros radicais como o peroxinitrito (espécie reativa de nitrogênio) podem contribuir para a geração de doenças cardiovasculares, por indução da oxidação do LDL (Heim *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 1995).

Na pele as ERO formadas através da radiação UV e altas concentrações de O<sub>2</sub>, ocupam um papel importante na etiologia das doenças cutâneas (carcinogênese, envelhecimento cutâneo e danos as células da epiderme (Lopez-Torres *et al.*, 1998).

Devido à alta reatividade e a capacidade de aceitar elétrons, as ERO modificam a estrutura e/ou função das moléculas alvo (lipídios, carboidratos, ácidos nucléicos e proteínas) (Beckman e Ames, 1998; Halliwell *et al.*, 1995). Os ácidos graxos poliinsaturados são mais sensíveis à oxidação devido o maior número de duplas ligações (Machlin, 1990). A peroxidação lipídica, dano causado

pelos ERO aos lipídios poliinsaturados, é o mais estudado e conhecido (Frankel, 1980; Halliwell e Chirico, 1993) entre os demais.

Na presença de ERO os lipídios insaturados reagem com o oxigênio para produzir radicais alquila e peroxila que se propagam por uma cadeia de radicais livres e formam hidroperóxidos como produtos primários. Esse processo é comumente descrito em termos de (3) iniciação, (4) propagação e (5) terminação (Adegoke *et al.*, 1998; Fridovich, 1998; Ingold *et al.*, 1993) conforme mostrado abaixo:



A etapa de iniciação ocorre na presença de metal catalisador, altas temperaturas, exposição à luz e oxigênio ou pela ação de hidroperóxidos. A peroxidação lipídica resulta em uma mistura complexa de hidroperóxidos e produtos secundários de oxidação, incluindo peróxidos cíclicos. Estes produtos podem interagir com proteínas, membranas e enzimas, resultando em efeitos indesejáveis para a célula (Slater, 1984).

Em sistemas biológicos a peroxidação lipídica ocorre principalmente em membranas, onde o conteúdo de ácidos graxos insaturados é alto (Adegoke *et al.*, 1998). Um dos efeitos primários da peroxidação lipídica é a modificação da estrutura e diminuição da fluidez da membrana celular resultando na alteração das suas propriedades fisiológicas (Beckman e Ames, 1998) e levando à morte celular (Adegoke *et al.*, 1998).

### 1.1.3. Avaliação do potencial antioxidante

As técnicas para avaliação do potencial antioxidante baseiam-se, fundamentalmente na detecção de produtos ou alterações fisiológicas provocadas pelo estresse oxidativo. Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para obter uma medição, quali ou quantitativa, da capacidade antioxidante de substâncias, tanto através de testes químicos (sem a utilização de células) ou testes biológicos (culturas celulares).

No entanto, tendo em vista que os antioxidantes assumem papel importante na medicina preventiva, e algumas vezes, também na curativa, é importante que as informações sejam obtidas a partir de sistemas biológicos, os mais próximos possíveis do organismo humano.

Neste contexto, ensaios microbianos *in vitro* são adequados na triagem de vários produtos, sendo testes rápidos, sensíveis, econômicos, reprodutíveis que apresentam resultados confiáveis na identificação da atividade biológica. Estes ensaios são utilizados e recomendados por conceituadas entidades governamentais e órgãos de pesquisa dos Estados Unidos, Canadá e vários países da Europa (Marrot *et al.*, 2001; Rabello-Gay *et al.*, 1991; Saffi *et al.*, 2006).

O fato de a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ser um dos microrganismos mais estudados do ponto de vista genético e metabólico, conduziu uma ampla utilização deste microrganismo em testes biológicos (Henriques *et al.*, 2001; Lopes, 2000; Maris, 1999). A capacidade que a levedura apresenta de crescer em condições aeróbicas e anaeróbicas permite, também, o estudo durante diferentes situações metabólicas. Desta forma, testes em células eucarióticas da levedura *S. cerevisiae*, assumem um importante papel na verificação da capacidade antioxidante e na determinação do possível mecanismo de ação dos produtos testados.

## 1.2 Flavonóides: ação antioxidante

A utilização de plantas para o tratamento de determinadas doenças permanece viva da antiguidade até os dias atuais. Conhecimentos populares, transmitidos de geração em geração hoje são pesquisados. Exemplos destas pesquisas são os estudos fitoquímicos realizados com a *Achyrocline satureioides* (marcela) que verificaram que os componentes majoritários do extrato etanólico desta planta são os flavonóides (quercetina) (De Souza, 2002), os quais são responsáveis pela atividade antiinflamatória e antioxidante observadas (Santos *et al.*, 1999; Simões *et al.*, 1988).

Os flavonóides compreendem o maior grupo de metabólitos secundários de plantas, contendo acima de 4.000 diferentes estruturas químicas. Constituem um grupo de compostos polifenólicos complexos que apresentam uma estrutura em comum, composta por dois anéis aromáticos e um grupo heterocíclico oxigenado (Figura 2) (Dijk *et al.*, 2000; Dugas *et al.*, 2000).

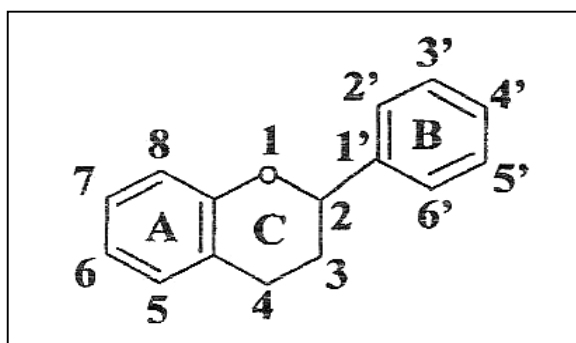


Figura 2. Estrutura geral dos flavonóides.

Atualmente, um número bastante expressivo de flavonóides foi identificado e, novas estruturas ainda são descobertas devido à possibilidade de associações com vários grupos funcionais. As diferenças dentro de cada grupo estão relacionadas com a variação no número e posição dos grupamentos hidroxila, modificações nos núcleos e grau de metilação e glicosilação (Dugas *et al.*, 2000; Filho *et al.*, 2001), que podem ocorrer na estrutura geral dos flavonóides, expressa na Figura 2. A família dos flavonóides encontra-se dividida em subgrupos que



incluem os flavonóis (quercetina, mericitina e rutina), flavanonas (hesperidina), antocianidinas (malvidina, cianidina e apigenidina), flavonas (crisina e apigenina) e flavanóis (catequina, epicalocatequina, epicatequina, entre outros) (Bors *et al.*, 1990; Dugas *et al.*, 2000).

Nas plantas, os flavonóides são capazes de protegê-las frente à radiação, patógenos e animais herbívoros (Harbone *et al.*, 2000). A quercetina (Figura 3) pode ser encontrada em diversos vegetais e frutas tais como, brócoli, uva (de preferência de casca escura), chá preto, cebola, maçã (especialmente na casca), azeitona, etc (Filho *et al.*, 2001). O consumo de quercetina, luteolina e mircetina em alguns países, chega a 25 mg/ dia sendo que mais de 60 %, dessa quantidade corresponde a quercetina advinda principalmente do chá preto (28 %) e da cebola (29 %) (Hertog *et al.*, 1993).

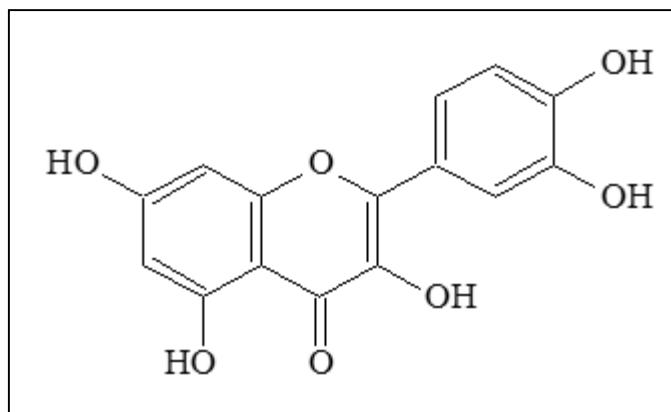


Figura 3. Estrutura química da quercetina.

A capacidade, dos flavonóides, em proteger as plantas da radiação UV, está relacionada com a absorção e acúmulo da luz na região do visível, nos seus tecidos (Harbone *et al.*, 2000). Um estudo realizado por Kootstra em 1994, demonstrou que a quercetina extraída da casca de maçã vermelha previniu a indução de danos ao DNA causado pelo acúmulo de radiações UVB. As ERO como o ânion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio são responsáveis pelos danos oxidativos induzidos pela radiação UV. Dessa forma, as ERO contribuem para patologias cutâneas como câncer de pele,

fotoenvelhecimento cutâneo e algumas desordens inflamatórias.

As ERO são intermediárias da redução parcial do oxigênio e possuem uma atividade química mais acentuada que o oxigênio molecular (Torel *et al.*, 1986), devido seu envolvimento na etiologia de muitas doenças, as ERO e as propriedades antioxidantes dos flavonóides começaram a ser estudadas paralelamente, pois uma vez verificado que os flavonóides protegem os constituintes alimentares dos danos oxidativos, estes poderiam também atuar na prevenção de doenças como câncer, doenças cardiovasculares e envelhecimento (Dijk *et al.*, 2000; Filho *et al.*, 2001).

Os flavonóides, de uma forma geral, vêm sendo amplamente estudados por apresentarem atividades antioxidantes que oferecem a estes compostos a capacidade de diminuir a incidência de doenças coronarianas e câncer. Além disso, são conhecidos e estudados por apresentarem propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, antivirais, antiulcerogênicas, antineoplásicas, antihipertensivas, entre outras (Guardia *et al.*, 2000).

As possibilidades terapêuticas apresentadas pelos flavonóides estão relacionadas com a capacidade que estas substâncias apresentam em transferir elétrons aos radicais livres, quelar metais, ativar enzimas antioxidantes, reduzir radicais alfa tocoferóis, inibir oxidases, proteger o DNA e sequestrar peroxinitrito (Hertog *et al.*, 1993; Ohshima *et al.*, 1998).

No que diz respeito ao mecanismo de ação dos flavonóides pode-se dizer que eles atuam de forma generalizada como seqüestradores de ERO e de nitrogênio além de quelarem cátions divalentes (Filho *et al.*, 2001). Devido a sua propriedade antioxidante, os flavonóides atualmente têm despertado grande interesse nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias.

Os flavonóides são capazes de inibir a atividade de algumas enzimas como a lipoxigenase, cicloxigenase, monoxigenase, xantina oxidase, succinoxidase mitocondrial, NADH oxidase, fosfolipase A2 e proteínas quinase. Provavelmente a inativação destas enzimas esteja relacionada com a atividade dos flavonóides sobre os radicais livres, gerados no sítio de ativação das mesmas (Cao *et al.*,

1997; Dugas *et al.*, 2000). Por outro lado, outras enzimas como a catalase e a superóxido dismutase são estimuladas na presença dos antioxidantes (Trueba e Sanchez, 2001). A quercetina desempenha um papel importante na prevenção e melhora de alguns processos destrutivos pela capacidade de seqüestrar radicais de oxigênio, proteger contra a peroxidação lipídica, concluir as reações radicalares, quelar íons metálicos e, além disso, bloquear enzimas como a cicloxygenase e a lipoxigenase em altas concentrações (Inal *et al.*, 2001).

Um estudo realizado em 2000 por Guardia e colaboradores avaliando a ação da hesperidina, rutina e quercetina como inibidores da inflamação crônica e aguda demonstrou a capacidade efetiva da quercetina em atuar na redução de edemas, nódulos e anquiloses.

Devido às conhecidas propriedades dos flavonóides de interação com membranas biológicas e suas conseqüências fisiológicas já demonstradas através da utilização de membranas planares artificiais, foi possível perceber que flavonóides glicosilados e agliconas, na presença de uma diferença de potencial são capazes de atravessar a membrana aumentando linearmente a condutividade específica da mesma com a sua concentração (Conjocarú *et al.*, 1978). Baseando-se neste princípio um estudo realizado por Djik e colaboradores em 2000 buscou maiores informações sobre a ligação dos flavonóides às membranas vesiculares e a eficiência e acoplamento dos dois grupos de flavonóides (flavonas e flavononas), utilizando para esta determinação o sistema de citocromo c e citocromo oxidase. A hidrofobicidade dos flavonóides foi estudada utilizando óleo de oliva como fase hidrofóbica e na fase hidrofílica foi colocado o flavonóide, oriundo de uma solução solução bifásica: óleo de oliva e água destilada. A mistura gerada foi tamponada (pH 5) e após a análise observou-se maior afinidade do flavonóide pelo óleo. Em alguns casos, o coeficiente de partição foi influenciado pelo pH devido a protonação do grupo hidroxila.

O teste de afinidade dos flavonóides por lipossomas de fosfatidilcolina (membranas artificiais) demonstrou que a quercetina e a morina foram capazes de capturar em maior proporção os radicais de DPH (difenilhexatrieno) com os quais a

membrana dos lipossomas foi carregada. Esta capacidade pode ser atribuída a configuração planar de sua estrutura e também aos seus coeficientes de partição.

Ao final dos testes foi evidenciado que a capacidade de acoplamento dos flavonóides é resultado da difusão da forma não carregada do flavonóide através da membrana, da dissociação dos grupos hidroxila ionizados e da repulsão das formas ionizadas em resposta a variação de potencial e protonação da molécula ionizada fora da membrana. A presença de uma hidroxila na posição 7 é importante no que se refere a questão de acoplamento, bem como a hidroxilação em 4' ou nas posições 3 e 4 no que se refere a boa hidrofobicidade e acoplamento (Djik *et al.*, 2000).

A membrana dos lisossomas é alvo de vários agentes que podem causar alterações em sua estrutura e, por conseqüência, provocarem algumas patologias. Assim, um estudo realizado por Dechemeux e colaboradores em 1992 avaliou a influência de flavonóides na proteção da membrana lisossomal contra problemas oxidativos, para tal, mitocôndrias de ratos foram colocadas em presença de radical livre gerando xantina pela xantina-oxidase que faz com que a atividade de N-acetilglicosaminidase fique aumentada, resultando a deterioração da membrana. A atividade dos flavonóides foi avaliada pela determinação da fração livre desta enzima. Para esta atividade foi possível perceber a importância da presença de duas hidroxilas na posição orto e uma na posição 3. A quercetina mostrou-se capaz de impedir a degradação da membrana dos lisossomas nestas condições.

Sabe-se que a oxidação iniciada por um radical livre em uma membrana celular lipídica pode conduzir a necrose celular. Os antioxidantes podem inibir a oxidação através da capacidade de doação de um H de um grupo OH, no entanto, a efetividade do antioxidante está relacionada com a sua incorporação nas células e a sua orientação em biomembranas. Um estudo sobre o mecanismo de atividade da quercetina, hesperidina, rutina e narigenina foi realizado por Saija e colaboradores em 1995. Neste trabalho foram utilizadas duas metodologias *in vitro* através das quais avaliou-se a capacidade dos flavonóides interagirem e de penetrarem na bicamada lipídica. Em relação à atividade antioxidante destes

flavonóides frente ao ferro, foi confirmada forte atividade para os 4 flavonóides.

Em relação a auto-oxidação da membrana cerebral de ratos, a rutina e a quercetina apresentaram-se mais eficazes que a hesperidina e a narigenina. Os resultados por DSC (*calorimetria diferencial exploratória*) demonstraram que a quercetina e a narigenina têm forte interação com a membrana. Dessa forma, pelos diferentes resultados obtidos, pode-se afirmar que a atividade antioxidante dos flavonóides depende de um conjunto de parâmetros, os quais incluem estrutura química e localização na membrana, especialmente para a quercetina, fator este que pode estar associado a sua estrutura planar.

Sabe-se que vários agentes externos quando em contato com o organismo podem produzir ERO, um exemplo disto é a radiação UV, ao entrar em contato com a pele, assim em decorrência dos danos causados pelas radiações solares, um estudo propôs a avaliação da atividade antioxidante da quercetina frente aos prejuízos causados pela radiação UVA na pele. A quercetina é um dos representantes dos compostos polifenólicos de plantas mais estudados, o que pode ser atribuído a sua alta capacidade antiradicalar que está relacionada a sua capacidade de bloquear radicais livres, inibir a peroxidação lipídica e quelar íons metálicos. Estas observações sugerem a efetividade da quercetina quando em formulações de uso tópico na prevenção de danos induzidos pela radiação ultravioleta (Bonina *et al.*, 1996; Fórmica *et al.*, 1995; Inal *et al.*, 2000).

Um estudo avaliando a capacidade de proteção da quercetina frente à formação de ERO foi o desenvolvido por Casagrande e colaboradores (2006). Nesta pesquisa, o efeito protetor da quercetina, associada a uma emulsão não-iônica foi verificado frente aos danos gerados pela radiação UVB. Os resultados mostraram que as formulações contendo quercetina aumentaram a inibição da mieloperoxidases, a depleção da glutathiona e a secreção/atividade das proteinases, indicando a possível utilização tópica desta substância para prevenção de danos fotooxidativos.

O potencial antioxidante da quercetina foi testado utilizando uma cultura de

células de retina de embriões de pintos após *stress* oxidativo induzido com o ascorbato/  $\text{Fe}^{+2}$ . Ao final do experimento o grupo de células tratadas com este flavonóide manteve a viabilidade celular (Areias *et al.*, 2001). A aplicação de antioxidantes na pele é uma estratégia para a proteção deste órgão, contra danos mediados pela radiação UV, tais como eritema e citotoxicidade (Bonina *et al.*, 1996), assim é aconselhável a adição de substâncias capazes de capturar ERO nos produtos destinados à proteção solar pois muitas das substâncias utilizadas na preparação dos protetores solares podem formar  $^1\text{O}_2$  (oxigênio singlete) e ERO em exposição ao sol, especialmente filtros químicos.

Com este objetivo, o extrato de *Culcitium reflexum* foi avaliado frente a sua capacidade antioxidante ao ser associado a um gel e testado em voluntários saudáveis. O gel contendo este extrato foi aplicado imediatamente após a exposição à radiação UVB. Utilizou-se como padrão para este teste um gel contendo alfa-tocoferol. O extrato antes de ser incorporado no gel foi avaliado quanto a sua ação antioxidante e apresentou resultados favoráveis, devido à presença de compostos fenólicos. Além disso, a análise qualitativa deste extrato demonstrou que os componentes majoritários são a rutina, quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, isorhametina-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, quercetina e “kämpferol”. A análise das formulações baseou-se na determinação da quantidade do eritema gerado após a exposição à radiação UVB, e em ambos (gel e extrato puro) os casos, houve inibição do eritema, sendo esta inibição superior a do controle utilizado (Aquino *et al.*, 2002).

Bonina e colaboradores (1996) desenvolveram um estudo para avaliar a aplicação dos flavonóides (quercetina, hesperidina e narigenina) na prevenção do *stress* fotooxidativo gerado na pele, após exposição à radiação UV ( $\lambda=254\text{nm}$ ). Para este estudo foram empregados lipossomas de fosfatidilcolina como modelo de membranas. Os resultados demonstraram a eficiência destes flavonóides em proteger a fosfatidilcolina da peroxidação induzida pela radiação UV, provavelmente pela capacidade de seqüestrar espécies reativas de oxigênio, sendo a quercetina o flavonóides mais efetivo. Devido o fato da radiação UV ter a capacidade de penetrar profundamente na pele, uma substância aplicada

topicamente só terá efeito de fotoproteção se também penetrar. Por isso, neste mesmo estudo avaliou-se a capacidade de permeação cutânea dos flavonóides testados. Para tal, os 3 flavonóides, foram previamente dissolvidos em acetona (4mg/mL) e após aplicados sobre a pele (humana) sendo mantidos em incubação por 24 horas. Todos flavonóides foram capazes de penetrar na pele, no entanto, a hesperidina e narigenina, apresentaram maior penetração sugerindo então, que estes flavonóides, ofereçam maior proteção à pele.

Vários são os efeitos benéficos relacionados ao uso dos flavonóides, porém alguns destes têm demonstrado um efeito mutagênico em teste realizados “*in vitro* e *in vivo*”, que se deve ao efeito pró-oxidante que alguns flavonóides possuem quando, por exemplo, na presença elevada de metais de transição como o ferro (Cao *et al.*, 1997; Filho *et al.*, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2000; Moure *et al.*, 2001).

O efeito pró-oxidante de alguns flavonóides está diretamente relacionado com o número de hidroxilas presentes na sua estrutura. A proporção de geração de radicais hidroxila aumenta quando na estrutura dos flavonóides há um número superior a 2 hidroxilas e quando as mesmas estão situadas no anel B (Figura 2). Desta forma, a glicosilação e metilação de grupos hidroxila surge como alternativa para atenuar o efeito pró-oxidante de alguns flavonóides (Cao *et al.*, 1997).

Ohshima e colaboradores em 1998 estudaram a capacidade antioxidante de 18 flavonóides em relação à viabilidade dos mesmos protegerem o DNA de danos induzidos pelo óxido nítrico, peroxinitrito e ânion nitroxila. Ao final dos testes foi possível constatar que os flavonóides que contém 3 grupos hidroxilas na posição orto no anel B ou A, induzem a uma leve quebra de DNA na presença de óxido nítrico. Este efeito pró-oxidante observado para certos flavonóides na presença de óxido nítrico ocorre devido à reatividade das espécies como peroxinitrito e nitroxi que são formadas pela reação de óxido nítrico e os derivados de semiquinona.

### 1.3 Fotoproteção

Os filtros solares têm seu uso relatado no cenário mundial a partir de 1928, quando foi lançada nos Estados Unidos uma emulsão contendo dois filtros solares químicos, o salicilato de benzila e o cinamato de benzila (Patini, 1988). Durante a II Guerra Mundial o exército americano fez uso de vários produtos de natureza física e química, o que acabou resultando em uma relação de produtos aprovados e suas concentrações de uso, entre estas substâncias destacam-se: ácido p-aminobenzóico PABA (3 %), salicilato de etilhexila (5 %), salicilato de homometila (8 %) e salicilato de dipropilenoglicol (4 %) (Shaaf, 1997).

A radiação eletromagnética que incide sobre a terra varia de raios cósmicos, raios gama e raios X ionizantes com pequeno comprimento de onda, até as radiações ultravioleta (290-400 nm), visível (400-760 nm) e infravermelho (acima de 1800 nm), as quais possuem comprimentos de onda maiores. As radiações ultravioletas dividem-se em UVA, UVB e UVC. As radiações UVA (320-400 nm) e UVB (290 a 320 nm), não são absorvidas pela camada de ozônio e, dessa forma, são capazes de alcançar o solo. A radiação UVB é capaz de ser absorvida pelo estrato córneo e apenas 10 % da radiação incidente chega até a derme. Esta radiação é importante na síntese de vitamina D3, no entanto, a exposição excessiva, que ultrapassa a dose eritematosa mínima (DEM-dose limiar de radiação UVB para causar eritema) pode ser maléfica. A radiação UVA é capaz de penetrar na epiderme e chegar até a derme (Gawkrödger, 2002; Pathak, 1997; Schulz *et al.*, 2002).

As formulações contendo filtros solares são importantes para proteger a pele dos danos causados pela radiação solar, principalmente no que se refere aos eritemas, envelhecimento precoce e câncer, problemas estes que têm aumentado significativamente em várias partes do mundo (Gawkrödger, 2002).

O envelhecimento cutâneo é induzido por uma prolongada exposição solar (UVA, UVB e infravermelho) e microscopicamente, durante o processo de envelhecimento cutâneo precoce começa-se a observar um maior espessamento da epiderme, alta proliferação celular e maior dilatação dos vasos na derme



(Kligman e Kligman, 1997). A agravção do fotoenvelhecimento está relacionada com o crescimento da população idosa e ao aumento de exposiçāo média individual à radiaçāo (Gawkrödger, 2002).

Os problemas relacionados ao cāncer de pele podem ser explicados pelo fato da radiaçāo solar ser capaz de induzir uma supressāo imune no local onde ela incide. A transformaçāo de células normais em malignas ocorre provavelmente da iniciaçāo de mutaçāo no DNA provocada pela radiaçāo UV. As radiaçōes UVA e UVB podem induzir a formaçāo de um dímero de timina o qual pode ser um iniciador no processo de alteraçāo celular (Lowe *et al.*, 1997).

Os filtros solares dividem-se em químicos e físicos (Mestres *et al.*, 1997), e atualmente UVC e infravermelho. Os filtros químicos sāo geralmente substāncias aromáticas conjugadas que possuem um grupo doador de elétrons nas posiçōes orto ou para e um grupo aceptor de elétrons. A radiaçāo UV é capaz de provocar o deslocamento dos elétrons, causando uma excitaçāo na molécula para um estado de maior energia, e ao voltar ao estado fundamental esta energia é liberada. Os filtros químicos podem produzir radicais livres em resposta as radiaçōes UV, e ao mesmo tempo devem absorvê-las antes que alcancem tecidos cutāneos viáveis. Para que isto seja possível faz-se necessária uma alta concentraçāo destas substāncias no estrato córneo por um elevado período de tempo (Caswell, 2000).

Os filtros físicos, representados principalmente pelo dióxido de titânio e óxido de zinco, sāo responsáveis por refletir e espalhar a radiaçāo emitida a partir dos diferentes comprimentos de onda (Wolf *et al.*, 2001). Os filtros físicos possuem uma capacidade reconhecida em bloquear as radiaçōes solares, no entanto, por serem excessivamente opacos, nāo têm uma boa aceitaçāo pelo usuário. Atualmente, sāo utilizados filtros físicos micronizados que sāo uma excelente opçāo para estas formulaçōes, pelo fato de nāo refletirem no espectro visível. Esta característica confere maior transparência ao produto final e de certa forma, maior aceitabilidade. Além disso, o dióxido de titânio micronizado é quimicamente estável evitando alguns problemas como dermatite de contato e fotoalergenicidade (Lowe *et al.*, 1997).

Com a finalidade de avaliar a efetividade dos produtos destinados a proteção solar faz-se necessária à determinação do fator de proteção solar (FPS) que pode ser conceituado como a capacidade de uma pessoa desenvolver eritema com a utilização de um filtro solar, relacionado com a capacidade de uma pessoa desenvolver um eritema sem a utilização de um filtro solar. A prioridade no desenvolvimento de formulações destinadas à proteção solar é alcançar um elevado valor de FPS com a menor concentração de filtros químicos e físicos, principalmente químicos, devido ao elevado grau de irritação que estes produtos proporcionam (Diffey, 2001; Schulz *et al.*, 2002).

O FDA estabeleceu recentemente um valor de FPS de 30 para os produtos destinados à proteção solar. Esta medida foi tomada uma vez que os produtos com FPS= 25 são capazes de proteger cerca de 96 % em relação às radiações, enquanto produtos com FPS= 50 em termos percentuais, protegem 98 %. Este aumento de 2 % de proteção não é suficiente em relação ao grau de irritação que o produto contendo FPS= 50 proporciona (Diffey, 2001), uma vez que para aumentar o FPS há um grande aumento da concentração dos filtros químicos.

Além do FPS outro parâmetro que também deve ser avaliado em formulações destinadas à proteção solar é a capacidade destas não serem facilmente removidas da pele por contato com a água, uma vez que são formulações destinadas ao uso em locais como praia e piscina. Além disso, devem permanecer na pele, durante a eliminação do suor. Substâncias como os PVPs e os derivados do silicone são capazes de conferir resistência às formulações por formarem filmes sobre a pele, originando uma barreira hidrofóbica.

A preocupação em realmente fazer com que os filtros químicos tenham maior afinidade pelo estrato córneo, ou seja, fiquem aderidos na pele como um filme protetor conduziu a um estudo exploratório da associação de um filtro químico, Parsol MCX<sup>®</sup> (metoxicinamato de octila) com nanocápsulas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona). Os resultados preliminares destacaram a viabilidade desta associação na diminuição dos efeitos danosos da radiação UV em pele de porco, justificado pela provável formação de um filme na superfície cutânea a partir das

nanocápsulas (Alvarez-Román *et al.*, 2001).

Avaliando a capacidade dos filtros solares serem captados pelos queratinócitos e a influência dos lipídeos cutâneos nesta captação é que em 1998, Hagedorn-Leweke e Lippold desenvolveram um estudo sobre este assunto. A capacidade dos materiais se depositarem na queratina é referenciada como substantividade, sendo esta característica importante para a resistência a água dos filtros solares. Para este estudo foram utilizadas calosidades humanas deslipidizadas e uma série de filtros químicos e antioxidantes. Foi observado que o acúmulo destas substâncias na queratina estava relacionado com o grau de lipofilia dos agentes aplicados, coeficiente de partição entre pele e veículo assim como, a solubilidade do veículo aplicado e a determinação da extensão da penetração na pele. Uma pequena concentração de filtro solar pode ficar depositada na pele, porém é facilmente removida com água. Dessa forma, o ideal seria o desenvolvimento de filtros químicos com adsorção específica, ou seja, a inclusão de grupos com carga positiva, capazes de reagir com proteínas da cadeia da queratina carregadas negativamente.

Reconhecendo a necessidade de avaliar qual a capacidade de penetração de um filtro solar na pele a partir de nanocápsulas é que Olvera-Martínez e colaboradores em 2005 avaliaram a penetração do metoxicinamato de octila na pele, por "tape-stripping" quando associado a nanocápsulas. Este estudo demonstrou que a capacidade de penetração está relacionada com o diâmetro das partículas bem como, com a capacidade de deformação destes sistemas.

O metoxicinamato de octila (Figura 4) é um filtro químico lipossolúvel, derivado do ácido cinâmico, de difícil remoção na presença de água e que absorve a radiação UVB a 310 nm. Quando aplicado de forma isolada na pele possui uma tendência de permanecer na superfície da mesma, pois sua penetração cutânea é relativamente baixa. Este filtro apresenta a característica de não manchar a pele e as roupas e é extremamente explorado na preparação de produtos para fotoproteção devido ao elevado coeficiente de extinção molar em vários solventes

(Jiménez *et al.*, 2004a; Klein, 1997; Schauder, 1997).

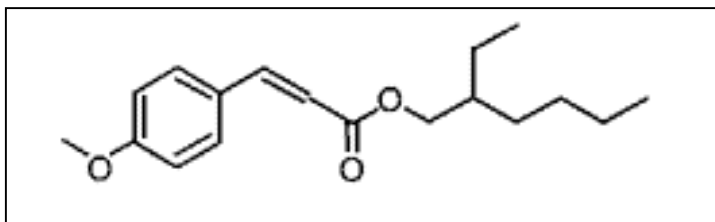


Figura 4. Estrutura química do metoxicinamato de octila.

O metoxicinamato de octila causa poucas reações de fotosensibilização na pele, no entanto, este filtro apresenta problemas de instabilidade quando exposto à luz, acarretando em diminuição de sua capacidade de absorção (Schauder, 1997; Tarras-Wahlberg, 1999).

As formulações contendo filtros solares devem ser estáveis, dessa forma, a fotoestabilidade dos filtros químicos é importante, uma vez que estes podem interagir com solventes e componentes da formulação, além de estarem sujeitos a degradação resultante de sua exposição à radiação UV (Mestres *et al.*, 1997; Shaat *et al.*, 1990; Wissing e Muller, 2001). Um estudo desenvolvido em 1997 por Mestres e colaboradores demonstrou que o metoxicinamato de octila quando solubilizado em propilenoglicol e miristato de isopropila e expostos à radiação UVA/ B, apresentou uma perda de 30-33 % da atividade. Além disso, a análise do melhor veículo demonstrou que emulsões do tipo O/A mantêm a atividade do filtro por 4 horas de irradiação, o que não é observado para emulsões do tipo A/O.

Em um estudo realizado por Schulz e colaboradores em 2002 a influência que o veículo exerce no valor de FPS foi avaliada. Nesta pesquisa trabalhou-se com três filtros químicos: etilhexiltriazina, metilbezeldeno cânfora, e octacrileno, que foram incorporados na concentração de 4 % em emulsões do tipo O/A. Os filtros com maior coeficiente de extinção molar foram os que apresentaram um valor maior de FPS, fato este que vem de encontro com as referências teóricas.

No mesmo trabalho também avaliou-se a influência da associação de filtros no incremento do FPS. Os filtros metilbezilideno cânfora e etilhexiltriazina, de forma individualizada foram associados com butilmetoxidibenzoilmetano (absorção máxima em 360 nm) em uma emulsão O/A. O butilmetoxidibenzoilmetano exerceu uma influência positiva no aumento do FPS, diminuindo significativamente o eritema.

O uso de filtros solares é uma recomendação dos órgãos de saúde para uma exposição solar saudável, no entanto, algumas observações estão sendo feitas relativas ao fato de que o aumento de número de câncer de pele pode também estar relacionado com o uso dos filtros químicos, no entanto, a relação entre o efeito dos filtros sobre o aparecimento de melanoma ainda é discutida (Bastuji-Garin e Diepgen, 2002; Wartha Wright *et al.*, 2001). Através de estudos prévios foi evidenciado, que alguns filtros solares quando aplicados sobre a pele são capazes de gerar ERO, além das já geradas pela radiação UV (Allen *et al.*, 1996; Cantral *et al.*, 2001; Hanson *et al.*, 2006).

Com o objetivo de melhor explorar a ação dos filtros químicos sobre a pele um estudo desenvolvido por Hanson e colaboradores (2006), procurou identificar sobre quais condições, os filtros químicos produzem ERO na pele, através da utilização de um indicador fluorescente de ERO, a dihidrorodamina. A detecção, ao nível de epiderme, das espécies reativas de oxigênio foi realizada após aplicação, na pele, de uma emulsão contendo metoxicinamato de octila, benzofenona-3 e octacrileno nas concentrações máximas permitidas pelo FDA (7,5 %, 6 % e 10 % respectivamente). As amostras de pele foram incubadas por 0, 20 e 60 min (37°C). Os resultados deste estudo demonstraram que os filtros são capazes de gerar ERO no citoplasma dos queratinócitos presentes na epiderme, no entanto este mecanismo de geração não está completamente elucidado, podendo-se atribuir esta geração à presença de um estado tripleto, disponível na estrutura destes filtros, que transfere energia para o O<sub>2</sub> e assim gera o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> que no final de uma seqüência de reações origina o radical hidroxila, na presença de Fé<sup>+2</sup>, através da reação de Fenton (2) (Gasparro, 1997).

Os filtros químicos também apresentam como principal desvantagem o alto grau de alergenicidade quando em contato com a pele. Dessa forma, a necessidade de desenvolver um filtro solar pouco irritante, resistente à degradação e com uma larga faixa de absorção, principalmente UVA e UVB, conduziu a realização de vários estudos. Uma alternativa para otimizar a utilização dos filtros químicos consiste na veiculação destes sistemas nanoestruturados (nanocápsulas) ou na complexação com ciclodextrinas. Estes processos seriam capazes de proteger o filtro químico da radiação, reduzindo ou eliminando as interações (Citernes, 2001). Em 1999, Biloti e colaboradores complexaram o metoxicinamato de octila em  $\beta$ -ciclodextrinas, sugerindo uma redução na intensidade da foto-oxidação e volatilidade, além da redução do contato de substâncias alergênicas com a pele. Após as análises por fluorescência observou-se que a atividade fotoquímica é a mesma para o filtro livre e para o filtro complexado, no entanto, devido à complexação, os produtos gerados por ação da radiação UV tiveram menor contato com a pele reduzindo as reações alérgicas.

Neste mesmo contexto, nanopartículas lipídicas sólidas foram estudadas em relação ao seu uso em formulações fotoprotetoras. Os resultados evidenciaram que estes sistemas foram capazes por si só de refletir e espalhar a radiação, possibilitando a redução na concentração do filtro químico. As emulsões contendo nanopartículas lipídicas sólidas com filtro químico (2-hidroxi-4-metoxi benzofenona) foram três vezes mais potentes, em relação à capacidade de fotoproteção que a emulsão contendo apenas o filtro químico. Além disso, essa associação propiciou a formação de um filme sobre a pele detectado por microscopia eletrônica o qual é capaz de diminuir a perda de água transdérmica favorecendo o grau de hidratação cutânea (Wissing e Muller, 2001).

Nanopartículas poliméricas também têm sido propostas como uma nova geração de carreadores para bloqueadores UV, com o objetivo de prolongar o tempo de resistência dos filtros solares no estrato córneo (Alvarez-Román *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2004 a,b). Estudos envolvendo suspensões de nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila e nanocápsulas incorporadas em gel,

apresentaram perfis moderados de liberação que podem ser explicados pela alta hidrofobicidade e cristalinidade do polímero (poli- $\epsilon$ -caprolactona) usado na preparação, e também pela alta lipofilia do ativo que previne a sua difusão para o meio receptor. A baixa taxa de difusão inicial do metoxicinamato de octila frente às nanocápsulas, sugere que o ativo encontra-se inteiramente encapsulado e não adsorvido na superfície externa das nanocápsulas (Alvarez-Román *et al.*, 2001).

Em um outro experimento realizado por Alvarez-Román e colaboradores (2004a), as nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila foram quantificadas de acordo com o teor deste filtro químico através da técnica de “tape-stripping”. Os resultados demonstraram um aumento na disponibilidade de liberação das nanocápsulas dentro do estrato córneo, não sendo possível detectar a presença do metoxicinamato de octila, no compartimento receptor, após 6 horas de experimento.

#### **1.4 Sistemas nanoparticulados**

Os sistemas coloidais incluem as emulsões submicrônicas, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos e são capazes de atuar como veículos para fármacos lipofílicos e hidrofílicos. Os sistemas nanoestruturados podem ser administrados pelas vias intravenosa, subcutânea, intramuscular, ocular, oral e tópica. A principal vantagem destes sistemas é a capacidade de modificar consideravelmente a penetração intracelular das substâncias a eles associadas. Porém, muitas questões ainda encontram-se sem respostas no que diz respeito ao destino intracelular das nanopartículas, provavelmente devido a grande variedade de linhagens celulares e polímeros existentes (Allemán *et al.*, 1992; Alvarez-Román *et al.*, 2001; Couvreur *et al.*, 1995).

Dentre os vetores utilizados, os lipossomas vêm sendo estudados há mais tempo. No entanto, apresentam problemas de instabilidade frente ao armazenamento e perante os fluídos gastrintestinais (Ammoury *et al.*, 1993). Por sua vez as nanopartículas são capazes de superar os lipossomas neste aspecto, já que são estruturas poliméricas mais estáveis, principalmente frente aos fluidos

biológicos (Ammoury *et al.*, 1993; Magenheim e Benita, 1991), além de serem facilmente esterilizáveis, devido ao seu reduzido diâmetro de partícula (Kwon *et al.*, 1996).

A utilização dos sistemas coloidais como carreadores de substâncias de uso dermatológico tem sido alvo de inúmeras pesquisas, contribuindo para a introdução gradual destes sistemas no mercado farmacêutico e cosmético (Dingler *et al.*, 1999; Jennings *et al.*, 2000a,b; Lippacher *et al.*, 2001; Umbach, 1995).

As nanocápsulas apresentam uma série de vantagens em relação a outros sistemas carreadores e emulsões, pois conferem proteção da substância ativa nela incorporada frente à degradação química, uma vez que a substância ativa fica retida no interior de uma matriz sólida ou de um invólucro polimérico que também tem a função de controlar a liberação da substância ativa ao meio de dispersão (Dingler *et al.*, 1999). Estas estruturas são potencialmente capazes de proteger o fármaco frente à degradação enzimática e imunológica, aumentar a especificidade de ação e, por conseqüência, aumentar a atividade terapêutica de muitas substâncias, resultando assim, em doses terapêuticas menores, com redução dos efeitos tóxicos (Ammoury *et al.*, 1993; Fawaz *et al.*, 1996; Kreuter, 1991; Puglisi *et al.*, 1995; Yokoyama e Okano, 1996). Por outro lado, um grande número de fármacos apresenta pouca solubilidade ou instabilidade em meio aquoso, fatores que podem originar problemas no desenvolvimento de formulações. Neste sentido, as nanopartículas poliméricas podem proteger moléculas lábeis e moléculas com problemas de solubilidade (Legrand *et al.*, 1999).

As vantagens destes sistemas com relação à proteção que oferecem às substâncias neles associados, e a capacidade de provocarem uma liberação controlada destas substâncias em sítios específicos estão condicionadas à natureza do polímero utilizado, ao tipo de partícula e ao campo de aplicação a que se destinam (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998).

A vetorização é o processo pelo qual uma substância passa a ser liberada de forma seletiva para sítios fisiológicos específicos, órgãos, tecidos ou células, onde a atividade farmacológica é requerida. Um aumento na concentração do



fármaco em sítios específicos e/ou redução da toxicidade em sítios não específicos, pode levar a índices terapêuticos mais adequados (Yokoyama e Okano, 1996). Estes sistemas têm sido extensivamente estudados para administração oral e parenteral, podendo também ser utilizados para liberação de vários fármacos através da pele (Jalón *et al.*, 2001).

A liberação imediata ou sustentada de substâncias ativas tem sido relatada para as nanopartículas lipídicas sólidas. No caso de aplicações dérmicas ambas as formas de liberação são importantes. A liberação sustentada é importante para substâncias ativas que são irritantes em altas concentrações e devem atuar sobre a pele durante um longo período de tempo e também para a redução da absorção sistêmica (Jenning *et al.*, 2000 a).

Neste contexto, destaca-se um trabalho que estudou nanopartículas lipídicas sólidas frente a sua capacidade como carreadores de vitamina E em produtos dermatológicos. As nanopartículas lipídicas sólidas contendo vitamina E foram incorporadas em emulsões O/A e mantiveram-se estáveis após 6 meses de estocagem à temperatura ambiente, além de mostrarem-se eficientes na proteção da vitamina E frente a degradação química (Dingler *et al.*, 1999). Além da vitamina E, a vitamina A também foi associada a nanopartículas lipídicas sólidas e posteriormente esta suspensão coloidal foi incorporada em géis e emulsões O/A, mostrando que estes nanocarreadores contribuíram para a liberação sustentada desta vitamina (Jenning *et al.*, 2006).

Um gel contendo nanocápsulas poliméricas de Parsol MCX<sup>®</sup> (metoxicinamato de octila) foi avaliado para verificar a capacidade de proteção solar das nanocápsulas frente radiação UV. Utilizou-se como parâmetro de comparação para este estudo um gel contendo apenas o filtro químico. Os resultados obtidos foram promissores para a formulação contendo o metoxicinamato de octila incorporado as nanocápsulas poliméricas, uma vez que estes sistemas, devido a sua grande área de superfície propiciam a formação de um filme sobre a pele (Alvarez-Román *et al.*, 2001).

#### 1.4.1 Preparação de nanocápsulas

As pesquisas envolvendo os sistemas coloidais proporcionaram o desenvolvimento de várias metodologias para suas preparações, cada qual com suas particularidades, no que diz respeito às características do produto final obtido (Wolgemuth *et al.*, 2000). Os vários métodos de preparação de nanocápsulas biodegradáveis podem ser classificados naqueles que requerem uma reação de polimerização e nos que fazem uso direto de um polímero pré-formado (Allémann *et al.*, 1992; Couvreur *et al.*, 1995).

Em 1986, um método baseado na polimerização interfacial de monômeros polialquícianoacrilatos, foi proposto por Al Khoury e colaboradores, com a vantagem de ser mais rápido e de fácil transposição à escala industrial (Al Khouri *et al.*, 1986; Gallardo *et al.*, 1993; Puisieux *et al.*, 1994). Os métodos baseados na polimerização interfacial de monômeros polialquícianoacrilatos apresentam a desvantagem de uma polimerização “*in situ*” conduzindo à presença de monômeros e oligômeros residuais tóxicos, bem como ligações covalentes entre o monômero alquícianoacrilato e a substância ativa, impedindo o controle da massa molecular do polímero obtido e da liberação do fármaco (Devissaguet *et al.*, 1991; Gallardo *et al.*, 1989).

Em 1988, Fessi e colaboradores propuseram o método baseado na deposição do polímero pré-formado biodegradável. Este método não apresenta os inconvenientes da presença de monômeros e oligômeros residuais, consequência da polimerização “*in situ*” e a possibilidade de reação cruzada entre o monômero acrílico e a substância ativa (Ammoury *et al.*, 1993; Guterres *et al.*, 1995). O método de nanoprecipitação consiste de uma reformulação do processo de emulsificação espontânea para a obtenção de nanoesferas. O polímero é dissolvido em um solvente orgânico juntamente com o óleo, o tensioativo lipofílico e o fármaco a encapsular. A fase oleosa é vertida, sobre a fase aquosa, a qual é composta de água e tensioativo hidrofílico. Esta mistura origina, espontaneamente, as nanocápsulas, com diâmetro médio entre 200 a 500 nm. As

nanocápsulas obtidas por esta metodologia são estáveis e, além disso, fornecem elevadas taxas de encapsulação, principalmente para fármacos lipofílicos (Devissaguet *et al.*, 1991; Fessi *et al.*, 1988).

A nanoprecipitação parece ser um processo bastante simples, no entanto, seu mecanismo não está completamente esclarecido, podendo envolver um fenômeno hidrodinâmico interfacial complexo. A adição da fase orgânica sobre a aquosa ocasiona uma emulsificação espontânea da fase oleosa, em gotículas de diâmetro nanométrico. O solvente difunde-se no não solvente e o polímero que é insolúvel, tanto no não solvente quanto no núcleo oleoso, é dissolvido na interface destes dois componentes imiscíveis, onde se deposita formando a membrana das nanocápsulas. Este método demonstra a propriedade do polímero em atuar como barreira e estabilizar a emulsão formada pelo material central. Assim, o mecanismo de formação das nanocápsulas pode ser explicado pela turbulência interfacial ou agitação espontânea da interface entre duas fases líquidas em desequilíbrio envolvendo o processo de difusão (Fessi *et al.*, 1989; Puisieux *et al.*, 1994).

Para a obtenção de nanocápsulas através do método de deposição interfacial de um polímero pré-formado (Fessi *et al.*, 1989), as matérias-primas imprescindíveis são o polímero biodegradável, componente oleoso e tensioativos. Os polímeros mais utilizados são o poli [(±)-ácido láctico], o Eudragit<sup>®</sup> (polimetacrilato), a poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) ou etilcelulose (Dunn, 1991; Fessi *et al.*, 1989).

O componente oleoso também é de extrema importância já que é nele que ocorrerá a solubilização da substância que se pretende encapsular, sendo a lipossolubilidade da substância ativa neste meio fator importante para a encapsulação. Os óleos mais usados são os ésteres etílicos de ácidos graxos iodados, Mygliol 810<sup>®</sup> e 812<sup>®</sup> e misturas de triglicerídios de ácidos graxos saturados de cadeia longa (Fessi *et al.*, 1989).

Estas formulações requerem também o uso de uma associação de

tensioativos, um de elevado EHL (Symperonic PEF 80<sup>®</sup> ou Tween 80) e outro de baixo EHL (monoestearato de sorbitano ou Epikuron 170<sup>®</sup>) (Fessi *et al.*, 1989; Puisieux *et al.*, 1994). A presença dos tensioativos confere maior viscosidade ao sistema após a evaporação do solvente, aumentando a estabilidade do mesmo por prevenir a conservação e a agregação com o passar do tempo (Guterres, 1995; Puisieux *et al.*, 1994). Levando em consideração esta observação, pode-se destacar que o alto peso molecular dos tensioativos previne de forma efetiva a coacervação do sistema, provocada pela viscosidade da solução aquosa, além disso, eles podem ser facilmente adsorvidos em torno das nanogotículas (Jiménez *et al.*, 2004a).

Estudos mostram que formulações preparadas com apenas um dos tensioativos, sedimentaram e formaram “cake” de difícil redispersão (Ammoury *et al.*, 1990; Fessi *et al.*, 1989). O tensioativo lipofílico é importante para a obtenção de uma população de partículas com distribuição de tamanho homogênea e estreita. A sedimentação das partículas e a passagem da substância ativa para o meio aquoso dispersante são evitadas pela presença do tensioativo lipofílico (Guterres, 1995).

#### *1.4.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas*

Na preparação de suspensões de nanocápsulas parâmetros como pH, concentração de polímero, estabilizadores, força iônica e adição de outros adjuvantes podem afetar as características da formulação (Magenheim e Benita, 1991; Roblot *et al.*, 1988). Após a preparação destes sistemas, é fundamental avaliar suas características físico-químicas, através da determinação de parâmetros como: densidade, diâmetro médio das partículas, pH, potencial zeta, massa molecular do polímero, determinação da quantidade de substância encapsulada, entre outras.

Estudos através de microscopia eletrônica de criofratura das nanocápsulas permitiram observar a presença de um envelope fino e irregular cercado as gotículas de óleo (Roblot *et al.*, 1988). A determinação da distribuição do tamanho

de partícula é uma das avaliações físico-químicas mais importantes das suspensões coloidais, uma vez que a tendência à sedimentação durante estocagem pode ser monitorada por este parâmetro. Além disso, valores reduzidos de diâmetros particulares são fundamentais para a absorção e distribuição *in vivo*, das suspensões coloidais (Magenheim e Benita, 1991).

O diâmetro de partículas fornece informações interessantes a respeito da influência dos componentes da formulação sobre as características físico-químicas da suspensão coloidal obtida. Santos-Magalhães e colaboradores (2000), observaram que parâmetros como a velocidade de agitação utilizada no momento de preparação das nanopartículas e fatores de formulação (quantidades de polímero e tensioativos e volume do solvente orgânico) são capazes de influenciar no tamanho das nanocápsulas preparadas com poli ( $\epsilon$ -caprolactona).

Um exemplo disto é o estudo conduzido por Rollot e colaboradores (1986), no qual foi demonstrado que o aumento da quantidade de polímero em uma suspensão de nanocápsulas preparadas com Miglyol<sup>®</sup> (fase oleosa), ocasionou a diminuição do diâmetro particular destas formulações, devido à redução da energia livre do sistema, que pode estar relacionada com a presença de um filme polimérico na interface.

O tipo de tensioativo influencia significativamente no tamanho de partícula das nanocápsulas, isto pôde ser observado por Jiménez e colaboradores (2004a), onde observaram que suspensões de nanocápsulas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) preparadas com Montanox 80<sup>®</sup> obtiveram diâmetro particular menor (2 a 3 vezes) que as preparadas com Tween<sup>®</sup>85 e Sinperonic<sup>®</sup> PE/F68, favorecendo menor aglomeração das partículas. Os autores atribuíram estes resultados ao fenômeno interfacial que ocorre durante o processo de difusão (preparação das nanocápsulas) que pode contribuir na subdivisão dos glóbulos no interior nas nanogotículas antes da formação das nanopartículas. Ou seja, as gotículas serão rapidamente estabilizadas pelo tensioativo até que se complete o processo de difusão do solvente e agregação do polímero.

Jiménez e colaboradores (2004a), observaram que a quantidade de solvente orgânico influencia no diâmetro das nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona). À medida que se aumenta a quantidade de solvente ocorre a diminuição do tamanho das partículas. Este fato, de acordo com os autores, pode ser atribuído à baixa quantidade de acetona que gera uma solução mais viscosa e concentrada do polímero dificultando assim a quebra da mesma, em gotículas pequenas de óleo no seu interior, processo este que ocorre durante a difusão do solvente.

O pH das suspensões é outro parâmetro importante, pois alterações de seus valores podem estar associadas à degradação do polímero ou outros componentes da formulação (Guterres, 1995). Suspensões de nanocápsulas e nanoesferas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) contendo diclofenaco, após 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, apresentaram um decréscimo acentuado nos valores de pH para todas as formulações estudadas. Esta diminuição de pH possivelmente estava relacionada com a degradação do polímero em função do tempo de armazenamento (Müller, 1999). Fenômeno similar também foi observado para nanocápsulas preparadas com poli [( $\pm$ )-ácido láctico] (Guterres *et al.*, 1995).

As nanopartículas possuem uma estrutura com superfície eletrostática, devido à dissociação de grupamentos do polímero ou pela adsorção preferencial de íons ou outras moléculas iônicas do meio aquoso de dispersão. A natureza da carga de superfície das partículas é capaz de mudar a resposta biológica, devido à interação com componentes do sangue ou ligação com proteínas plasmáticas. Quando a carga líquida das nanopartículas é alta pode se dizer que o sistema é mais estável devido às forças repulsivas que previnem a agregação (Magenheim e Benita, 1991).

A investigação realizada por Chasteigner e colaboradores (1995) exemplifica a utilização do potencial zeta na avaliação das características dos colóides. Nanoesferas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) mostraram-se mais negativamente

carregadas que as nanocápsulas de poli [(±)-ácido láctico]. A adição de itraconazol, fármaco antifúngico, às nanoestruturas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) causou uma diminuição da carga negativa, sugerindo que parte do fármaco foi adsorvido à superfície das nanoesferas, através de fortes interações hidrofóbicas.

A avaliação da quantidade de substância ativa presente nas nanopartículas é fundamental, porém complicada, devido à dificuldade em separar a substância ativa livre da associada, em função da natureza coloidal das suspensões. A técnica de separação mais comumente utilizada é a ultracentrifugação. A substância ativa livre é determinada no sobrenadante, enquanto a substância ativa total é medida após completa dissolução das nanopartículas em um solvente apropriado (Magenheim e Benita, 1991). O conteúdo de substância ativa no interior das nanocápsulas é determinado em função da diferença entre o total de substância ativa contida na suspensão e a quantidade de fármaco livre na suspensão, a qual é determinada após a separação das fases por ultrafiltração-centrifugação (Fessi *et al.*, 1989; Michel *et al.*, 1991).

## 1.5 Penetração cutânea

Considerada o maior órgão do corpo humano, a pele tem como função primordial proteger o organismo da perda de água interna bem como bloquear a entrada de agentes exógenos (Martini, 2005; Schaefer *et al.*, 1982).

A pele é constituída por três camadas denominadas: epiderme, derme e camada subcutânea ou hipoderme, sendo considerada uma barreira complexa, com organização anatômica e estrutura química especial (Figura 5) (Verma *et al.*, 2003). A via cutânea apresenta-se como uma via de administração bastante atrativa e acessível para a administração de substâncias, pelo fato de não apresentar os problemas associados com as vias de administração oral e parenteral (Asbil e Michniack, 2000), tais como metabolismo de primeira passagem, fácil degradação de substâncias ativas, devido à presença de enzimas e pH, condições de apirogenicidade e esterilidade, entre outros fatores.

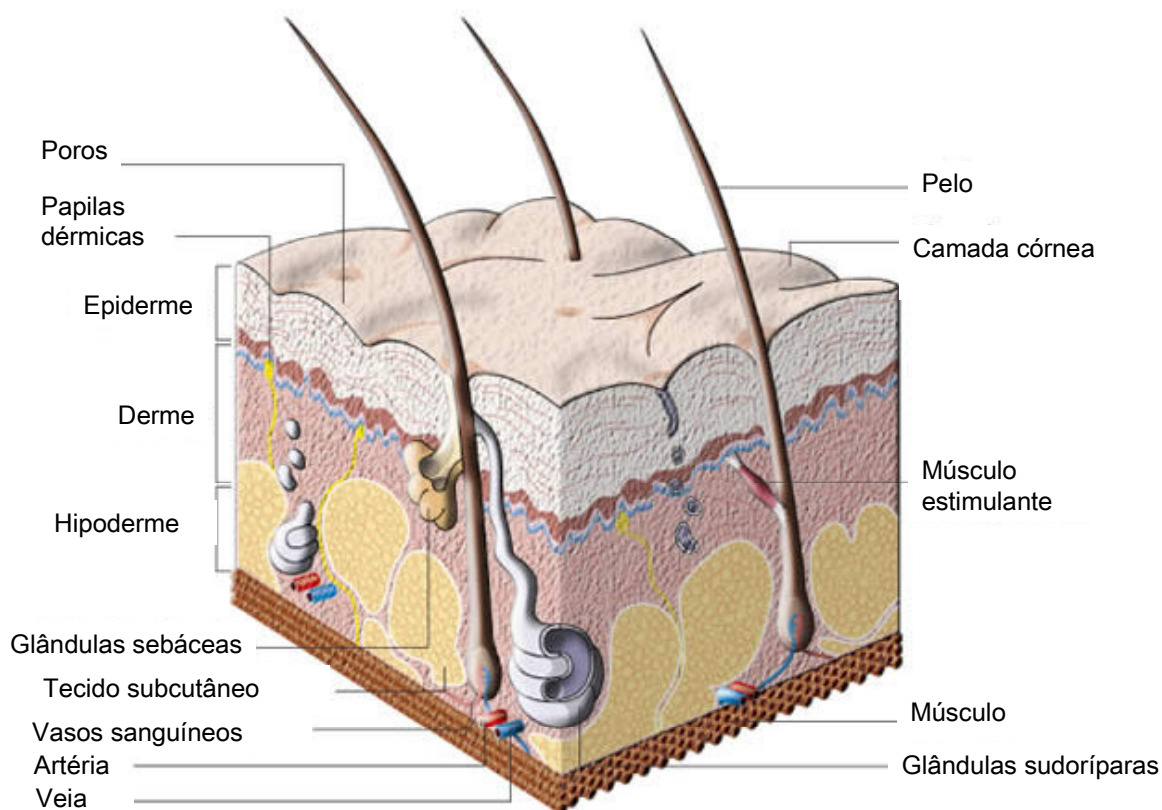


Figura 5. Corte esquemático do tecido cutâneo (adaptado de [www.cnrs.fr](http://www.cnrs.fr)).

A pele é um órgão dinâmico que tem características de permeabilidade dependentes de vários fatores, tais como: espessura e integridade do estrato córneo (EC); hidratação da pele, coeficiente de partição da substância ativa e presença de promotores de penetração. A espessura e integridade do EC podem sofrer alterações de acordo com a idade, sexo, raça e região corporal. O coeficiente de partição é manifestado pela lipofilia ou, solubilidade relativa do fármaco, no estrato córneo/ veículo (Tauber, 1989). Mediante a aplicação de formulações tópicas, alguns fatores são capazes de conduzir a liberação de fármacos e cosméticos na pele. Estes fatores incluem o tamanho da molécula, a lipofilia da substância ativa, o tipo de formulação, a presença de promotores de penetração e estado físico do estrato córneo (Verma *et al.*, 2003).

O EC é o principal responsável pela função “barreira” da pele, constitui a



camada mais externa deste órgão e é formado por camadas de corneócitos organizados e agrupados contendo de 10-15 camadas com uma espessura variável entre 10-20  $\mu\text{m}$  (Foldvari, 2000; Kamikkannan e Singh, 2002; Martini, 2005). Os corneócitos estão ligados entre si através de desmossomas, ao quais contribuem para a coesividade desta camada, e por lipídeos intracelulares que preenchem os espaços extracelulares (Jacobi *et al.*, 2006). Exemplos destes lipídeos são as ceramidas, colesterol e ácidos graxos, os quais originam bicamadas em torno dos corneócitos (Kamikkannan e Singh, 2002). A penetração através do EC depende das propriedades físico-químicas da substância ativa aplicada e do veículo onde a substância encontra-se incorporada (Cross *et al.*, 2003)

A qualidade, a cristalinidade, bem como, as quantidades totais de lipídios, no EC, determinam a eficiência da barreira cutânea (Cevc, 2004). A estrutura e a organização desta camada têm uma profunda influência nas propriedades de transporte de substâncias lipídicas e de água. Desta forma, o estrato córneo e sua estrutura compacta, constitui-se no principal obstáculo para penetração de compostos aplicados topicamente na pele (Blanco *et al.*, 2003; Essa *et al.*, 2002; Hadgraft, 2001; Kalia e Guy, 2001; Morganti, *et al.*, 2001; Moser *et al.*, 2001; Suhonen *et al.*, 1999; Ting *et al.*, 2004).

O inconveniente da via cutânea está na alta seletividade em relação às substâncias que conseguem difundir passivamente pelo EC. A efetividade desta função do EC é verificada quando esta camada é retirada através da utilização de uma fita adesiva e percebe-se um forte aumento da permeabilidade de água e outros componentes que anteriormente não apresentavam esta facilidade de difusão (Asbil e Michniak, 2000). O coeficiente de partição entre o veículo e o EC é de fundamental importância para a substância a ser permeada, estabelecendo-se uma concentração inicial elevada nas primeiras camadas da pele. A eficácia deste tipo de produto pode ser determinada pela relação estabelecida entre os coeficientes de permeabilidade no EC e a estrutura característica da substância a ser absorvida. O grau de absorção através da estrutura cutânea poderá ser conseqüentemente alterado, variando-se as características físico-químicas do

veículo e dos ativos utilizados. Assim, a substância a ser absorvida dependerá: (a) do coeficiente de partição nos lipídios superficiais do EC; (b) da difusão no EC; (c) partição entre o EC e a epiderme viável (mais hidrofílica); (d) da difusão pela epiderme e derme; e finalmente, atingir à circulação sistêmica, quando desejado (Morganti, *et al.*, 2001).

Vários métodos físicos (iontoforese, eletroporação e sonoforese) e químicos foram apontados como promotores de penetração cutânea. Os métodos físicos são mais indicados para substâncias hidrofílicas (Alvarez-Román *et al.*, 2004a). No entanto, atualmente, a utilização de promotores químicos é mais comum e os mecanismos de ação destes promotores são (Shah, 1994):

- aumento do coeficiente de difusão dos fármacos na pele;
- diminuição da função barreira do EC por fluidização dos lipídeos da camada córnea;
- aumento da atividade termodinâmica do fármaco no veículo e na pele;
- aumento da liberação da substância ativa no interior das camadas da pele por atuarem sobre o coeficiente de partição do fármaco.

Entre os métodos químicos destaca-se a utilização de promotores químicos, de alta afinidade com os lipídeos da pele, tais como: tensoativos e solventes orgânicos, os quais possuem a capacidade de modificar química e fisicamente a estrutura da camada córnea. No entanto, estes promotores podem provocar irritação e diminuir a função barreira da pele. Dessa forma, o ideal é obter a penetração desejável na pele sem a adição de promotores químicos (Kamikkannan e Singh, 2002).

Nas formulações fotoprotetoras a avaliação da penetração cutânea dos filtros solares é um importante parâmetro a ser observado uma vez que o veículo utilizado para sua incorporação influencia na absorção percutânea e pode promover ou bloquear a difusão do filtro através da pele (Martini, 2005). A penetração cutânea da benzofenona-3, filtro químico amplamente utilizado em formulações, foi investigada através de testes *in vitro* (células de Franz) e *in vivo*

(pele de cadáveres ou restos de cirurgias plásticas) quando a mesma encontrava-se incorporada em uma emulsão. O resultado *in vitro* demonstrou um aumento na concentração da benzofenona-3 na pele de porco, principalmente quando foi utilizado propilenoglicol na preparação da emulsão. Uma emulsão submicrômica também foi estudada demonstrando excelente capacidade de atuar como promotor da penetração deste filtro químico, aumentando sua concentração na pele. Os resultados *in vivo* coincidiram com os resultados *in vitro*, a única diferença foi o tempo de penetração que nos testes *in vivo* foi menor (Fernandez *et al.*, 2000).

Entre os diversos carreadores que vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de aumentar a absorção percutânea de substâncias ativas, destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas e poliméricas, os lipossomas e as emulsões submicrômicas (Alvarez-Román *et al.*, 2004a). Estes sistemas são capazes de carrear substâncias através de pele e aliviar os danos causados em sua função barreira. Existe um número limitado de estudos envolvendo estes carreadores em relação ao potencial de aplicação transdérmica. Os estudos mais comuns realizados envolveram e ainda envolvem substâncias como adapaleno, aciclovir e vitaminas A e E (Alvarez-Román *et al.*, 2004a). No entanto, o mecanismo de interação entre estes sistemas e a pele bem como as rotas de distribuição na pele, utilizadas, continuam sendo investigados (Alvarez-Román *et al.*, 2004a; Muller and Kreuter, 1999).

Um estudo desenvolvido por Shim e colaboradores (2004) com nanocápsulas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) e poly(etilenoglicol) contendo monoxidil evidenciou que as nanocápsulas foram capazes de distribuir este fármaco de forma mais efetiva na pele de porco que a solução hidroalcolica (70:30 v/v) e os lipossomas de minoxidil. Segundo os autores a efetividade das nanopartículas está na capacidade de penetração das mesmas através dos folículos cutâneos e do seu diminuto tamanho de partícula. Alvarez-Román e colaboradores (2004a) também evidenciaram que o tamanho reduzido das nanocápsulas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) ( $\pm$  250nm) contendo metoxicinamato de octila propiciavam uma

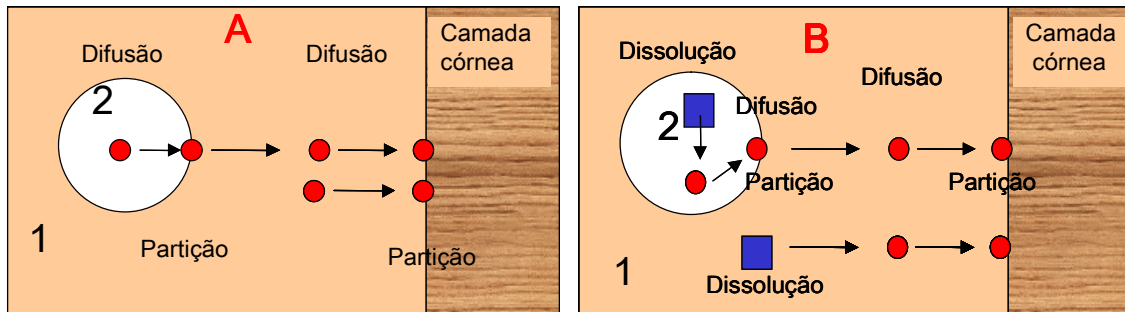
maior superfície de contato, e por sua vez maior aproximação da substância ativa encapsulada com o EC.

Um estudo desenvolvido por Jiménez e colaboradores em 2004a teve por objetivo a avaliação da penetração percutânea do metoxicinamato de octila associado em nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) e estas incorporadas em emulsões A/O e O/A. Para a determinação da liberação do metoxicinamato de octila foi utilizada pele de porco adaptada em célula de difusão. As formulações analisadas mostraram um perfil de liberação moderado que pode ser explicado pela hidrofobicidade e cristalinidade do polímero e também pela lipofilia do metoxicinamato de octila. A maior concentração do metoxicinamato de octila no estrato córneo foi observada para as emulsões O/A e A/O e menor para emulsões O/A e A/O com nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila. Estes estudos demonstraram que o filtro químico tem maior afinidade pelo EC devido a sua capacidade de formar depósitos dentro desta camada. A penetração transdérmica, representada pelo percentual de metoxicinamato de octila no fluido receptor e na derme foi baixa para todos os tipos de formulações analisadas neste experimento. No entanto, foi possível concluir que as nanocápsulas são capazes de formar reservatórios e liberarem o filtro químico de forma bastante lenta na pele quando comparadas as emulsões (O/A e A/O).

Alguns estudos para a avaliação da aplicação tópica de antioxidantes em pacientes demonstraram que estas substâncias atuam no processo de cicatrização e proteção de tecidos contra os danos gerados pela oxidação. Neste contexto, um estudo realizado por Gomathi e colaboradores em 2003, baseado no fato que a concentração e o modo de aplicação influenciam nos resultados da captura destes radicais propôs a elaboração de uma matriz de colágeno para aplicação tópica da quercetina com o propósito de assegurar uma liberação lenta e melhora da atividade deste flavonóide. A capacidade antioxidante da quercetina foi avaliada através do método de peroxidação lipídica e demonstrou que este flavonóide quando associado à matriz de colágeno é mais efetivo na captura dos radicais livres, que quando administrado isoladamente. Além disso, a avaliação de

vários parâmetros bioquímicos demonstrou que a quercetina associada à matriz de colágeno é capaz de promover a cicatrização e captura de radicais.

A liberação de uma substância ativa do veículo ao qual encontra-se associada dependerá das características do mesmo. Tendo como exemplo uma substância ativa adicionada a um sistema emulsionado termodinamicamente estabilizado, a mesma irá se dividir entre a fase dispersa e dispersante de acordo com a sua solubilidade. Desta forma, a fase contínua que está em maior contato com o EC em decorrência da aplicação, apresentará maior quantidade de substância ativa disponível. A liberação de um princípio ativo a partir de um veículo está sob a dependência de um conjunto de fatores relacionados à interface veículo/ camada córnea e veículo/lipídeos. Quando a substância ativa é solúvel na fase contínua de uma emulsão (Figura 6 A) apresenta-se altamente disponível, podendo se difundir através da camada córnea, assim, esta etapa limita-se a um coeficiente de partição. Por outro lado, quando o princípio ativo é solúvel na fase dispersa (Figura 6 A) de uma emulsão é necessário inicialmente ocorrer a difusão da substância ativa ao seio dos glóbulos da emulsão e após se dividir entre os glóbulos da fase dispersa e dispersante. Nesta etapa, o tamanho dos glóbulos da emulsão é importante, pois estes regulam a superfície de contato entre as fases. Ao entrar em solução, a substância ativa, terá comportamento semelhante a quando esta é solúvel na fase contínua.



\* 1. Fase dispersante (água ou óleo); 2. Fase dispersa (água ou óleo).

\*\* A. princípio ativo solúvel na fase em que está presente; B. princípio ativo insolúvel nas fases em que está presente.

Figura 6. Esquema representativo da liberação de uma substância a partir de uma emulsão (adaptado de Martini, 2005).

Seguindo com o exemplo da emulsão, quando o princípio ativo possui baixa solubilidade na água ou no óleo (Figure 6 B), este poderá encontrar-se sob a forma de uma dispersão formada por finas partículas (cristais). No interior de cada fase existe um equilíbrio entre a forma sólida não solubilizada e uma fração do princípio ativo que está em solução. Na interface, fase dispersante e EC as moléculas que se encontram no estado dissolvido, irão se dividir entre o excipiente e o EC. Depois que o equilíbrio concentração dissolvida/concentração em suspensão é deslocado, uma fração das partículas sólidas dissolvem-se para compensar o desequilíbrio. Para as partículas localizadas nos glóbulos da fase dispersa um coeficiente de partição é criado na interface dos mesmos e permite que as moléculas da substância ativa passem da fase dispersa para dispersante e assim atinjam a camada córnea (Figure 6 B ) (Martini, 2005).

Neste contexto, um estudo avaliou a influencia de diferentes veículos (emulsão, solução oleosa e hidrogel) quanto ao grau de absorção e liberação de terpenos quando aplicados na pele de voluntários. Após 4 horas de incubação, em células de difusão a 37°C, encontrou-se maior quantidade total de terpenos na pele (estrato córneo, epiderme e derme) quando se aplicou o hidrogel. No entanto, a eliminação de terpenos, monitorada por cromatografia gasosa na urina dos voluntários, foi bastante baixa para este veículo, demonstrando que o gel promove maior fixação destas substâncias na pele (Cal, 2006). A boa penetração dos terpenos na pele a partir do gel pode ser atribuída ao favorável coeficiente de

partição dos terpenos (lipofílicos) entre o hidrogel e o estrato córneo (Yener *et al.*, 2003)

### 1.5.1. Vias de penetração de fármacos na pele

Existem duas vias disponíveis para a penetração de uma substância na pele que são: a via que utiliza os anexos cutâneos e via transepidérmica (Figura 7) (Williams *et al.*, 1992).

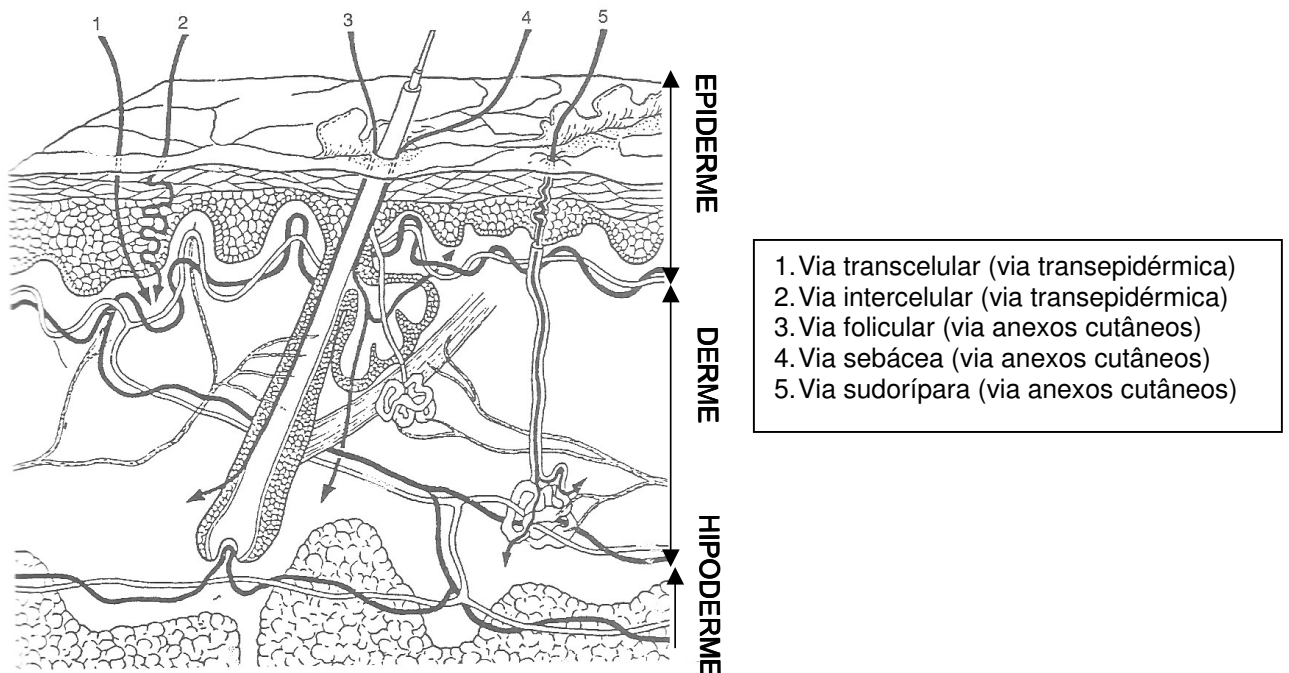


Figura 7. Diferentes vias de passagem através da pele (Martini, 2005).

#### *Via anexos cutâneos*

Os anexos cutâneos representam uma pequena fração da superfície cutânea, aproximadamente 0,1 % da área total da pele, não se configurando como uma via significativa de penetração para a maior parte das substâncias permeantes. Entretanto, estudos mais recentes questionam esses conceitos e indicam que os folículos podem ter maior importância na absorção percutânea (Williams *et al.*, 1992), pois essa via pode ser interessante para grandes moléculas polares que, lentamente, permeiam através do estrato córneo (Florence e

Attwood, 2003; Williams *et al.*, 1992).

### *Via transepidermica*

A penetração de uma substância ativa através da epiderme pode ocorrer via intracelular (rotas que passam através dos corneócitos, envelope de lipídeos e apêndices cutâneos) e a via intercelular (entre os corneócitos) (Kamikkannan e Singh, 2002). O coeficiente de partição da substância que se deseja aplicar sobre a pele influenciará diretamente no grau de penetração da mesma. Substâncias polares atravessam preferencialmente dentro do domínio intracelular, enquanto substâncias lipofílicas (log P octanol/água tipicamente maior que 2) atravessam o EC principalmente via intercelular. É importante notar que a maioria das substâncias permeiam o EC por ambas as vias. Acredita-se que o caminho intercelular represente ao mesmo tempo, a principal via e a maior barreira para maioria dos fármacos permeantes (Alvarez-Román *et al.*, 2004 a; Williams *et al.*, 1992).

Os estudos de permeação normalmente fazem uso de uma membrana entre dois compartimentos, um desses compartimentos contendo a substância em estudo solubilizada no veículo e o outro compartimento em que a concentração inicial da substância é zero (Williams *et al.*, 1992). A interação dos constituintes de uma formulação tópica com a pele é um dos fatores mais importantes para efetiva liberação da substância ativa do veículo ao qual está associada. O efeito pode ser aumentado por alterações na formulação, prevendo-se desta forma, uma provável penetração dos solutos (Cross *et al.*, 2001).

Após a partição da substância ativa através da membrana, a mesma deve ser suficientemente móvel para difundir através do EC. Ainda que o mecanismo para transporte de substâncias através da pele, não tenha sido inteiramente elucidado, é evidente que ocorre um processo de difusão passiva (Shah, 1994) (Figura 6). Esse é um procedimento pelo qual substâncias se difundem num gradiente de concentração (ou mais precisamente, por uma diferença de potencial químico), através de um movimento molecular aleatório para formar um estado homogêneo (Florence e Attwood, 2003).



Considerando que o EC comporta-se como uma barreira à difusão passiva, sem evidenciar processos metabólicos de transporte, este pode ser estimado como uma membrana de partição. A penetração do fármaco através do EC pode ser descrita pela primeira lei de *Fick*, expressa pela Equação 6.

$$J = \frac{D_B \cdot C_{sB}}{l} \times \frac{C_V}{C_{sV}} \quad (6)$$

Onde:

J: fluxo- representando a massa de penetração do fármaco por unidade de área e de tempo. A taxa e o fluxo de penetração são diretamente proporcionais à permeabilidade da barreira;

$D_B$  : coeficiente de difusão no EC;

$C_{sB}$ : solubilidade do fármaco no EC;

$l$  : espessura do EC;

$C_V$ : concentração do fármaco no veículo;

$C_{sV}$  : solubilidade do fármaco no veículo (Florence e Attwood, 2003).

O aumento do fluxo pode ser alcançado, tanto pelo aumento do coeficiente de difusão ( $D_B$ ), como, pelo aumento da solubilidade do fármaco ( $C_{sB}$ ) na membrana. Da mesma forma, o fluxo pode ser aumentado, pelo aumento da concentração do fármaco no veículo ( $C_V$ ), ou por diminuição da solubilidade do fármaco no veículo  $C_{sV}$  (Bach *et al.*, 1998). A solubilidade adequada do fármaco no óleo ou na água pode estabelecer o gradiente de concentração na membrana, determinando a direção da força para difusão. Soluções saturadas ou suspensões promovem uma máxima atividade termodinâmica, podendo determinar um aumento do fluxo.

### 1.5.2 Avaliação dos parâmetros de liberação, penetração percutânea e retenção cutânea *in vitro*.

A absorção percutânea é um complexo processo biológico e físico-químico por isso muitos modelos experimentais têm sido utilizados para elucidar ou prever a liberação e penetração transdérmica de fármacos em animais e humanos (Cornwell *et al.*, 1995; Hadgraft *et al.*, 1996; Jager *et al.*, 1999; Pellet *et al.*, 1997 a,b; Puglia *et al.*, 2001; Santoyo *et al.*, 1995; Singhi e Roberts, 1994; Venter *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2001; Yokomizo *et al.*, 1996). Este processo consiste na passagem de materiais aplicados topicamente, para o interior da pele. A absorção percutânea é o somatório dos processos de penetração (entrada da substância ativa na primeira camada da pele), permeação (migração da substância ativa através de uma ou mais camadas da pele) e da reabsorção (captura da substância ativa pela circulação e vasos linfáticos) (Colipa, 1997).

Experimentos para a avaliação da liberação de uma substância ativa na pele são de difícil interpretação, devido à natureza complexa do EC e a interação com o veículo (Cross *et al.*, 2001). Além de contribuírem para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas ou na avaliação de produtos farmacêuticos e cosmeceuticos, estes testes também são necessários para obtenção de informações sobre os efeitos de fármacos e/ou excipientes na função barreira da pele (Wagner *et al.*, 2001).

A interação dos constituintes de uma formulação tópica com a pele é um dos parâmetros mais importantes para que o veículo exerça uma efetiva liberação da substância ativa. A eficácia de uma preparação pode ser aumentada através de alterações no veículo, com objetivo de alcançar o equilíbrio entre a solubilidade das substâncias e os componentes da formulação. Assim, a interação da substância ativa/ veículo com os componentes da pele determina o comportamento do ativo em relação à difusão no veículo e sua penetração na pele.

Veículos como pomadas, cremes ou géis exercem seus efeitos através da liberação do fármaco sobre a superfície da pele e da posterior difusão das

moléculas do fármaco, pelas diferentes camadas da pele. A extensão e a duração da difusão dependem das propriedades físico-químicas da substância. Se o tamanho de partícula e as propriedades de solubilidade da substância, não são adequados, somente ocorrerá uma captação limitada pela pele (Foldvari, 2000). No caso de produtos contendo filtros solares químicos prefere-se bases contendo óleos minerais por permitam maior liberação do filtro na pele (Jiang *et al.*, 1997; Okereke *et al.*, 1994). Cabe salientar que no caso da aplicação tópica de substâncias associadas a nanocarreadores, o grau de penetração passa a ser um fator dependente, sobretudo, das características das nanopartículas e não apenas das características físico-químicas da substância ativa (Alvarez Román *et al.*, 2004a).

A penetração de um composto ativo formulado para aplicação tópica envolve duas etapas: a primeira é a liberação da substância ativa do veículo e a segunda é a sua penetração no EC. Ambos os processos dependem das propriedades físico-químicas da substância ativa, do veículo e da membrana (barreira) (Contreras *et al.*, 2005; Pinto-Alphandary *et al.*, 2000). A extensão pela qual a substância ativa difunde e/ou o veículo interage com a complexa estrutura da pele determinam a cinética de penetração dos ativos (Cross, *et al.*, 2001).

Modelos matemáticos estão sendo crescentemente aplicados para prever a penetração percutânea, baseados em propriedades físico-químicas de penetrantes e veículos (Cronin *et al.*, 1999; Pugh *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1996). Os ensaios *ex vivo/ in vitro* são utilizados com o objetivo de estimar a absorção/ penetração de uma substância seja ela de aplicação cosmética ou não através da via cutânea. Os testes de penetração/ absorção fazem parte de um conjunto de ensaios que avaliam os riscos dermato-toxicológicos de uma substância, fornecendo subsídios para evidenciar um risco sistêmico bem como para otimizar as formulações (Colipa, 1997; Sartorelli *et al.*, 2000).

Os estudos de permeação *in vitro* são essenciais para avaliar o comportamento de uma determinada substância na pele e através dela. Efetivamente, alguns parâmetros precisam ser considerados: o tipo de membrana que será usada para avaliar a permeação, o modelo matemático que será utilizado

para caracterizar a permeação e o modelo da célula de difusão que será adotado para realização do estudo (Kattan *et al.*, 2000).

Os protocolos *in vitro* utilizam, sobretudo as células de difusão que podem ser encontradas sob diferentes modelos, no entanto mantendo o mesmo princípio de funcionamento. As células de difusão podem ser estáticas (células de Franz) ou dinâmicas, no entanto ambas possuem um sistema doador que contém a substância em estudo e um sistema receptor, no qual a substância deverá ser solúvel, e que a receberá se a mesma penetrar através da pele (Fernandez *et al.*, 2000; Jamouille, 1988).

- Células de Franz (Figura 8): neste tipo de célula o líquido receptor não encontra-se sob circulação, mas possui agitação permanente. O produto a ser testado é aplicado na superfície externa da membrana. Estas células permitem medir a quantidade global de substância que difunde ao final de um tempo determinado



Figura 8. Células de Franz.

As células de Franz são amplamente utilizadas para estudo de penetração cutânea devido seu baixo custo e alta reprodutibilidade (Franz, 1975; Sartorelli *et al.*, 2000). Um estudo realizado por Leveque e colaboradores em 2004 comparou a penetração cutânea do ácido salicílico através de células de Franz e da técnica de microdiálise. Ao final do experimento observou-se perfil de permeação similar, para ambas metodologias, no entanto, o fluxo do ácido salicílico foi maior para a

técnica de microdiálise.

- Células de difusão dinâmicas: possuem um sistema de circulação do líquido receptor, permitindo a diluição do gradiente de concentração. Estas condições estão mais próximas das condições fisiológicas e evitam a recuperação manual do líquido receptor. A recirculação do líquido receptor mantém a viabilidade celular. Este fluxo mimetiza o fluxo sanguíneo através da pele (Sartorelli *et al.*, 2000).

A pele que é utilizada nestas células tendo a função de membrana pode ser de origem humana animal ou sintética. No entanto, a composição lipídica do estrato córneo, espessura e quantidade de anexos cutâneos da pele humana e da animal são diferentes (Busch, 1992). A pele de porco e de macaco são as que mais se aproximam da pele humana, sendo a pele de porco ainda melhor, e por sua vez mais explorada nos estudos de penetração e permeação cutânea (Dick , 1992; Fernandez *et al.*, 2000). Sua similaridade está relacionada com a taxa elevada de fibras elásticas na derme, a estrutura em rede do colágeno, a mesma taxa lipídica e a renovação celular da epiderme. As diferenças entre a pele humana e a de porco consistem no fato de a pele de porco não ter glândulas exócrinas, do estrato córneo ser mais denso e da fraca vascularização das glândulas cutâneas. Além disso, a pele humana apresenta alguns riscos de manipulação e os resultados obtidos podem ser variáveis.

As membranas sintéticas mais utilizadas para os testes de penetração são as de polimetilsiloxano e de acetato de celulose. Estas membranas são mais utilizadas para estudos de triagem, assim a complexidade e espessura da membrana não interferem (Hanson *et al.*, 2006).

Existem também métodos de estudo *in vivo* que são explorados para avaliação da penetração cutânea, de acordo com Agache e colaboradores (2001) eles podem ser divididos em:

- a) dosagem no material excretado: foi um dos primeiros métodos utilizados

para mediar a absorção de determinada substância no organismo humano. A substância ativa em estudo é marcada com C14 e aplicada sobre a pele. Após é realizada a dosagem da substância radioativa presente na urina ou fezes. Esta técnica é útil quando deseja-se comparar a absorção da mesma substância administrada por vias diferentes. Atualmente é pouco utilizada por necessitar uma administração intravenosa paralela para determinar a quantidade de substância ativa retida no organismo ou excretada do mesmo;

b) “stripping”: esta técnica consiste na aplicação sobre a pele de uma determinada substância durante um período de 30 minutos. Após realizar a lavagem da superfície cutânea para remover o excesso de produto, faz-se a o descolamento da camada córnea com o auxílio de fita adesiva especial. Esta fita é então utilizada para a determinação do teor de substância ativa presente. Esta técnica é bastante simples e aplicada para substâncias capazes de difundir livremente pelo estrato córneo. O “tape stripping” é considerado não-invasivo e possui um rápido período de exposição do produto sobre a pele (Fernandez *et al.*, 2000);

c) medida do efeito biológico total: considera efeitos como a vasoconstrição (dermocorticóides), diminuição da sensibilidade (anestésicos locais), entre outros. Avalia-se o tempo para aparição do efeito.

d) Historadiografia: trata-se de uma técnica invasiva onde se faz uma biópsia da pele após aplicação tópica e o produto de interesse é quantificado;

e) Dosagem plasmática: esta medida quali e quantitativa tem a propriedade de informar sobre o metabolismo e a intensidade da passagem sistêmica de uma substância;

f) Microdiálise: estima a quantidade de determinada substância existente nas camadas mais profundas da pele após aplicação tópica. Esta técnica pode ser comparada a uma veia artificial uma vez que utiliza uma cânula muito fina e semipermeável, a qual é colocada na derme realizando-

se a perfusão do tecido com tampão estéril. Esta sonda será responsável por realizar a troca de moléculas pequenas, porém difusíveis no sentido sonda-tecido e vice versa, obedecendo as leis de difusão simples. As substâncias presentes no fluido intersticial do tecido em análise difundem através de uma membrana semi-permeável sendo coletadas no dialisado. O material do dialisado é analisado e a concentração da substância, presente no fluido intersticial, é determinada (Le Quellec *et al.*, 1995; Zeltinger, M *et al.*, 2005).

Nos estudos *in vitro* de produtos tópicos, é importante observar que a concentração de substância ativa na solução receptora não reflete por si só, a influência da formulação na atividade do produto. Assim, a determinação da quantidade de substância retida na membrana natural leva a dados mais concretos, os quais podem elucidar o grau de atividade do produto. Este procedimento tem sido empregado por muitos autores no estudo de penetração cutânea (Abdulmajed e Heard, 2004; Lopez *et al.*, 2000; Pellet *et al.*, 1997b; Sandt *et al.*, 2004; Touitou *et al.*, 1998; Verma *et al.*, 2003).

A padronização dos resultados *in vitro* e a extrapolação dos mesmos com dados *in vivo* é aceito internacionalmente para estimar as razões de penetração e percentuais de absorção cutânea (Sartorelli *et al.*, 2000).

A determinação da substância ativa no interior da pele requer a remoção do excesso de formulação, seguida por um processo de extração com um solvente adequado. Técnicas analíticas apropriadas e sensíveis, tais como CLAE ou cintilografia, devem ser empregadas para quantificação do fármaco extraído (Touitou *et al.*, 1998). Estes estudos são necessários para determinar que tipo de atividade a substância ativa é capaz de exercer, ou seja, tópica ou sistêmica. Para sistemas de liberação tópica, é desejável que o produto apresente acúmulo de substância ativa na pele e mínima permeação (Touitou *et al.*, 1998).

A última década apresentou um grande crescimento na aplicação de técnicas biofísicas para monitorar a permeabilidade de substâncias na pele. Os mecanismos de absorção a nível molecular estão começando a ser entendidos. É

importante ressaltar ainda que, todos os fatores físico-químicos devem ser relacionados com a atividade desempenhada pelas substâncias ativas *in vivo* (Alvarez-Román *et al.*, 2004a; Alvarez-Román *et al.*, 2004b; Borgia *et al.*, 2005; Jacobi *et al.*, 2006; Hadgraft *et al.*, 1999).



## *CAPÍTULO II*

*Estudo de estabilidade das suspensões de  
nanocápsulas contendo quercetina e  
metoxicinamato de octila*

---

## 2.1 Introdução

O objetivo do presente capítulo foi desenvolver e caracterizar suspensões de nanocápsulas contendo quercetina e metoxicinamato de octila, para posterior avaliação da estabilidade destes sistemas frente à radiação UVA, quando preparadas com diferentes tensioativos (Span 60<sup>®</sup> e Epikuron 170<sup>®</sup>). O teste de estabilidade foi conduzido durante um período de 15 dias com formulações contendo ou não quercetina com o objetivo de avaliar a influência da associação quercetina/metoxicinamato de octila no sistema.

A quercetina é um flavonóide amplamente conhecido devido sua atividade antioxidante, através do bloqueio de radicais livres que podem ser gerados pela radiação ultravioleta, entre outros fatores (Areias *et al.*, 2001; Kootstra *et al.*, 1994).

O metoxicinamato de octila é um filtro químico suscetível à degradação, quando exposto a agentes oxidantes, como é o caso da radiação UV (Pattanaargson e Limphong, 2001). Neste contexto, a associação do flavonóide com o filtro químico em um sistema nanoestruturado torna-se potencialmente interessante uma vez que as nanocápsulas podem proteger as substâncias nela contidas da degradação frente a agentes externos e também pelo fato de que esta associação, levando em conta as características de cada substância de forma isolada, poderá também conduzir a maior estabilidade do sistema.

*PUBLICAÇÃO 1: Nanoencapsulation of quercetin using octyl methoxycinnamate as oil in nanocapsules delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation*

Artigo submetido ao periódico Journal of Biomedical Nanotechnology

---

**Nanoencapsulation of quercetin using octyl methoxycinnamate as oil in nanocapsules delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation**

Weiss-Angeli, V.<sup>1,2</sup>, Poletto, F. S.<sup>1</sup>, Zancan, L.R.<sup>1</sup>, Baldasso, F.<sup>2</sup>; Pohlmann, A. R.<sup>3</sup>,  
Guterres, S. S.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 2752. Porto Alegre - RS, Brasil. CEP 90610-000. Phone: 55 51 3308-5500, Fax: 55 51 3308-5437 (\*e-mail: [nanoc@farmacia.ufrgs.br](mailto:nanoc@farmacia.ufrgs.br))

<sup>2</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Caxias do Sul. Avenida Francisco Getúlio Vargas, 1130. Caxias do Sul - RS, Brasil. CEP 95020-972. Phone/fax: 55 54 3218-2190.

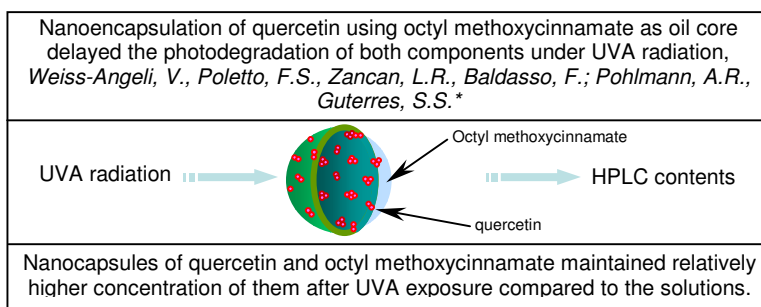
<sup>3</sup> Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves, 9500. PBOX 15003 Porto Alegre – RS, Brasil. CEP 91501-970. Phone: 55 51 3308-6274, Fax: 55 51 3308-7304.

## **Abstract**

The aim of the present work was to evaluate the ability of the nanoencapsulation in protecting octyl methoxycinnamate, a sunscreen, and quercetin, an anti-oxidant, from the degradation that follows the ultraviolet A radiation exposure. The nanocapsules, prepared by nanoprecipitation, were characterized in terms of size, encapsulation efficiencies, drug contents, zeta potentials, pH, scanning electron microscopy and differential scanning calorimetry analyses. The photostability under UVA radiation was evaluated after irradiation of formulations in a box of mirror for 15 days. The formulations containing simultaneously quercetin and octyl methoxycinnamate maintained relatively higher concentrations after UVA exposure compared to the solutions. The nanoencapsulation of quercetin and octyl methoxycinnamate delayed the photodegradation of both components. Quercetin was stabilized in a higher extension in octyl methoxycinnamate-formulations than in the nanocapsules prepared with triglycerides as oil core. Furthermore, octyl methoxycinnamate was more efficient in stabilizing quercetin as a consequence of its higher concentration in the formulation.

Key words: UVA, nanocapsules, quercetin, octyl methoxycinnamate and stability.

## Graphical Abstract



## 1. Introduction

Colloidal drug carriers such as nanocapsules, nanoemulsions, nanospheres and solid lipid nanoparticles have received increasing interest in the last years as vehicles for topical administration of drugs<sup>1-3</sup>. Polymeric nanocapsules are defined as an oil core surrounded by a thin polymer wall<sup>4</sup>. These systems presenting diameters between 200 and 500 nm are stabilized by surfactants at the particle/ water interface and can be prepared using methods based on the polymerization of dispersed monomers or the dispersion of a preformed polymer<sup>5,6</sup>.

Nanocapsules have a number of advantageous features for cutaneous administration. The small particle sizes allow close contact with the stratum corneum and they can increase the amount of encapsulated substance penetrating into the skin<sup>7,8</sup>. Besides, they can chemically stabilize labile drugs by incorporating them in the vesicles<sup>9</sup>. Concretely, according to Jiménez and co-workers<sup>10</sup> the nanocapsules have been introduced as the new generation of innovative carriers for cosmetics, especially for UV blockers for the use on human skin and/or hair.

Sun exhibition can have serious consequences on skin as actinic aging or something worse: sunburn, photoaging and different types of skin cancers according to the proportion and length of exhibition<sup>11,12</sup>. In consequence, it is essential to apply sunscreens before sun exposition in order to avoid the UV effects. The effectiveness of sunscreen formulations depends on either their affinity for the stratum corneum forming a protective film<sup>10</sup> or the photostability of sunscreen agent<sup>3</sup>. Indeed, the UV sunscreens do not remain intact under irradiation; instead, they undergo photolysis either leading to inactive derivatives or even to toxic degradation products<sup>13</sup>.

The radiation UVA is responsible for acute reactions such as sunburn in 18 to 20 %. The primary biological actions of UVA involve DNA damage, mediated through absorption of UVA by other molecules present in the epidermis cells (NADPH, ubiquinone, riboflavin). These molecules on photoexcitation from 320 to 400 nm radiation interact with molecular oxygen to produce reactive forms of oxygen in the epidermal cells. This scientific evidence indicates that reactive forms of oxygen (ROS), including free radicals, participate in acute and chronic response of skin evoked by UVA radiation, such as sunburn, inflammation, skin pigmentation and skin carcinogenesis and cutaneous photoaging<sup>14,15</sup>. During the process of oxidation lipid peroxide radicals, lipid hydroperoxides and the lipid fragmentation products that are themselves active oxidizing agents, are formed<sup>14</sup>.

Quercetin is a flavonoid that presents significant antioxidant effect by scavenging oxygen radicals<sup>14,16-20</sup> and it is largely used in cosmetic formulations<sup>21-24</sup>.

Temperature and light are the major factors influencing its antioxidant activity during storage, since a reduction in the free radical-scavenging activity occurs due to its degradation<sup>20</sup>. Inal and co-workers<sup>14</sup> have shown that exposure of rats to UVA leads to oxidative stress as reflected by increased malondialdehyde levels and reduced enzymatic antioxidant levels. It has also been shown that quercetin may be useful in reducing or preventing photobiologic damage.

Octyl methoxycinnamate (OMC) is a widely used sunscreen in several cosmetic formulations because of its large extinction coefficient at the UVB regions in various solvents<sup>25</sup>. However, OMC is light sensitive and it degrades by changing its configuration from *E*-octyl *p*-methoxycinnamate to *Z*-octyl *p*-methoxycinnamate<sup>25</sup>.

Photounstable filters are capable of producing reactive intermediates when they come into direct contact with the skin, where they may behave as photo-oxidants or



may also promote phototoxic or photoallergic contact dermatitis<sup>26-28</sup>. This is one reason for the development of photostable sunscreen formulations with OMC.

Recently, OMC has been associated to polymeric nanocapsules prepared using poly( $\epsilon$ -caprolactone) aiming different objectives. The influence of polysorbate 85 and Poloxamer 188 as stabilizing agents of nanocapsules containing OMC on the characteristics of formulations has been evaluated in terms of sunscreen loading capacity and photoprotective potential of nanoparticles<sup>7</sup>. Polysorbate 85 stabilized better the nanocapsules than Poloxamer 188<sup>®</sup>; and the nanocapsules were more effective concerning the protection against UV-induced erythema compared to the free sunscreen, probably due to the formation of a film on the skin surface.

Although the usefulness of sunscreens in preventing sunburn erythema, they are not able to provide free radical protection. To circumvent this limitation, OMC has been combined with an antioxidant, the piperidine nitroxide. This novel sunscreen–antioxidant was able to absorb in the UVB region after UVA irradiation, to act as free radical scavenger, as well as to reduce both UVA sunlight and lipid peroxidation<sup>29</sup>. Taking into account all these findings, the aim of the present work was to evaluate the ability of the nanoencapsulation in protecting both OMC and QUE, from degradation that follows the UVA radiation exposure.

## **2. Materials and Methods**

### *Chemicals and solvents*

Quercetin (QUE) was obtained from Henrifarma (São Paulo, Brazil). Octyl methoxycinnamate (OMC, Parsol<sup>®</sup> MCX) was purchased from Fraccionata (Porto Alegre, Brazil). Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) [65,000 g.mol<sup>-1</sup>] was supplied by Sigma-Aldrich (Strasbourg, France). Sorbitan monostearate (Span 60<sup>®</sup>) and polysorbate 80

(Tween 80) were acquired from Delaware (Porto Alegre, Brazil), Epikuron 170<sup>®</sup> was obtained from Lucas-Meyer (Hamburg, Germany) and Miglyol 810<sup>®</sup> (caprylic/capric triglycerides) from Hulls (Puteaux, France). All other chemicals and solvents used were of pharmaceutical grade. All reagents were used as received.

#### *Preparation of nanocapsule suspensions by interfacial deposition*

Nanocapsules were prepared as described by Fessi and co-workers<sup>30</sup>. Briefly, the lipophilic solution consisted of 0.8 mL of oil (OMC or Miglyol 810<sup>®</sup>), 0.250 g PCL, 0.025 g of QUE, 0.190 g of surfactant (Epikuron 170<sup>®</sup> or Span 60<sup>®</sup>) and 66.5 mL of acetone. This organic phase was added under magnetic stirring into an aqueous solution (133.2 mL) containing or not 0.190 g surfactant (Tween 80). Acetone was removed and the suspension concentrated by evaporation under reduced pressure. The final volume of suspension was adjusted to a total volume of 25.0 mL corresponding to 1 mg/mL of QUE and 30 mg /mL of OMC. Different formulations were prepared (Table 1) varying the type of the oil phase and the surfactants. Solutions of QUE or OMC in methanol (100 %) and in methanol:water (80:20 v/v) were also prepared as controls.

[Insert Table 1]

#### *Characterization of suspensions*

The physicochemical analyses of nanocapsules were carried out immediately after preparation and 15 days under UVA radiation exposure. The pH values of suspensions were determined using potentiometer B474 (Micronal, Brazil). The

mean size and the polydispersion were measured by photon correlation spectroscopy (PCS). For PCS measurements, 20  $\mu$ L of each suspension were diluted to 10 mL with water (MilliQ<sup>®</sup>). Measurements were made at room temperature (20 °C), using a Zetasizer<sup>®</sup> nano-ZS 3600 (Malvern, EUA). The zeta potential were determined after dilution of the samples in 1 mM NaCl aqueous solution.

#### *Transmission electron microscopy*

Analyses were conducted by transmission electron microscopy (TEM; Jeol, JEM 1200 Exll, *Centro de Microscopia - UFRGS*) operating at 80 kV. The diluted suspensions were deposited in Formvar-Carbon support films on specimen grid (Electron Microscopy Sciences), negatively stained with uranyl acetate solution (2% m/v) and observed at 100.000 and 250.000 x of magnification.

#### *Determination of QUE and OMC content in nanocapsule suspensions*

QUE content was assayed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The system consisted of a UV/PDA Shimadzu detector, a LC-10ADVP- Shimadzu pump and auto-injector Auto sampler Shimadzu (Kyoto, Japan) and Sphere- 5<sup>®</sup> RP 8 4.6 x 250 mm Perkin Helmer column. The mobile phase consisted of 0.16 M methanol/phosphoric acid (60:40 v/v) at pH 2.7. The total sample volume injected was 20  $\mu$ L and QUE was detected at 362 nm. Free QUE (non-associated) was determined in the ultrafiltrate after separation of the nanocapsules by ultrafiltration-centrifugation technique (Ultrafree-MC 10,000 MW, Millipore) at 12.000 rpm for 10 min. Total QUE was measured by HPLC after the dissolution of nanocapsules by

acetonitrile. The associated QUE with the nanocapsules (encapsulation efficiency) was calculated from the difference between the total and the free drug concentrations measured in the nanocapsule suspension and in the ultrafiltrate, respectively. OMC was quantified by UV spectroscopy (Genesys, New York, USA) at 310 nm in methanol.

#### *Differential Scanning Calorimetry (DSC)*

Nanoparticle suspensions were maintained on a glass slide at room temperature and protected from natural light until water evaporation. DSC curves of the evaporated formulations and their raw materials were obtained using a DSC-4 (Perkin-Elmer, USA) calibrated with indium, as standard. Samples were weighed less than 10 mg and put into aluminum pans. All the experiments were performed from  $-20$  to  $100$  °C at a scanning rate of  $10$  °C/min. Thermograms were obtained by the first heating cycle.

#### *Swelling experiments*

Films of polymer were prepared by squeezing the molten pellet in a heat hydraulic press Paul Weber, PW 10- PW 40 (Grunbach, Germany) at  $60$  °C, 5kN during about 5 min. For experiments, one piece of each film was exactly weighed in a glass flask. Each piece ( $n = 3$ ) was covered with sufficient OMC. The flasks were closed and stored at room temperature. At pre-determined time intervals (2, 4, 6, 8 and 13 days), the films were sieved and OMC removed using absorbing paper, thereafter the films were weighed<sup>31</sup>.

### *Stability under UVA radiation*

After preparation, the formulations were placed in transparent quartz cells with 10 mm optical path and exposed to UVA radiation. Fluorescent lamps BLB (blacklight blue lamps, 130 V and 30 W) produced by ORION were used as UVA source. Black light lamp emits up to 2.5 % UVB and 97.5 % UVA. The cells were irradiated in a box of mirror for 15 days. The formulations were placed at a distance of 16 cm from the fluorescent lamps. UV irradiation at this distance was  $16 \text{ W/m}^2$  and the total dose was  $138.24 \text{ J/cm}^2$  per day.

### **3. Results and Discussion**

Nanocapsules were stabilized by two different surfactant systems: exclusively Epikuron 170<sup>®</sup> or a mixture of Span 60<sup>®</sup> and polysorbate 80. Formulations containing exclusively QUE were also prepared using Miglyol 810<sup>®</sup> as oil core (NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE and NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE). Epikuron 170<sup>®</sup> was chosen due to its ability in protecting labile substances against oxidation after light exposure<sup>32,33</sup>. Span 60<sup>®</sup> and polysorbate 80 were used because they are commonly applied in the nanocapsule compositions due to their nonionic characteristics<sup>9,31,34-36</sup>.

All formulations presented macroscopic homogeneous appearance like a milky white bluish opalescent fluid (Tyndall effect) in accordance with the results reported in the literature for nanocapsule formulations<sup>5</sup>. The nanocapsule suspensions presented particle sizes (Table 2) from 208 to 544 nm in agreement with the range normally observed (from 200 to 500 nm) for nanocapsule formulations prepared using the

nanoprecipitation method<sup>37</sup>. TEM analyses showed spherical shaped particles with rugged surface (Figure 1).

[Insert Table 2]

Concerning the size of nanocapsules after preparation, similar results were observed for NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE/OMC ( $208 \pm 10$  nm) and NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE/OMC ( $243 \pm 3$  nm). In both cases the values remained in the same range after 15 days under UVA radiation ( $218 \pm 7$  and  $204 \pm 3$ , respectively) indicating that both surfactant systems were able to physically stabilize the suspensions. Formulations containing only QUE (NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE and NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE) showed particle size of  $222 \pm 6$  nm and  $544 \pm 17$  nm, respectively. The higher mean diameter verified for the NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE can be attributed to the low solubility of QUE in Miglyol 810<sup>®</sup>. In the contrast, the formulations containing exclusively OMC (NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-OMC, NC-Span 60<sup>®</sup>-OMC) showed similar sizes ( $313 \pm 6$  nm and  $312 \pm 11$  nm, respectively) being both values higher than those observed for the similar formulations prepared using QUE and OMC. For these formulations the size values were  $208 \pm 10$  nm for NC-Epikuron170<sup>®</sup>-QUE/OMC and  $243 \pm 3$  nm for NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE/OMC. The mean size diameter for the formulation prepared with QUE (NC-Epikuron170<sup>®</sup>-QUE) slightly increased after 15 days ( $252 \pm 7$  nm). Similar results were observed for the formulations prepared with OMC ( $466 \pm 11$  nm for NC-Epikuron170<sup>®</sup>- OMC and  $430 \pm 10$  nm for NC-Span 60-OMC) indicating particle aggregation after 15 days.

All the formulations showed pH values between 4 e 6. The formulations prepared with Epikuron170<sup>®</sup> showed pH values more acid than the suspensions prepared

using Span 60. The nanocapsules containing QUE presented pH values more constant during 15 days of storage than the other formulations. These results could be attributed to the QUE antioxidant capacity, which can prevent the formation of oxidation products that are able to cause pH variations<sup>38,39</sup>.

Regarding the zeta potential, all formulations presented negative values (from -21 mV to -56 mV), probably in consequence of the negative density of the carboxylate groups present in poly( $\epsilon$ -caprolactone) backbone and the presence of phosphatidic acid in Epikuron170<sup>®</sup> formulation. Zeta potential values lower than -30 mV or higher +30 mV are indicative of relative stable systems due to the repulsion of the particles, which prevent their agglomeration<sup>5</sup>. The zeta potential values verified for the formulations prepared with polysorbate 80 and Span 60<sup>®</sup> were compatible with the literature<sup>6</sup>. On the other hand, the low values for the formulations prepared with Epikuron170<sup>®</sup> can be explained by the higher concentration of phosphatidic acid present in this lipophilic surfactant<sup>32</sup>.

Nanocapsules and their raw materials were also evaluated by DSC. The first heating cycle was analyzed in order to verify the influence of the nanocapsule morphology on the thermal behavior of its components. According to Figure 2, Miglyol<sup>®</sup>, Span 60<sup>®</sup> and PCL raw materials presented melting peaks at -5.5 °C, 53.5 °C and 56.4 °C, respectively, while the thermograms of OMC and Epikuron 170<sup>®</sup> did not show any melting peak.

Figure 3 shows the thermograms of the nanocapsule suspensions. In a general way, the presence of QUE did not influence the thermal behavior of nanocapsules. The formulations containing Miglyol 810<sup>®</sup> (NC-Epikuron 170<sup>®</sup>, NC-Span 60<sup>®</sup>, NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE and NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE) showed its melting peak between -4.6 °C and -4.0 °C and PCL melting peak ranging from 49.3 °C to 52.6 °C. NC-Span 60<sup>®</sup> and NC-

Span 60<sup>®</sup>-QUE did not show the melting of Span 60<sup>®</sup>. In previous works, we proposed a model for the molecular organization of similar nanocapsule formulations containing Span 60<sup>®</sup> and Miglyol 810<sup>®9,40,41</sup>. This model was based on the DSC analyses (second heating) and on small angle X-ray scattering analysis. These previous results indicated that Span 60<sup>®</sup> is interacting with Miglyol 810<sup>®</sup> in the lipophilic core. After first heating DSC analysis (Figure 3), the Miglyol 810<sup>®</sup> melting peak shifted to upper temperatures, as well as the PCL melting slightly shifted to lower temperatures (close to 52 °C) for all formulations containing Miglyol 810<sup>®</sup> independently of the use of Span 60<sup>®</sup> or Epikuron 170<sup>®</sup> (Table 3). Recently we described the chemical composition of the particle/water interface of nanocapsules prepared with fluorescent-labeled poly(methyl methacrylate), Miglyol 810<sup>®</sup>, Span 60<sup>®</sup> and polysorbate 80<sup>4</sup>. The poly(methyl methacrylate) at the interface is molecularly interacting with the lipophilic core and the water, even though a swelling experiment, carried out with the polymer in water or the polymer in Miglyol 810<sup>®</sup> showed no difference in weight after 60 days for both cases. In this way, despite the swelling experiment performed with PCL and Miglyol 810<sup>®</sup> showed no weight variation after 13 days<sup>31</sup>, the DSC data (Figure 3) suggest that the polymer is in part interacting with the lipophilic core in the NC-Epikuron 170<sup>®</sup>, NC-Span 60<sup>®</sup>, NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE and NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE formulations.

Regarding the formulations prepared with OMC, the PCL melting peak shifted to values between 31.5 °C and 41.2 °C. The swelling experiment performed with PCL and OMC demonstrated that the weight of the PCL film was constant after 13 days. Even though the macroscopic film of PCL did not swell, the polymer at the particle/water interface of nanocapsules is interacting with the lipophilic core. NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-OMC, NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE/OMC and NC-Span 60-QUE/OMC



showed two maxima for the PCL melting probably due to the heterogeneity of the PCL crystallites.

Both OMC and QUE can undergo degradation by oxidation reaction<sup>14,18,20,25</sup>. Figure 4 shows QUE contents in the nanocapsule formulations after preparation and 15 days of exposure to UVA light. In order to study the ability of nanoencapsulation in protecting the QUE from UVA degradation, solutions containing QUE in methanol and methanol/water (80:20) were also evaluated.

After preparation and after 3 days of storage, the formulations NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE/OMC; NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE/OMC, QUE-methanol solution and QUE-methanol:water (80:20 v/v) solution showed QUE contents higher than 90 % (Figure 3). However, the formulations containing exclusively QUE (NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE and NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE) presented drug contents of 50 % and 63 %, respectively. For the formulation NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE/OMC, after 6 days of storage, the QUE content was 73 %, being this value similar to that observed for the QUE-methanol and for the QUE- methanol: water (80:20 v/v) solutions (Figure 3). The presence of OMC in the formulations NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE/OMC and NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE/OMC prevented the QUE degradation, stabilizing, at least partially, this flavonoid. Only the formulation prepared with Span 60<sup>®</sup> and QUE/OMC (NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE/OMC) presented drug content above 90 % after 15 days, being the chemically most stable formulation.

The similar nanocapsule formulation prepared exclusively with QUE, in the absence of OMC (NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE), showed drug content around 50 % after 15 days of storage (Figure 4), indicating that OMC acted as stabilizer of QUE (NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE/OMC). Additionally, the comparison between the formulations prepared with

Span 60<sup>®</sup> and Epikuron 170<sup>®</sup> showed that Span 60<sup>®</sup> is more effective as a chemical stabilizer of QUE than Epikuron 170<sup>®</sup>.

Figure 5 shows OMC contents in the nanocapsule formulations after preparation and after 15 days under UVA radiation. After preparation all formulations presented OMC contents higher than 90 %. After 3 days the formulations NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-OMC and NC-Span 60<sup>®</sup>-OMC presented OMC contents close to 50 %. All the other formulations and the solutions maintained OMC contents higher than 90 %.

After 6 days, the formulations NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE/OMC and NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE/OMC showed contents of OMC higher than 70 %, while the OMC methanol solution and NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-OMC presented OMC contents of 57 % and 43 %, respectively. The OMC methanol-water (80:20 v/v) solution and NC-Span 60<sup>®</sup>-OMC showed OMC values close to 30 %. Briefly, the association of QUE and OMC is useful to improve the photostability of both of them against UVA radiation.

#### **4. Conclusions**

The formulations containing QUE and OMC maintained relatively higher concentration of them after UVA exposure compared to the solutions. The nanoencapsulation of QUE and OMC delayed the photodegradation of both components. QUE was stabilized in a higher extension in OMC-formulations than in the nanocapsules prepared with triglycerides. Furthermore, OMC was more efficient in stabilizing QUE because it is employed in a higher concentration in the formulation.

**Acknowledgements:** Rede Nanocosméticos CNPq/MCT, CNPq/Brasília-Brasil, FINEP/MCT.

## 5. References

1. E. Allémann, R. Gurny, E. Doelker, Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size, *Int. J. Pharm.* 87, 247-253 (1992).
2. N.S. Santos-Magalhães, H. Fessi, F. Puisieux, S. Benita, A. Baszkin, M. Seiller, An in vitro release kinetic examination and comparative evaluation between submicron emulsion and polylactic acid nanocapsules of clofibrade, *J. Microencapsul.* 12, 195-205 (1995).
3. S.A. Wissing, R.H. Müller, Solid lipide nanoparticles (SLN)- a novel carrier for UV blockers, *Pharmazie.* 56, 783-786 (2001).
4. A. Jäger, V. Stefani, S.S. Guterres, A.R. Pohlmann, Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes, *Int. J. Pharm.* doi:10.1016/j.ijpharm.2007.01.051 (2007).
5. P. Couvreur, G. Barratt, E. Fattal, P. Legrand, C. Vauthier, Nanocapsule Technology: A Review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 19, 99-134 (2002).
6. S. R. Schaffazick, S.S. Guterres, L. Lucca-Freitas, A.R. Pohlmann, Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos, *Quim. Nova.* 26, 726-737 (2003).
7. R. Alvarez-Román, G. Barre, R.H. Guy, H. Fessi, Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 191-195 (2001).
8. M.P. Alves, A. L. Scarrone, M. Santos, A. R. Pohlmann, S.S. Guterres, Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Int. J. Pharm.* doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.03.031 (2007).

9. C.R. Müller, S.R. Schaffazick, A.R. Pohlmann, L.L. Freitas., N.P. Silveira, T. Dalla-Costa, S.S. Guterres, Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization, *Pharmazie*. 56, 864-867 **(2001)**.
10. M.M. Jiménez, J. Pelletier, M.F. Bobin, M.C. Martini, Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate, *Int. J. Pharm.* 272, 45-55 **(2004)**.
11. G. Berset, H. Gonzenbach, R. Christ, R. Martini, A. Deflandre, R.E. Mascotto, J.D.R. Jolley, W. Lowell, R. Pelzer, T. Stiehm, Proposed protocol for determination of photostability. Part I: cosmetic UV filters, *Int. J. Cosmet. Sci.* 18, 167-177 **(1996)**.
12. V. Vanquerp, C. Rodriguez, C. Coiffard, L.J.M. Coiffard, High-performance liquid chromatographic method for the comparison of the stability of five sunscreen agents, *J. Chromatogr. A.*, 832, 273-277 **(1999)**.
13. R.G. Van der Molen, H.M.H. Hurks, C. Out-Luting, F. Spies, J.M. Noordende, H.K. Koerten, A.M. Momas, Efficacy of micronized titanium dioxide-containing compounds in protection against UVB-induced immunosuppression in humans, *Photochem. Photobiol.* 44, 143 **(1999)**.
14. M.E. Inal, A. Kahramant, T. Kokent, Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A, *Clin. Exp. Dermatol.* 26, 536-539 **(2001)**.
15. M.A. Pathak, In: *Sunscreen: Development, Evaluation, and Regulatory Aspects*, Edited N.J. Lowe, N.A. Shaath, M.A. Pathak, Marcel Dekker, New York **(1997)**, pp. 3-31.

16. F.M. Areias, A.C. Rego, C.R. Oliveira, R.M. Seabra, Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/ Fe +2- induced oxidative stress in culture retinal cells, *Biochem. Pharmacol.* 62,111-118 **(2001)**.
17. K. Gomathi, D. Gopinath, Rafiuddin, M. Ahmed, R. Jayakumar. Quercetin incorporates collagen matrices for dermal wound healing process in rat, *Biomaterials.* 24, 2767-2772 **(2003)**.
18. K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, Flavonoid antioxidants:chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584 **(2002)**.
19. A. Kootstra, Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids, *Plant Mol. Biol.* 26, 771-774 **(1994)**.
20. A. Moure, J.M. Cruz, D. Franco, J. M. Dominguez, J. Sineiro, H. Dominguez, M.J. Núñez, J.C. Parajó, Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 71, 145-144 **(2001)**.
21. J. Arct, A. Oborska, M. Mojski, A. Binkowska, B. Swidzikowska, Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. *Int. J. Cosm. Sci.* 24, 357-366 **(2002)**.
22. G. Heinrich, A. Schomann, F. Staeb, U. Schoenrock, A. Doerschner, Cosmetic or dermatological photoprotection compositions containing flavone and/or flavanone derivatives and benzotriazoles. *Ger. Offen, CODEN: GWXXBX de 19923713 A1 20001123 CAN 134:9157 AN 2000:822603 CAPLUS* **(2000)**.
23. Hideaki, M. Cosmetic compositions containing quercetin derivatives and blood circulation promoters. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho CODEN: JKXXAF JP 2004026740 A2 20040129 CAN 140:116986 AN 2004:76481 CAPLUS* **(2004)**.

24. Hoffmann, H. W. Cosmetic and dermatologic compositions containing quercetin, rutin, salicin, and escin. Ger. Offen. CODEN: GWXXBX DE 10034328 A1 0020131 CAN 136:123417 AN 2002:83975 CAPLUS **(2002)**.
25. S. Patanaargson, P. Limphong, Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product, Int. J. Cosm. Sci. 23, 153-160 **(2001)**.
26. S.T. Butt, T. Christensen, Toxicity and phototoxicity of chemical sun filters, Radiat. Prot. Dosim. 91, 283-286 **(2000)**.
27. M. Cambon, N. Issachar, D. Castelli, C. Robert, An *in vivo* method to assess the photostability of UV filters in a sunscreen, J. Cosmet. Sci. 52, 1-11 **(2001)**.
28. J. Gerhard, S. H. Nohynek, Benefit and risk of organic ultraviolet filters, Regul. Toxicol. Pharmacol. 33, 285-299 **(2001)**.
29. E. Damiani, P. Astofoli, L. Cionna, F. Ippoliti, L. Greci, Synthesis and application of a novel sunscreen-antioxidant, Free Radic. Res. 40, 485-494 **(2006)**.
30. H. Fessi, F. Puisieux, J-Ph. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, Int. J. Pharm. 55, R1-R4 **(1989)**.
31. S.S. Guterres, V. Weiss, L. L. Freitas, A. R. Pohlmann, Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin, Drug Delivery. 7, 195-199 **(2000)**.
32. V. C, F. Mosqueira, P. Legrand, H. Pinto-Alphandary, F. Puisieux, G. Barratt, Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process:

- influence of the composition on physicochemical and structural properties, *J. Pharm. Sci.* 89, 614-626 **(2000)**.
33. C. R. Müller, S.E. Haas, V.L. Bassani, S.S. Guterres, H. Fessi, M.C. R. Peralba, A.R. Pohlmann, Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas, *Quim. Nova*, 27, 555-560, **(2004)**.
34. R. Alvaréz-Román, A. Naik, Y.N. Kalia, R. Guy, H. Fessi, Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles, *Pharm. Res.* 21, 1818-1825 **(2004)**.
35. R. C. R. Beck, S. E. Haas, S.S. Guterres, M.I Ré, E. V. Benvenuti, A.R. Pohlmann, Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation, *Quim. Nova.* 29, 990-996 **(2006)**.
36. S. R. Schaffazick, A. R. Pohlmann, G. Mezzalira, S. S. Guterres, Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin, *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 562-569 **(2006)**.
37. B. Magenheimer, S. Benita, Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach, *STP Pharma Sci.* 1, 221-241 **(1991)**.
38. J.B. Harbone, C.A. Williams, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry.* 55, 481-504 **(2000)**.
39. S. Javernik, S. Kreft, B. Strukelj, F. Vrečer, Oxidation of lovastatin in the solid state and its stabilization with natural antioxidants, *Pharmazie.* 56, 738-740 **(2001)**.
40. L. Cruz, L.U. Soares, T. Dalla Costa, G. Mezzalira, N.P. Da Silveira, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers, *Int. J. Pharm.* 313, 198-205 **(2006)**.

41. L. Cruz, S.R. Schaffazick, T. Dalla Costa, L.U. Soares, G. Mezzalira, N.P. Da Silveira, E.E.S. Schapoval, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Physico-chemical characterization and *in vivo* evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity, J. Nanosci. Nanotechnol. 6, 3154-3162 (2006).



Table 1: Nanocapsule formulations and their components.

<b>Formulations</b>	<b>Components</b>
NC-Epikuron 170 <sup>®</sup> -QUE/OMC	QUE, OMC and Epikuron 170 <sup>®</sup>
NC-Span 60 <sup>®</sup> -QUE/OMC	QUE, Polysorbate 80, OMC, Span 60 <sup>®</sup>
NC-Epikuron 170 <sup>®</sup> -QUE	QUE, Epikuron 170 <sup>®</sup> and Miglyol 810 <sup>®</sup>
NC-Span 60 <sup>®</sup> -QUE	QUE, Polysorbate 80, Span 60 <sup>®</sup> and Miglyol 810 <sup>®</sup>
NC-Epikuron 170 <sup>®</sup> -OMC	OMC and Epikuron 170 <sup>®</sup>
NC-Span 60 <sup>®</sup> -OMC	OMC, Polysorbate 80 and Span 60 <sup>®</sup>

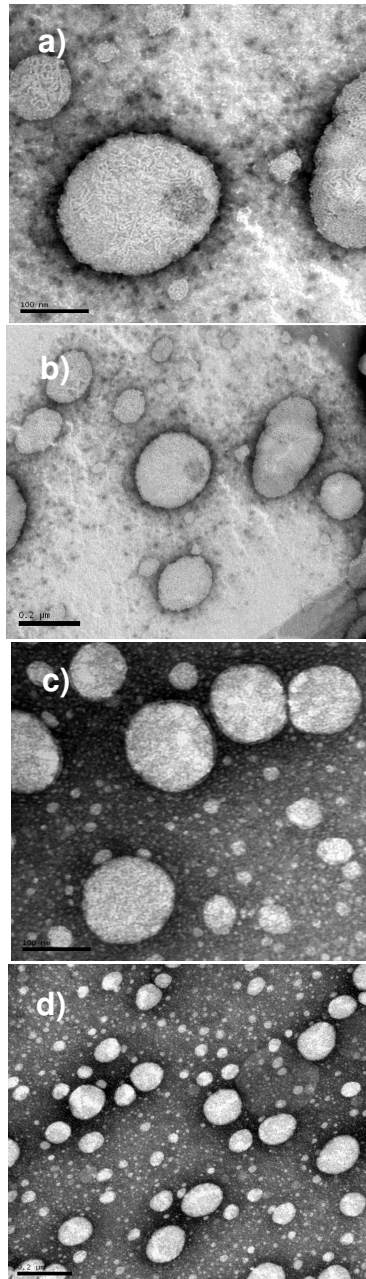
\* All the formulations were prepared using poli ( $\epsilon$ -caprolactone) [65,000 g.mol<sup>-1</sup>] as polymer.

Table 2. Mean particle sizes and zeta potentials.

Preparations	Size (nm $\pm$ S.D)		Zeta potential (mV $\pm$ S.D)	
	After preparation	After 15 days	After preparation	After 15 days
NC-Epikuron170 <sup>®</sup> - QUE/OMC	208 $\pm$ 10	218 $\pm$ 7	-47 $\pm$ 4	-53 $\pm$ 2
NC-Span 60 <sup>®</sup> -QUE/OMC	243 $\pm$ 3	204 $\pm$ 3	-21 $\pm$ 1	-23 $\pm$ 1
NC-Epikuron170 <sup>®</sup> -QUE	222 $\pm$ 6	252 $\pm$ 7	-47 $\pm$ 1	-51 $\pm$ 2
NC-Span 60 <sup>®</sup> -QUE	544 $\pm$ 17	342 $\pm$ 21	-28 $\pm$ 2	-39 $\pm$ 1
NC-Epikuron170 <sup>®</sup> -OMC	313 $\pm$ 6	466 $\pm$ 11	-56 $\pm$ 1	-56 $\pm$ 1
NC-Span 60 <sup>®</sup> -OMC	312 $\pm$ 11	430 $\pm$ 10	-27 $\pm$ 1	-46 $\pm$ 1

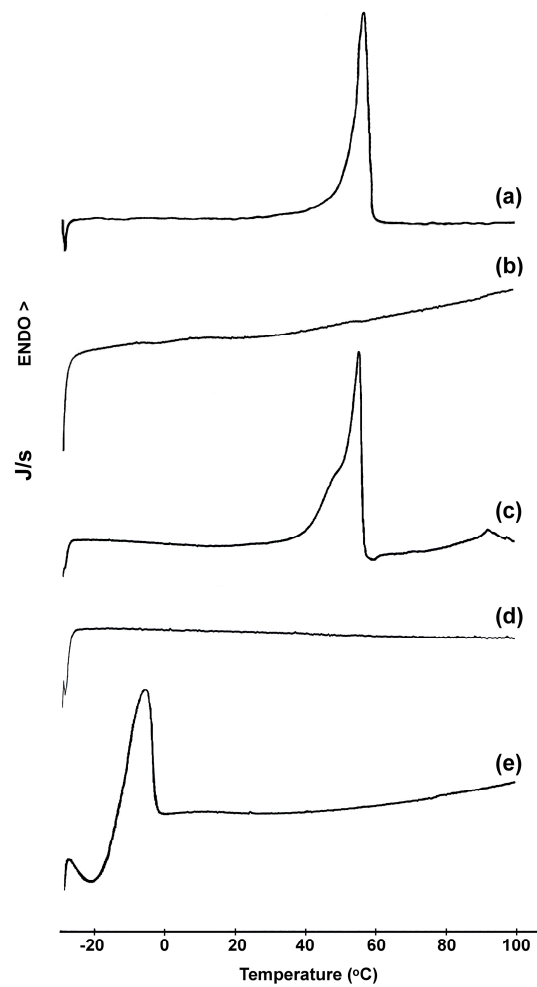
Table 3: Melting temperatures of nanocapsule suspensions, obtained by differential scanning calorimetry (first heating cycle).

<b>Formulation</b>	<b>Peak 1 (°C)</b>	<b>Peak 2 (°C)</b>	<b>Peak 3 (°C)</b>
NC-Epikuron 170 <sup>®</sup> /OMC	---	32.6; 38.1	---
NC-Span 60 <sup>®</sup> /OMC	---	41.2	---
NC-Epikuron 170 <sup>®</sup>	-4.5	---	52.6
NC-Span 60 <sup>®</sup>	-4.0	---	52.6
NC-Epikuron 170 <sup>®</sup> -QUE/OMC	---	31.5; 38.0	---
NC-Span 60 <sup>®</sup> -QUE/OMC	---	36.2; 40.7	---
NC-Epikuron 170 <sup>®</sup> -QUE	-4.6	---	49.3; 51.4
NC-Span 60 <sup>®</sup> -QUE	-4.3	---	52.4



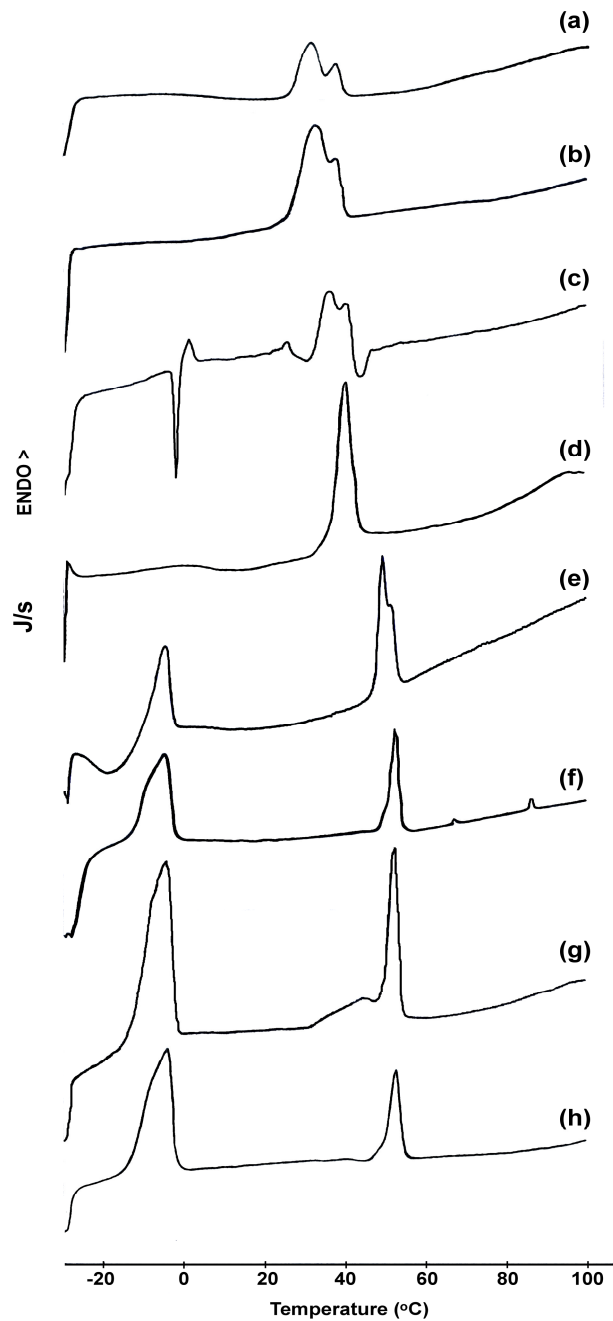
Weiss-Angeli, V. Nanoencapsulation of quercetin using octyl methoxycinnamate as oil core in nanocapsules delayed the photodegradation of both components under UVA radiation

Figure 1. TEM images of NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE/OMC (a) (bar = 100 nm) and (b) (bar = 200 nm), and NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE/OMC (c) (bar = 100 nm) and (d) (bar = 200 nm).



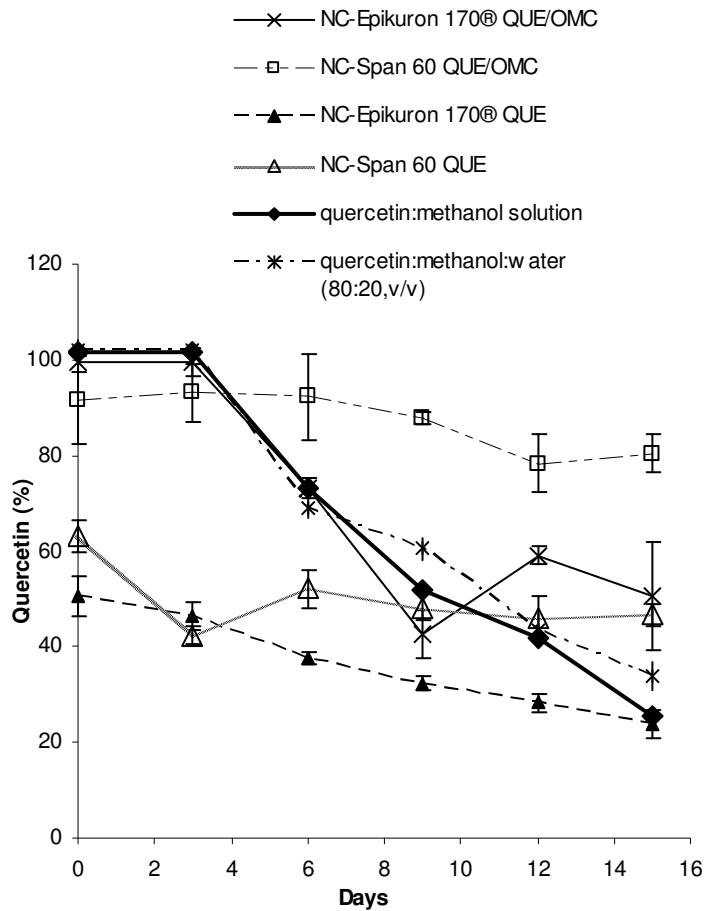
Weiss-Angeli, V. Nanoencapsulation of quercetin using octyl methoxycinnamate as oil in nanocapsules delayed the photodegradation of both components under UVA radiation

Figure 2. DSC thermograms of (a) PCL, (b) Epikuron 170<sup>®</sup>, (c) Span 60<sup>®</sup>, (d) OMC, and (e) Miglyol 810<sup>®</sup> (first heating cycle, 10 °C/min).



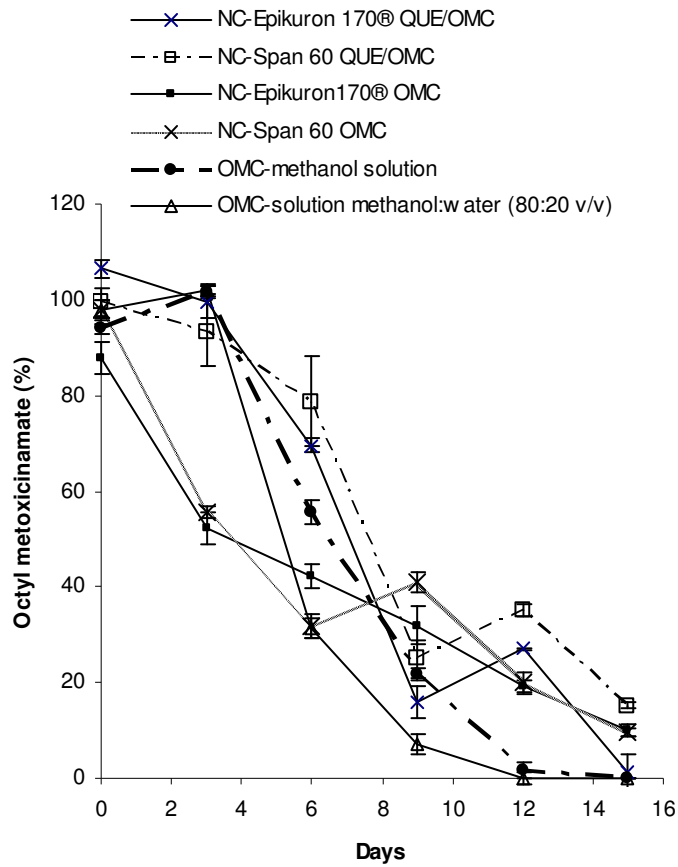
Weiss-Angeli, V. Nanoencapsulation of quercetin using octyl methoxycinnamate as oil in nanocapsules delayed the photodegradation of both components under UVA radiation

Figure 3. DSC thermograms of (a) NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE/OMC, (b) NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-OMC, (c) NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE/OMC, (d) NC-Span 60<sup>®</sup>-OMC, (e) NC-Epikuron 170<sup>®</sup>-QUE, (f) NC-Epikuron 170<sup>®</sup>, (g) NC-Span 60<sup>®</sup>-QUE, and (h) NC-Span 60<sup>®</sup> (first heating cycle, 10 °C/min).



Weiss-Angeli, V. Nanoencapsulation of quercetin using octyl methoxycinnamate as oil in nanocapsules delayed the photodegradation of both components under UVA radiation

Figure 4. QUE contents in the nanocapsule suspensions after preparation and 15 days under UVA radiation.



Weiss-Angeli, V. Nanoencapsulation of quercetin using octyl methoxycinnamate as oil in nanocapsules delayed the photodegradation of both components under UVA radiation

Figure 5. OMC contents in the nanocapsule suspensions after preparation and after 15 days under UVA radiation.



## *CAPÍTULO III*

*Avaliação do potencial antioxidante de  
suspensões de nanocápsulas em modelos de  
células de *Saccharomyces cerevisiae**

---

### 3.1 Introdução

O presente capítulo tem por objetivo a preparação e avaliação da capacidade antioxidante de suspensões de nanocápsulas contendo quercetina e metoxicinamato de octila, preparadas com diferentes tensioativos (Span 60<sup>®</sup> e Epikuron 170<sup>®</sup>).

O envelhecimento cutâneo e algumas patologias de pele estão relacionados com geração de radicais livres oriundos da exposição solar. Estes radicais livres são capazes de reagir com lipídeos de membranas celulares, comprometendo a estrutura celular (Darr, 1997). Dessa forma, a utilização de filtros solares capazes de inibir a ação das radiações solares é imprescindível (Jiménez *et al.*, 2004b). Além disso, a presença de substâncias antioxidantes em formulações destinadas à fotoproteção também se reveste de significado, uma vez que estas podem capturar os radicais livres gerados, minimizando os efeitos nocivos da radiação solar (Bonina *et al.*, 1996; Casagrande *et al.*, 2006).

Dessa forma, no presente trabalho, a associação de um flavonóide de ação antioxidante (quercetina) e um filtro solar químico (metoxicinamato de octila), foi proposta visando realizar uma proteção da pele da ação dos radicais livres que eventualmente poderão ser gerados devido à radiação solar. Para tal, este trabalho utilizou células de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para a avaliação do potencial antioxidante, sistema amplamente descrito na literatura, no entanto, pela primeira vez testado, para suspensões de nanocápsulas.

*PUBLICAÇÃO 2: Antioxidant effect of nanocapsules containing quercetin and octyl methoxycinnamate.*

Artigo a ser submetido



**Antioxidant effect of nanocapsules containing quercetin and octyl  
methoxycinnamate**

V. Weiss-Angeli <sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000. Porto Alegre, R.S, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

A. R. Pohlmann<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

M. Salvador <sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

S.S. Guterres<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000. Porto Alegre, R.S, Brasil.

## **Abstract**

The goal of this study was to evaluate the antioxidant activity of quercetin (QUE) and octyl methoxycinnamate (OMC) loaded nanocapsules using a biological system composed of *Saccharomyces cerevisiae* cells. Hydrogen peroxide was used as a stressor agent. In this study, we prepared nanocapsules of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) by nanoprecipitation. The lipophilic solution contained OMC, QUE, and Span 60<sup>®</sup>/ Epikuron 170<sup>®</sup> in acetone. The aqueous phase contained Tween 80. The nanocapsules presented particle size between 208 and 315 nm and a negative zeta potential. The total QUE was higher than 90% and encapsulation efficiency close to 100% and all formulations prepared with OMC presented contents higher than 90%. The QUE and OMC nanocapsules suspension showed an important *in vivo* antioxidant activity against the damages caused by hydrogen peroxide that lasted for 35 h. The longer bioactivity of those NC was probably related to the slowly release of the QUE.

Key words: UVA, nanocapsules, quercetin, octylmethoxycinnamate, antioxidant

*Corresponding Author:* Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000. Porto Alegre, R.S, Brasil. Telephone: 5551-33085500, Fax: 555133165437 (e-mail : nano@farmacia.ufrgs.br).

## 1. Introduction

The skin is exposed to a combination of environmental insults including UV radiation and high oxygen concentration which prejudice the integrity of its cellular oxidizable structures (Fuchs, 1998). Sunlight induces a variety of biological effects on the skin, including inflammation, pigmentation, immunomodulation, photoaging and cancers. The incidence of cutaneous damages has been increasing in many parts of the world (Fuchs & Kern, 1998; Lowe, 1997).

Skin damage may also be a result of the increased production of the oxygen radical during the inflammatory response. The reactive oxygen species (ROS) play an important role in cutaneous diseases such as skin carcinogenesis, skin aging and damage of epidermal cells (Kohen, 1999; Lopez-Torres *et al.*, 1998). These evidences suggest that topical formulations containing antioxidant substances could be a successful strategy for diminishing UV radiation-mediated oxidative damage of the skin (Saija *et al.*, 1995).

Flavonoids, a group of polyphenolic compounds ubiquitously found in plants, are one of the most important classes of substances presenting biological activity. They are potent antioxidants because they have a high scavenging activity and a capacity to complex iron (Cao *et al.*, 1997). Quercetin (QUE) is a flavonoid that presents significant antioxidant effect by scavenging oxygen radicals, protecting against lipid peroxidation and, thereby, terminating radical chain reactions and chelating metal ions (Gomathi *et al.*, 2003; Heim *et al.*, 2002; Inal *et al.*, 2001; Moure *et al.*, 2001). It is also largely used in cosmetic formulations (Arct *et al.*, 2002; Hideaki, 2004; Hoffmann, 2002). QUE incorporated in collagen matrix showed an increase in the proliferation of cells and wound healing in rats by reducing the release and increasing its activity (Gomathi *et al.*, 2003).

In addition, it is also important to prevent the damage of epidermal cells by applying sunscreens. Octyl methoxycinnamate (OMC) is a widely used sunscreen in several cosmetic formulations because of its large extinction coefficient in various solvents at UVB region (Klein, 1997). Furthermore, OMC is light<sub>105</sub>

sensitive and it undergoes a photoisomerization from an *E*- octyl-*p*-methoxycinnamate to *Z*- octyl-*p*-methoxycinnamate (Pattanaargson and Limphong, 2001; Berset *et al.*, 1996). The use of sunscreen should be recommended in order to counteract against all kind of UV-induced damages (photoallergies, skin wrinkles, sunburn or even skin cancers) (Gers-Barlag *et al.*, 2000 a,b). The topical administration of antioxidants and sunscreens might be efficacious in the prevention of UV radiation-induced skin damage.

The antioxidant capacity can be evaluated by chemical methods (Benzie *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 1993; Espín *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1999), which are easy to execute and have high reproducibility. However, such methods do not represent what happens in living cells (Henriques *et al.*, 2001). Assays using living cells have proved to be very useful in the routine/sampling of various products. Tests based on this methodology are rapid, sensitive and reproducible. The eucaryotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been extensively studied genetically and biochemically, and it is widely used in screening and testing of mutagenic and antioxidant activities (Lopes *et al.*, 2004; Picada *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; Spada *et al.*, 2005).

Drug nanoencapsulation is a useful pharmaceutical strategy to modify the physicochemical properties of substances (Jalon *et al.*, 2001). In addition, nanostructured systems have been widely studied for drug targeting and sustained release (Couvreur *et al.*, 2002; Verger *et al.*, 1998), as well as for the protection of labile substances (Allémann *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2004). Carriers such as nanocapsules have been showing increasing interest in the last years as vehicles for the topical administration of drugs, especially in the field of anti-solar products (Allémann *et al.*, 1992; Alvarez-Román *et al.*, 2001; Jimenéz *et al.*, 2004; Wissing & Muller 2001). Polymeric nanocapsules are defined as vesicles containing an oil core surrounded by a thin polymer wall (Couvreur *et al.*, 2002; Jäger *et al.*, 2007). They can be easily obtained by interfacial deposition of preformed polymers (Fessi *et al.*, 1989; Mosqueira *et al.*, 2000). The drug can be associated with nanocapsules either by dissolution in the oil core or adsorption on the polymeric

wall.

Nanocapsules used as delivery systems have advantages due to their reduced particle sizes (200 and 300 nm). This feature facilitates the cutaneous penetration, leading the accumulation of these carriers in certain biological sites. The small particle sizes allow close contact to the stratum corneum and can increase the amount of encapsulated substance penetrating into the skin (Alvarez-Román *et al.*, 2004; Legrand *et al.*, 1999; Schaffazick *et al.*, 2003).

Another advantage of these systems is the great number of substances that can be encapsulated, dispersed and dissolved. Besides, according to the preparation conditions these systems can differ in relation to the release of substances, as well as in some cases they can provoke a sustained release (Alvarez-Román *et al.*, 2004; Sahoo and Labhassetwar, 2004; Fahmy *et al.*, 2005). Sustained release is indicated in the case of substances, which are irritating, or toxic at high concentrations, to supply the skin over a prolonged period of time with a drug and to reduce systemic absorption (Couvreur *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 1998; Verger *et al.*, 1998). Taking into account that association of chemical sunscreens with antioxidant substances in nanocapsules consists of an innovative alternative for solar radiation protection, the objective of this work was to prepare and evaluate the antioxidant activity of the QUE and OMC loaded nanocapsules using for the first time a biological system composed of *Saccharomyces cerevisiae* cells.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Chemicals and solvents**

Quercetin (QUE) was obtained from Henrifarma (São Paulo, Brasil). Octyl methoxycinnamate (OMC-Parsol<sup>®</sup> MCX) was purchased from Fraccionata (Porto Alegre, Brazil). Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) [65,000 g.mol<sup>-1</sup>] was supplied by Aldrich (Strasbourg, France). Sorbitan monostearate (Span 60<sup>®</sup>) and polysorbate 80 (Tween 80) were acquired from Delaware (Porto Alegre, Brazil). Epikuron 170<sup>®</sup> was obtained from Lucas-Meyer (Hamburg, Germany). All other chemicals and



solvents used were of pharmaceutical grade. All reagents were used as received.

## 2.2 Preparation of nanocapsule suspensions by interfacial deposition of a preformed polymer

Nanocapsules were prepared as described by Fessi and co-workers (1989). Briefly, the lipophilic solution consisted of 0.800 mL of OMC, 0.250 g of poly( $\epsilon$ -caprolactone), 0.025 g of QUE, 0.190 g of Epikuron 170<sup>®</sup> or Span 60<sup>®</sup> and 66.5 mL of acetone. This organic phase was added with magnetic stirring into an aqueous solution (133.2 mL) containing 0.190 g of polysorbate 80. The acetone was removed by evaporation under reduced pressure and the suspension concentrated to a final volume of 25 mL corresponding to 1 mg/mL of QUE and 30 mg/mL of OMC. Different formulations were prepared (Table 1). A dimethylsulfoxide solution containing QUE was also prepared at 0,015 mM (5,07 $\mu$ g/mL) as control.

## 2.3 Characterization of suspensions

The physicochemical analyses of nanocapsules were carried out immediately after preparation. The pH values of suspensions were determined using a potentiometer B474 (Micronal, Brazil). The particle sizes and zeta potentials were determined at room temperature (20°C) using a Zetasizer<sup>®</sup> Nano Series (Modelo ZEN 3600; Malvern Instruments), after dilution with water (Milli<sup>®</sup>Q) (particle size) or with NaCl solution 1 mM (zeta potential).

## 2.4 Determination of QUE and OMC contents in nanocapsule suspensions

QUE was assayed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The system consisted of a UV/PDA Shimadzu detector, a LC-10ADVP-Shimadzu pump and auto-injector Auto Sample Shimadzu (Kyoto, Japan) and Sphere- 5<sup>®</sup> RP 8 4.6 x 250 mm Perkin Helmer column. The mobile phase consisted of methanol/phosphoric acid 0.16 M (60:40 v/v) at pH 2.7. The total sample volume injected was 20  $\mu$ L and QUE was detected at 362 nm. Free QUE (non-associated) was determined in the ultrafiltrate after separation of the nanocapsules by

ultrafiltration-centrifugation technique (Ultrafree-MC 10,000 MW, Millipore) at 12,000 rpm for 10 min. Total QUE was measured using HPLC after the dissolution of nanocapsules by acetonitrile and methanol (50:50, v/v). Associated QUE with the nanocapsules (encapsulation efficiency- EE) was calculated from the difference between the total and the free drug concentrations measured in the nanocapsule suspension and in the ultrafiltrate, respectively. OMC was quantified by UV spectroscopy (Genesys, New York, USA) at 310 nm using methanol as solvent.

## 2.5 Evaluation of antioxidant capacity using yeast cells

*Saccharomyces cerevisiae* strain XV 185-14c (*MAT*  $\alpha$  ade 2-1, arg 4-17, his 1-7, lys 1-1, trp 1-1, trp 5-48, hom 3-10) was provided by Dr. R. C. Von Borstel (Department of Genetics, University of Alberta, Canada). The oxidant agent was a solution of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (50 mM) prepared in sterilized distilled water immediately prior to use. The concentration of  $H_2O_2$  solution was determined at 240 nm in spectrophotometer (Genesys, New York, USA).

To determine the antioxidant capacity of the nanocapsule suspensions containing  $2 \times 10^7$  cells/mL were treated with nanocapsules (0.015 mM of QUE) and  $H_2O_2$  for 1, 7, 15, 20, 25, 30 and 35 h, at 28 °C under stirring. After incubation, samples were diluted in 0.9 % sodium chloride solution, plated in a medium YEPP (1 % (p/v) yeast extract; 2 % (p/v) peptone; 2 % (p/v) dextrose and 2 % (p/v) agar-agar) and incubated for 48 h at 28 °C. Then, colonies were counted and compared to the control plates (i.e., cell suspensions incubated without nanocapsules and  $H_2O_2$ ), which were considered to represent 100 % survival of yeast cells. In order to verify if the nanocapsule suspensions were toxic to the yeast cells, reducing the survival rate, the formulations were added to the yeast cells without the presence of  $H_2O_2$ .

## 2.6 Statistical Analysis

Replicates were made for all assays and the data subjected to analysis of variance (ANOVA) and the Tuckey test using SPSS 12.0 for Windows.

### 3 Results and Discussion

#### 3.1 Characterization of suspensions

All formulations presented macroscopic homogeneous appearance like a milky white bluish opalescent fluid (Tyndall effect) in accordance with the results reported in the literature for nanocapsules (Schaffazick *et al.*, 2003). The nanocapsule suspensions presented particle sizes (Table 2) from 208 to 315 nm. These values are in agreement with the range normally observed (from 200 to 500 nm) for nanocapsules prepared using the nanoprecipitation method (Legrand *et al.*; 1999; Magenheim & Benita, 1991). The pH values for all formulations ranged from 4.0 to 6.3 after preparation. NC-Epikuron 170<sup>®</sup> (QUE/OMC) and NC-Span 60<sup>®</sup> (QUE/OMC) presented QUE contents of 0.99 mg/mL  $\pm$  0.01 and 0.92 mg/mL  $\pm$  0.09, respectively. QUE EE were close to 100 % [NC-Span 60<sup>®</sup> (QUE/OMC); NC-Epikuron 170<sup>®</sup> (QUE/OMC)]. All the formulations showed OMC content higher 90%.

All formulations presented negative zeta potential values (from -21 mV to -56 mV) (Table 2) in consequence of the electronic density of the carboxylate groups present in poly( $\epsilon$ -caprolactone) backbone. The zeta potential is an indicative of the potential of the surface of the particles, and, therefore, it is an important parameter to be evaluated since the surface characteristics can affect the biological behaviour of the formulation. Surfactants have the tendency of accumulating at the interface of these systems due to their amphiphilic nature, and this phenomenon happens according to a physical adsorption (Schott, 2000). Zeta potential lower than -20 mV or higher than +30 mV are indicative of relative stable systems due to the repulsion of the particles which prevent their agglomeration (Alonso *et al.*, 1991; Heurtault *et al.*, 2003; Schaffazick *et al.*, 2003). The zeta potentials observed for the formulations prepared with polysorbate 80 e Span 60<sup>®</sup> showed values in accordance with the literature (Schaffazick *et al.*, 2003). The formulations prepared with Epikuron 170<sup>®</sup> showed zeta potentials more negative than the formulations prepared with Span 60<sup>®</sup>. These results are a consequence of the higher

concentration of phosphatidic acid present in this surfactant in spite of its low proportions (1-2 %) in the total composition of the lecithins (Mosqueira *et al.*, 2000; Washington *et al.*, 1996). The formulations containing QUE [NC-Epikuron170<sup>®</sup> (QUE/OMC) and NC-Span 60<sup>®</sup> (QUE/OMC)] presented values less negative than the formulations without this flavonoid [NC-Epikuron170<sup>®</sup> (OMC) and NC-Span 60<sup>®</sup> (OMC)]. According to the literature the adsorption of substances in the nanocapsules could modify the zeta potential (Alonso *et al.*, 1991). Our results suggest the presence of some amounts of QUE at the surface of the particles.

### 3.2 Evaluation of Antioxidant Capacity Using Yeast Cells

*S. cerevisiae* was used for assaying the antioxidant capacity of formulations. The highest non-cytotoxic concentration of QUE-loaded nanocapsules was used in this test (0.015 mM). The toxicity of nanocapsules [NC-Epikuron170<sup>®</sup> (OMC), NC-Span 60<sup>®</sup> (OMC), (NC-Epikuron170<sup>®</sup> (QUE/OMC) and NC-Span 60<sup>®</sup> (QUE/OMC)] and the DMSO (used in the preparation of the QUE solution) was also evaluated. All the tested formulations were not cytotoxic to the yeast cells (Table 3). For H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, an agent capable to generate reactive oxygen species (Halliwell & Gutteridge, 1999), a cytotoxic time-dependent effect was observed. This effect was directly proportional to the time of incubation with the yeast cells and increased proportionally with the time of treatment (Table 3). Unlike the suspension of nanocapsules without QUE [NC-Epikuron170<sup>®</sup> (OMC) and NC-Span 60<sup>®</sup> (OMC)] and the QUE solution (0.015 mM) (Figure 1), both formulations containing QUE [(NC-Epikuron170<sup>®</sup> (QUE/OMC) and NC-Span 60<sup>®</sup> (QUE/OMC)] showed an important antioxidant activity against to the cytotoxic effects generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 1). From Fig. 1 it is possible to visualize a survival percentual differences between [(NC-Epikuron170<sup>®</sup> (QUE/OMC) and NC-Span 60<sup>®</sup> (QUE/OMC)], when treated with hydrogen peroxide (17,32% a 42, 45 %). This result showed the protector capability of these systems against the hydrogen peroxide damage. In addition, it is possible to verify the increasing effect with the time both to formulations. But the same effect isn't observed for the formulations prepared

without quercetin [(NC-Epikuron170<sup>®</sup> (OMC) and NC-Span 60<sup>®</sup> (OMC)].

The antioxidant activity was only observed after 7 h of incubation, probably due to the characteristics of controlled release of nanocapsules which remained constant for 25 h. Indeed, nanocapsulated systems are capable to provide a slow and sustained release of the active substances (Valero *et al.*, 1996; Verger *et al.*, 1998). In this way, they are extremely useful to maintain low concentrations for a long period that is important for a product containing antioxidant substances.

The nanocapsules, probably, provided the release of QUE in the medium in a gradual way, because the antioxidant effect was observed within 35 hours. According to the literature nanocapsules containing the antioxidant melatonin showed better antioxidant activity than the solution of this drug, confirming the importance of these systems in the improvement of the antioxidant activity (Schaffazick, 2006; Schaffazick, *et al.*, 2006).

The difference of the antioxidant activity observed after 7 h of treatment between the nanocapsules prepared with Epikuron170<sup>®</sup> and Span 60<sup>®</sup>, [NC-Epikuron 170<sup>®</sup> (QUE/OMC); NC-Span 60<sup>®</sup> (QUE/OMC); NC-Epikuron 170<sup>®</sup> (QUE/OMC); NC-Span 60<sup>®</sup> (QUE/OMC)] suggests that the formulation NC-Span 60<sup>®</sup> (QUE/OMC) caused a faster initial release of the flavonoid. After this time (7 h) no statistic difference was observed on the antioxidant activity between these two suspensions (Table 3). The literature shows that formulations prepared with Epikuron 170<sup>®</sup> have the tendency of forming multilamellar structures which could change the rate and the way of release of the associated active substances (Mosqueira *et al.*, 2000).

QUE solution showed no antioxidant activity and was more cytotoxic than the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Although further studies are necessary, it is possible to suppose that the interaction between QUE and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated cytotoxic compounds.

Additionally the association between QUE a flavonoid with a known antioxidant activity (Gomathi *et al.*, 2003; Guardia *et al.*, 2001; Heim *et al.*, 2002; Inal *et al.*, Kootstra *et al.*, 1994), with the OMC improved the protection against the

reactive oxygen species generated by UV radiation. Generally for an adequate antioxidant activity it is essential to work with low antioxidant concentrations in order to avoid pro-oxidant effects (Moure *et al.*, 2001; Heim *et al.*, 2002). This appointment such as confirms the advantage of the encapsulation of QUE in nanocapsules because these systems were able to control and sustain the release of QUE, protecting the yeast cells against the hydrogen peroxide oxidative effect, and contributing for the viability cellular (survival tax).

Besides, this work showed the viability of using the model of yeast cells in order to assess the *in vivo* antioxidant potential of nanocapsules suspensions containing QUE and OMC. This model was enabled to show that the formulations of nanocapsules containing the association of OMC and QUE caused an augmentation on the rate of survival of the yeast cells.

#### **4. Conclusions**

The nanocapsule suspensions containing QUE and OMC showed an important *in vivo* antioxidant activity within 25 h of duration against the damages caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, probably due to the controlled release of QUE from of the nanocapsules. This work also showed, for the first time, the viability of using *Saccharomyces cerevisiae* to evaluate the antioxidant activity of active agents encapsulated in polymeric nanocapsules.

#### **Acknowledgements**

We acknowledged the Rede Nanobitec-CNPq/MCT-Brazil, Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS).

## References

Allémann, E., Gurny, R., Doelker, E., 1992. Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *Int. J. Pharm.*, 87, 247-253.

Allémann, E., Leroux, J-C., Gurny, R., 1998. Polymeric nano and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 34, 171-189.

Alonso, M.J., Losa, C., Calvo, P., Vila-Jato, J.L., 1991. Approaches to Improve the association of amikacin sulfate to poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 68, 69-76.

Alvarez- Román, R., Barre, G., Guy, R.H., Fessi, H., 2001. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 52, 191-195.

Alvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y.N., Guy, R., Fessi, H., 2004. Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles. *Pharm. Res.*, 21, 1818-1823.

Arct, O., Mojski, M., Binkowska, A., Swidzikowska, B., 2002. Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. *Int. J. Cosm. Sci.*, 24, 357-366.

Benzie, I. F. F., Szeto, Y. I., 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric

reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 633-636.

Berset, G., Gonzenbach, H., Christ, R., Martini, R., Deflandre, A., Mascotto, R.E., Jolley, J.D.R., Lowell, W., Pelzer, R., Stiehm, T., 1996. Proposed protocol form determination of photostability. Part I: cosmetic UV filters. *Int. J. Cosm. Sci.*, 18, 167-177.

Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G., 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*, 14, 303-311.

Cao, G., Sofic, E., Prior R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonóides: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.*, 22, 749-760.

Couvreur, P., Barrat, G., Fattal, E., Legrand, P., Vauthier, C., 2002. Nanocapsule technology: a review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 19, 99-134.

Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J., 2000. Characterization of the total free scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 648-656.

Fahmy, T.M., Fong, P.M., Goyal, A., Saltzman, W.M., 2005. Targeted for Drug Delivery. *Nanotoday.*, 18-26.

Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J-Ph., Ammouy, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, 55, R1-R4.

Fuchs, J., 1998. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-



alpha-tocopherol L-ascorbic acid and b-carotene in cutaneous photoprotection. *Free Rad. Biol. Med.*, 25, 848–873.

Fuchs, J., Kern, H., 1998. Modulation of UV-light-induced skin inflammation by d-alpha tocopherol and l- ascorbic acid: a clinical study using solar simulated radiation. *Free Rad. Biol. Med.*, 25, 1006-1012.

Gers-Berlag, H., Bimezock, R., Driller, H., Finkel, P., Gonzenbach, H.U., Heinrich, U., Johncock, W., Juhkason, K., Klette, E., Kockott, D., Langner, R., Pflücker, F., Rudolph, T., Schneider, P., Sprongob, C., Tronnier, H. 2000a. In: *Proceedings of the XXIth IFSCC International Congress in Berlin.*

Gers-Barlag, H., Schomann, A., Franz, S., Schoenrock, U., Doerschner, A., 2000b. Cosmetic or dermatological photoprotection compositions containing flavone and/or flavanone derivatives and benzotriazoles. *Ger. Offen.*, 32. pp. CODEN: GWXXBX DE 19923713 A1 20001123 CAN 134:9157 AN 2000:822603 CAPLUS.

Gomathi, K., Gopinath, D., Rafiuddin Ahmed, M., Jayakumar, R., 2003. Quercetin incorporates collagen matrices for dermal wound healing process in rat. *Biomaterials.*, 24, 2767-2772.

Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A. O., Pelzer, L.E., 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco.*, 56, 683-687.

Halliwell, B and Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free radicals in Biology and Medicine.* 3 Ed., Oxford University press, New York.

- Heim, K.E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J., 2002. Flavonoid antioxidants:chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutrit. Bioch.*, 13, 572-584.
- Henriques, J. A. P., Dafré, A. L., Picada, J. N., Maris, A. F., Salvador, M., 2001. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: Serafini, L. A., Barros, N. M., Azevedo, J. L, *Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria, Vol 1, Agropecuária, Guaíba*, pp. 227-252.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., Benoit, J.P., 2003. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials.*, 24, 4283-4300.
- Hideaki, M. Cosmetic compositions cotaining quercetin derivatives and blood circulation promoters. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2004)*,11 pp. CODEN:JKXXAF JP 2004026740 A2 20040129 CAN 140:116986 AN 2004:76481 CAPLUS.
- Hoffmann, Holger Walter. Cosmetic and dermatologic compositions containing quercetin, rutin, salicin, and escin. *Ger. Offen. (2002)*, 8 pp. CODEN: GWXXBX DE 10034328 A1 20020131 CAN 136:123417 N 2002:83975 CAPLUS.
- Inal, M.E., Kahramant, A., Kokent, T., 2001. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin. Exp. Derm.*, 26, p. 536-539, 2001.
- Jäger, A., Stefani, V., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2007. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *Int. J. Pharm.*, doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.01.051.
- Jalon, E.G., Blanco-Pietro, M.J., Ygartua,P., Santoyo,S., 2001. Topical

application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. *J. Controlled Release*, v.75, 191-197.

Jiménez, M.M., Pelletier, J., Bobin, M.F., Martini, M.C., 2004. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *Int. J. Pharma.*, 272, 45-55.

Klein, K., 1997. Formulation and Regulatory Considerations. In: Lowe, N.J., Shaath, N. A., Pathak, M.A, *Sunscreen: Development, Evaluation, and Regulatory Aspects*, Vol 15, Marcel Dekker, New York, pp. 285-311.

Kohen, R., 1999. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress – New approaches for their evaluation. *Biomed. Pharmacother.*, 53, 181-192.

Kootstra, A. Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids., 1994. *Plant Molecular Biology.*, 26., 771-774.

Legrand, P., Barrat, G., Mosqueira, V., Fessi, H., Devissaguet, J.P., 1999. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems- A review. *STP Pharma Sci.*, 9, 411- 418.

Lopes e Lopes, M. I., SAFI, J., Echeverrigaray, S., Henriques, J. A. P., Salvador, M., 2004. Mutagenic and Antioxidant Activities of *Croton lechleri* Sap in Biological Systems. *J. Ethnopharmacol.*, 95, 549-557.

Lopez-Torres, M., Thiele, J.J., Shindo, L.; Packer, Y. L., 1998. Topical application of  $\alpha$ -tocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet-

induced oxidative damage in murine skin. *J. Dermatol.*, 138, 207–215.

Lowe, N., Friedlander, J., 1997. Sunscreens: Rationale for use to reduce photodamage and phototoxicity. In: Lowe, N., Shaath, N. A., Pathak, M. A. Sunscreens: Development, Evaluation and Regulatory Aspects, Marcel Dekker, New York .

Magenheim, B., Benita, S., 1991. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharma Sci.*, 1, 221-241.

Mosqueira, V, C, F., Legrand, P., Pinto-Alphandary, H., Puisieux, F., Barrat, G., 2000. Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci.*, 89, p. 614-626.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M.J., Parajó, J. C., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry.*, 72, 145-172.

Müller, C. R., Haas, S. E., Bassani, L. V., Guterres, S. S., Fessi. H., Peralba, M. R., Pohlmann, A. R., 2004. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Quim. Nova.*, 27, 555-560.

Müller, R.H., Dingler, A., 1998. Feste Lipid Nanopartikel als neuartiger carrier für Wirkstoffe. *Pharm. Zeitung.*, 49, 4237-4241.

Pattanaargson, S., Limphong, P., 2001. Satability of octiyl methoxycinamate and

identification of its photo- degradation product. *Int. J. Cosm. Sci.*, 23, 153-160.

Picada, J., Salvador, M., Maris, A., Ckless, K., Borisov, N. K., Henriques, J. A.P., 2003. Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. *Mut. Res.*, 539, 29-41.

Sahoo, S.K., Labhasetwar, V., 2004. Nanotech aproaches to drug delivery and imaging. *Drug Disc. Today.*, 8, 1112- 1120.

Saija, A., Scalesa, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F., 1995. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with membranes. *Free Rad. Biol. Med.*, 19, 481-486.

Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Lucca-Freitas, L., Pohlmann, A. R., 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. *Quim. Nova.*, 26, 726.

Schaffazick, S.R. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

Schaffazick, S. R., Pohlmann, A. R., Mezzalira., Guterres, S.S., 2006. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. *J. Braz. Chem. Society*, 17, 562-569.

Schott, H., 2000. Dispersões Coloidais. In: Remington: A Ciência e a prática da Farmácia: Genaro, A, R.P.M. 20 ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 300-327.

Soares, D. G., Andreazza, A. C., Salvador, M., 2003. Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1077-1080.

Spada, P.K. W., Salvador, M., 2005. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4757-4761.

Velero, J., Egea, M.A., Espina, M., Gamisans, F., Garcia, M.L., 1996. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 22, 167.

Verger, M.L.L., Fluckiger., L., Kim, Y-L., Hoffman, M., Maincent, P., 1998. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 46, 137-143.

Wang, M., Jin, Y., Ho, C. T., 1999. Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3947-3977.

Washington, C., 1996. Stability of lipid emulsion for drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 20, 131-145, 1996.

Wissing, S. A., Müller, R.H., 2001. Solid lipide nanoparticles (SLN)- a novel carrier for UV blockers. Pharmazie., 56, 783-786.

Table 1. Nanocapsules components.

<b>Formulation</b>	<b>Components</b>
NC- Epikuron 170 <sup>®</sup> (QUE/OMC)	QUE, OMC and Epikuron 170 <sup>®</sup>
NC-Span 60 <sup>®</sup> (QUE/OMC)	QUE, OMC, Span 60 <sup>®</sup>
NC- Epikuron 170 <sup>®</sup> (OMC)	OMC, Epikuron 170 <sup>®</sup>
NC-Span 60 <sup>®</sup> (OMC)	OMC, Span 60 <sup>®</sup>
QUE Solution (0.015mM)	QUE

\* All the nanocapsule formulations were prepared using poly ( $\epsilon$ -caprolactone) as polymer.



Table 2. Size particles and zeta potentials of nanocapsule formulations.

<b>Preparations</b>	<b>Size (nm± S.D)</b>	<b>Zeta potential (mV± S.D)</b>
	After preparation	After preparation
NC- Epikuron 170 <sup>®</sup> (QUE/OMC)	208 ± 10	-47 ± 4
NC- Span 60 <sup>®</sup> (QUE/OMC)	243 ± 3	-21 ± 1
NC-Epikuron170 <sup>®</sup> (OMC)	312 ± 5	-56 ± 1
NC- Span 60 <sup>®</sup> (OMC)	311 ± 11	-26 ± 1

Table 3. Survival of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells in the different conditions of treatment.

Samples	Survival (% ± S.D)				
	1 h	7 h	15 h	20 h	25 h
Control (cells without treatment)	100 ± 0.00 <sup>a*</sup>	100 ± 0.00 <sup>a</sup>	100 ± 0.00 <sup>a</sup>	100 ± 0.00 <sup>a</sup>	100 ± 0.00 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50mM	88.30 ± 0.78 <sup>b</sup>	70.41 ± 0.28 <sup>c</sup>	33.45 ± 0.75 <sup>d</sup>	8.80 ± 0.10 <sup>e</sup>	6.95 ± 0.05 <sup>e</sup>
QUE 0.015 mM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50mM	65.8 ± 2.69 <sup>c</sup>	7.35 ± 2.65 <sup>e</sup>	3.88 ± 0.43 <sup>e</sup>	4.03 ± 2.34 <sup>e</sup>	1.55 ± 0.05 <sup>e</sup>
NC-Epikuron170 <sup>®</sup> (QUE/OMC)	100 ± 0,00 <sup>a</sup>	100 ± 0,00 <sup>a</sup>	100 ± 0,00 <sup>a</sup>	100 ± 0,00 <sup>a</sup>	100 ± 0,00 <sup>a</sup>
NC-Epikuron170 <sup>®</sup> (QUE/OMC)	100 ± 0,00 <sup>a</sup>	100 ± 0,00 <sup>a</sup>	100 ± 0,00 <sup>a</sup>	100 ± 0,00 <sup>a</sup>	100 ± 0,00 <sup>a</sup>
NC-Epikuron170 <sup>®</sup> (QUE/OMC) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50mM	68.78 ± 1.75 <sup>c</sup>	100 ± 0.00 <sup>a</sup>	76.44 ± 3.04 <sup>h</sup>	50.53 ± 0.03 <sup>g</sup>	45.05 ± 1.95 <sup>g</sup>
NC- Span 60 <sup>®</sup> (QUE/OMC) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50mM	84.39 ± 0.88 <sup>b</sup>	87.73 ± 0.37 <sup>b</sup>	75.40 ± 0.90 <sup>f</sup>	52.55 ± 0.45 <sup>g</sup>	46.55 ± 2.55 <sup>g</sup>
NC-Epikuron170 <sup>®</sup> (OMC) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50mM	72.42 ± 0.69 <sup>c</sup>	68.56 ± 3.16 <sup>c</sup>	29.11 ± 0.89 <sup>d</sup>	7.93 ± 1.11 <sup>e</sup>	7.24 ± 1.05 <sup>e</sup>
NC-Span 60 <sup>®</sup> (OMC) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50mM	70.18 ± 1.00 <sup>c</sup>	69.55 ± 0.24 <sup>c</sup>	30.73 ± 2.25 <sup>d</sup>	7.65 ± 0.21 <sup>e</sup>	7.49 ± 0.69 <sup>e</sup>

\* Different characters: significantly different - Tukey test  $p \leq 0.05$ .

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> =hydrogen peroxide

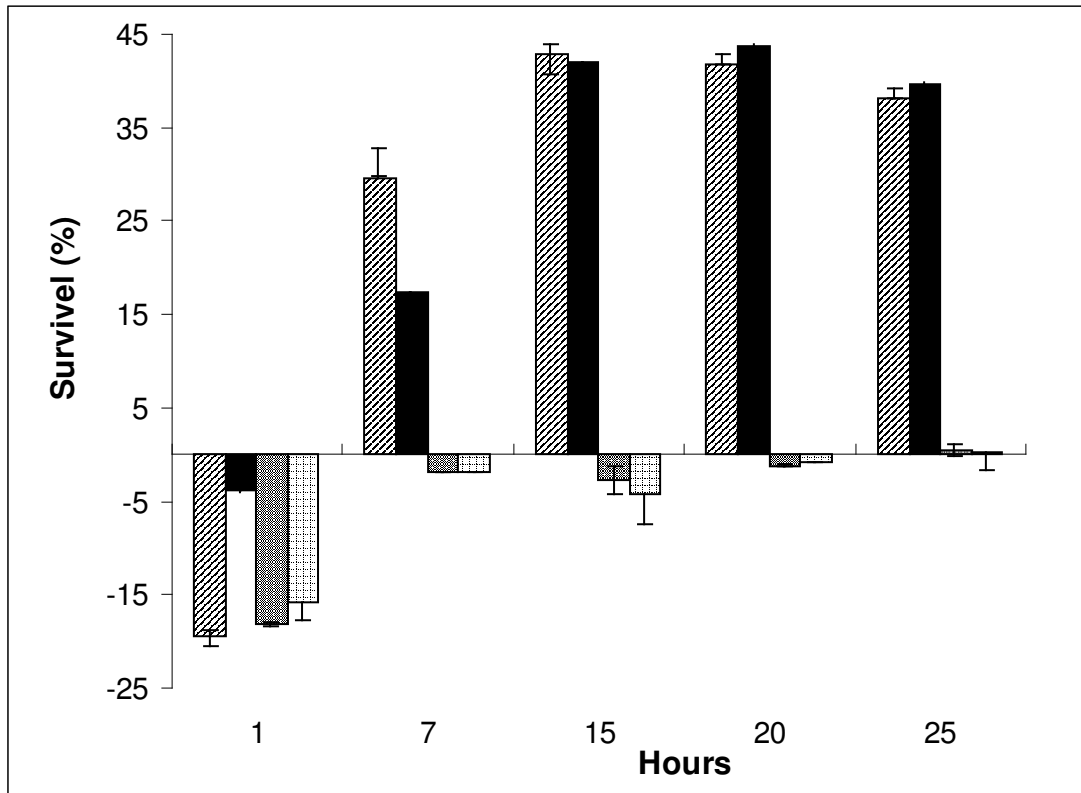


Figure 1: Different survival of *Saccharomyces cerevisiae* between nanocapsules with QUE and OMC and nanocapsules without QUE, comparatively to hydrogen peroxide. ▨ NC-Epikuron170<sup>®</sup> (QUE/OMC) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mM; ■ NC-Span 60<sup>®</sup> (QUE/OMC) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mM; □ NC-Epikuron170<sup>®</sup> (OMC) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mM; ▩ NC-Span 60<sup>®</sup> (OMC) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mM.

## *CAPÍTULO 4*

### *Estudo de penetração cutânea de formas farmacêuticas semi-sólidas contendo nanocápsulas*

---

## 4.1 Introdução

A abordagem deste capítulo consiste em estudos de permeação *in vitro*, utilizando-se célula de difusão tipo *Franz* e pele de porco como membrana para avaliação do perfil de liberação do metoxicinamato de octila nanoencapsulado. Cabe ressaltar que nos estudos de liberação *in vitro* de produtos tópicos é importante considerar que a concentração da substância encontrada ou não na solução receptora, não reflete por si só, a influência da formulação na atividade do produto. Assim, a determinação da quantidade de substância retida na membrana natural leva a dados mais concretos, os quais podem elucidar o grau de atividade do produto, ou seja, se o mesmo irá se localizar na pele ou atravessará a mesma, atingindo ou não a corrente circulatória (Martini, 2005).

O objetivo do trabalho exposto neste capítulo consistiu em avaliar os parâmetros de liberação, penetração e retenção cutânea de suspensões de nanocápsulas contendo um filtro químico, o metoxicinamato de octila. Adicionalmente, a adequabilidade da associação destas estruturas e do metoxicinamato de octila em diferentes veículos semi-sólidos também foi avaliada. O veículo no qual a substância ativa é incorporada deve promover não somente a solubilidade necessária do ativo, mas um maior contato do mesmo com a pele (Alvarez-Román *et al.*, 2001).

A capacidade que as nanocápsulas possuem de provocar uma liberação lenta da substância ativa nelas associada, bem como de propiciar muitas vezes um depósito desta substância ativa nos sítios específicos é conhecida e bem descrita na literatura (Olvera-Martinez *et al.*, 2005; Alvarez-Román *et al.*, 2004 a, b). Sabe-se também que suspensões nanoestruturadas aplicadas epicutaneamente podem modular a difusão transdérmica, afetando a atividade da substância ativa e/ou a partição e a difusão da mesma, podendo influenciar na sua distribuição através da pele (Cevc, 2004).

Neste contexto, este estudo também procurou desenvolver uma nova metodologia capaz de quantificar o metoxicinamato de octila que está sendo liberado em função do tempo de incubação, nos diferentes compartimentos da pele, sem permitir a total dissolução das nanocápsulas. Esta parte da tese foi desenvolvida na

Universidade Claude Bernard, Lyon I, como parte do estágio de doutoramento, sob supervisão do Prof. Dr. Hatem Fessi.

*PUBLICAÇÃO 3: Original study of octyl methoxycinnamate release profile from nanocapsules in the skin: comparison with topical formulations containing free OMC*

**Artigo a ser submetido**

---

**Original study of Octyl methoxycinnamate release profile from nanocapsules in the skin: comparison with topical formulations containing free OMC**

**V. Weiss-Angeli<sup>1</sup>, S. Bourgeois<sup>2\*</sup>, J. Pelletier<sup>2</sup>, S.S. Guterres<sup>1</sup>, H. Fessi<sup>2</sup>, M.A. Bolzinger<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil*

<sup>2</sup> *Université de Lyon, Lyon, F-69003, France; Université Lyon 1, Laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lyon, F-69003, France; CNRS-UMR 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), Villeurbanne, F-69622, France.*

\* Corresponding author: Laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lyon, F-69003, France; CNRS-UMR 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), Villeurbanne, F-69622, France. Telephone +33 4 78 77 72 35; e-mail adress : bourgeois@lagep.cpe.fr



## **Abstract**

The aim of this study was to investigate the *distribution* and the *release profiles* of octylmethoxycinnamate (OMC) loaded in poly( $\epsilon$ -caprolactone)-nanocapsules (NC) in frozen pig skin by the Franz cells method. NC were prepared by nanoprecipitation and formulated in a hydroxyethylcellulose (HEC) gel. This formulation was compared to a control gel containing 5% of free OMC. The permeation study was firstly carried out to examine the OMC distribution depending on the formulations i.e. the OMC-NC-Gel or the OMC-gel. The skin treatment for OMC analysis in each skin layers was undertaken with acetonitrile as extraction solvent. This solvent dissolved the polymer shell of NC and the sunscreen. This method gave an estimation of the total amount of OMC (encapsulated and released) in each skin layers. Furthermore, *in vitro* measurements with static Franz diffusion cells were performed to examine the release behavior of OMC from the NC. A new skin treatment was designed, which preserved the polymer shell of the particles. Therefore, this method quantified only the free OMC released by diffusion from the nanocapsules.

The results showed as previously demonstrated that OMC accumulated in the upper skin layers (more than 90 % of applied dose was recovered in the skin surface and stratum corneum). The viable epidermis seemed to be the limiting barrier for the progression of NC in the skin. Whatever the same skin treatment applied amount of OMC was recovered in the dermis and no OMC was detected in the receptor compartment indicating the absence of NC in both compartments. Moreover, the use of this new method of extraction of NC allowed demonstrating that the OMC release was different depending on the skin level. Whereas 78% of OMC was released after 6 h at the surface and around 40% in the stratum corneum, this percentage decreased to 20% in the deeper skin layers. Therefore, it can be suggested that the mechanism of release is different between the surface and the viable skin probably due to the different local environments surrounding the NC.

**Key words:** UVB-filters – percutaneous absorption – OMC – nanocapsules – controlled release

## 1. Introduction

Exposure to the sun may have serious consequences on the skin such as actinic aging or worse: sunburn, photoaging, and different types of skin cancer, depending on the amount and duration of exposure [1-5]. Sun protecting substances are able to protect humans from harmful effects of solar radiation such as aging and skin cancers [6]. Therefore, it is essential to apply sunscreens before sun exposure to avoid UV effects. The sun protection factor in sunscreen efficacy depends on the distribution of the sunscreen into the skin [7, 8]. The effectiveness of sunscreen formulations depends on either their affinity for the stratum corneum forming a protective film [2] or the photostability of the UV-filters [9]. The ideal sunscreen product should exhibit high accumulation of sunscreen on the skin surface to achieve the highest protective effect and a little permeation to the dermis to minimize toxicological risks [10-14]. Moreover, sun protecting preparations need to achieve a controlled release [15]. For this purpose, liposomes, microsponges, microspheres, nanocapsules and inclusion complexes such as solid lipid nanoparticles (SLN) have been used to encapsulate anti-solar agents. These types of carriers could act as physical sunscreens on their own, having the ability of scattering/reflecting incoming UV radiation [9]. Comparative studies of the advantages of nanoparticles *versus* microparticles to deliver active substances to the mucosa or skin have shown the better adherence and tolerance of the nanoparticles. Moreover, it has been demonstrated that these nanoparticles improved the covering effect of the skin surface and provided a sustained release of antisolar agents, contributing to long-lasting antisolar protection [16-18, 43].

Octylmethoxycinnamate (OMC)-based nanocapsules were introduced by Alvarez Román *et al.*[19] and Jimenez *et al* [2, 20] as a new generation of innovative carriers for UV blockers. OMC is widely used in various antisolar formulations because of its high extinction coefficient in various solvents in the UVB region (290-320 nm) [21, 22]. In this context, the association of nanoparticulate delivery systems providing a sustained release of UV filter and a better adherence to the skin could be an innovative formulation by avoiding frequent re-application of the antisolar preparation. If OMC-loaded nanoparticles have been shown to efficiently protect the skin against erythema [19] and to minimize the UV-filter permeation, their release profiles have not been yet

investigated. The aim of this present work was to design a new original method to investigate the release behavior of OMC-loaded nanocapsules (OMC-NC) in the skin using the Franz cell method. This formulation was compared to a classical formulation containing free OMC (OMC-gel). Generally, the evaluation of the amount of OMC in each skin compartment requires the complete destruction of the nanoparticles by an appropriate solvent leading to the evaluation of the total OMC content (free and encapsulated OMC). In this work, a new skin treatment was set up, which preserved the nanocapsule shells but dissolved the free OMC. This method allowed quantifying the OMC released from nanocapsules but not the still encapsulated OMC.

Therefore, the present work was constructed as follows:

The preparation of the nanocapsules and their formulation in a gel is first presented and discussed. The validation of the new skin treatment for evaluating the OMC release is presented in second. It is followed by measurements of the OMC storage in the different skin layers in third. Lastly, the evaluation of the release of OMC from nanocapsules is discussed.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Materials**

Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL, Mw 65000 Da) and phosphate buffer saline (PBS, 0.01M, pH 7.4) were purchased by Sigma-Aldrich (France). Octylmethoxycinnamate OMC (Escalol 557) was provided by ISP (France). Span 60, Hydroxyethylcellulose (Natrosol 250 HHX) and Isopropylmyristate (Crodamol IPM) were respectively purchased from Uniquema (Belgium), Aqualon (France) and Croda (England). Oramix BG 14 (butylglucoside) and Montanox 80 were a gift from Seppic, France. Acetone and acetonitrile were provided by Carlo Erba.

### **2.2. Preparation and characterization of nanocapsules**

#### *2.2.1. Nanocapsule preparation*

Nanocapsules (NC) were prepared using the nanoprecipitation method described by Fessi *et al.* [23]. Briefly, OMC, PCL and Span<sup>®</sup> 60 were dissolved in acetone. This organic phase was added under magnetic stirring into an aqueous solution composed of distilled water. NC were instantaneously formed by the rapid solvent diffusion. Acetone and a large proportion of water were eliminated at 40 °C under reduced pressure (Rotavapor<sup>®</sup> RE-140, Büchi, Switzerland), and the final volume of suspension was adjusted to obtain 32.8 mg/mL of OMC.

#### *2.2.2. Nanocapsule characterization*

##### *2.2.2.1. Particle size and polydispersity*

The mean size and polydispersity of nanocapsules were assessed by quasi-elastic light scattering (QELS) using a Zetasizer<sup>®</sup> 3000 (Malvern Instruments, U.K.). Measurements were performed at room temperature (20 °C) in triplicate.

##### *2.2.2.2. OMC encapsulation efficiency and drug entrapment in nanocapsules*

Free OMC was separated from loaded nanocapsules by ultracentrifugation (Optima MAX-E, Beckman Coulter, UK) at 20000 rpm during 30 minutes. After ultracentrifugation, the supernatant was retrieved and the pellet (NC) was dissolved in a

required amount of acetonitrile. OMC content in the supernatant and in the nanocapsules were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described in paragraph 2.5.

Encapsulation efficiency of OMC in nanocapsules was determined as the ratio between the actual OMC content in nanocapsules and the total amount of OMC introduced in the preparation. The drug entrapment of OMC in nanocapsules was expressed as the ratio between OMC retrieved in nanocapsules and the corresponding weight of particles.

### ***2.3. Formulations for percutaneous penetration studies***

#### *2.3.1. Preparation of formulations*

For skin permeation experiments, the suspension of NC was incorporated into a 2 % hydroxyethylcellulose (HEC) gel (G-NC). The gel was prepared by dispersing HEC in purified water under agitation (Turbotest<sup>®</sup>, Rayneri/VMI, France) at room temperature. The OMC-loaded nanocapsules were then incorporated into the gel in order to obtain an OMC content of 5 % (w/v) in the final formulation.

The gel containing OMC-loaded nanocapsules was compared with a HEC control gel (G) containing 5 % (w/v) of free OMC. The control gel was prepared as described above by dispersing 5 % (w/v) of free OMC into the gel with 1 % of Montanox<sup>®</sup>80.

#### *2.3.2. Stability of OMC-loaded nanocapsules in formulations*

OMC loaded-NC stability in the HEC gel (G-NC) was investigated by evaluating OMC content in NC and the external phase after preparation of the G-NC and after 7 days of storage at room temperature. For this purpose, NC were isolated from the G-NC with isopropylmyristate by stirred with vortex (2min) and centrifugation at 14.000 rpm for 15 minutes. The OMC content in the isolated NC and in the supernatant was then determined by HPLC after dilution in acetonitrile.

## **2.4. In vitro skin permeation studies**

### *2.4.1. Skin preparation*

Pig skin used for the permeation study was obtained from the flank of females and males of the Landras and Pietrain breeds. The pig skin model is usually used to predict percutaneous penetration in humans [24]. After collection the skin was cleaned and shaved and the subcutaneous fat was removed. The epidermal side was cleaned with 1 % aqueous solution of sodium lauryl sulfate. The skin was washed with distilled water, lastly blotted with soft paper and then store flat at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The full-skin thickness was measured before use with a dial thickness gauge (Mitutoyo, Japan). Skin integrity was examined by a physical method, transepidermal water loss (TEWL) using a Skin Station (La Licorne, France). The TEWL was measured in triplicate for 1 min (mean $\pm$ standard deviation  $\text{gh}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ).

### *2.4.2. Distribution of nanocapsules in the skin*

The skin samples were placed in static diffusion cells (Franz cells) with a surface of  $2.54\text{ cm}^2$  and a receptor volume of 10 mL. The receptor fluid consisted of a phosphate buffered saline solution (0.01 M; pH =7.4) containing 4 % (w/w) of Oramix<sup>®</sup> BG 14. The solubility of the tested compounds in the receptor fluid was examined before the test to ensure sink conditions. Both formulations G and G-NC were applied on the skin at the OMC dose of  $2\text{ mg/cm}^2$ . The cells were placed in thermostated water ( $32^{\circ}\text{C}$ ), with horizontal agitation to ensure the homogeneity of the receptor fluid. Two times were investigated (3 and 6 h) and each experiment was performed six-fold.

After 3 h and 6 h of exposure the cells were removed from the water bath. The receptor fluid was filtered ( $0.45\text{ }\mu\text{m}$ ) and analyzed without further dilution.

Then, the stratum corneum (SC) of the treated area was removed from the viable epidermis by 19 successive tape-strippings with D-Squame<sup>®</sup> adhesives (diameter 22 mm, Monaderm, Monaco) and afterwards peeled it off with the part of the stratum corneum adhered to it [20, 25]. According with Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products [26], the stratum corneum will be removed by 10 to 20 strips. For this purpose, the formulation remaining at the skin surface was removed with a spatula and pooled with the first strip to estimate the quantity of OMC, called SS for

“skin surface”, which had not penetrated into the SC. The 18 others strips (S2-S7) were pooled three by three in a vessel and dissolved with the appropriate solvent according to the protocol A or B described below

After the tape-strippings, the distribution of OMC loaded-nanocapsules in the viable skin was evaluated using two different methods: A and B.

#### *2.4.2.1. Protocol A*

The protocol A consists in the classical method usually performed for skin permeation studies. In this protocol the strips were dissolved in acetonitrile to extract the total OMC. The skin disc was removed from the cells and epidermis and dermis separated after immersion in hot water for 45 s. Each skin compartment was digested with acetonitrile under agitation during 10 min. The digestion fluid was filtered and analyzed by HPLC. This protocol allowed to evaluate the skin distribution of whole OMC (encapsulated and released from NC) based on G and G-NC formulations. When this protocol is applied to G-NC, samples were called "BNC" for "broken nanocapsules".

#### *2.4.2.2. Protocol B*

The sample treatment by acetonitril in protocol A led to the dissolution of the polymer shell and then to the destruction of nanocapsules. Therefore, in order to avoid the dissolution of nanocapsules and to discriminate the OMC released from nanocapsules to OMC remaining encapsulated in particles, protocol B was assessed using isopropyl myristate (IPM), a non-solvent of PCL, and a solvent of OMC.

In this method the OMC contained in the strips was extracted by IPM for 10 min under magnetic stirring and the extraction fluid was ultracentrifuged (15 min at 14.000 rpm) to separate the OMC remaining encapsulated in NC from free OMC released in the medium. The supernatant was diluted with 1 mL of methanol filtered and analyzed by HPLC.

After separation of epidermis and dermis as described above, they were both treated with 1 and 2 mL of IPM, respectively during 10 minutes under magnetic agitation. Free OMC dissolved in IPM was separated from NC by centrifugation for 15 minutes at

14.000 rpm. The supernatant was mixed with 1 mL of methanol, filtered and the OMC was quantified by HPCL.

This protocol was applied to the G-NC formulation and samples are called "UBNC" for "unbroken nanocapsules".

### *2.5. Analytical method for OMC quantification*

OMC quantification was performed by an HPLC validated method using an X-terra C18 column (Waters, USA) thermostated at 30°C and a acetonitrile:water (85:15 v/v) mobile phase at the flow rate of 1 ml/ min. Peaks were monitored by UV absorbance at 310 nm (Waters 996 Photodiode Array). The calibration curve was prepared with methanol solutions of OMC at concentrations ranging from 10 - 50 µg/mL. The standards curves were linear ( $r= 0,9982$  for OMC).

### *2.6. Calculations and statistics*

The penetration results were expressed as percentages of the applied dose. Each measurement was made six-fold. Statistical analysis was performed with the ANOVA test. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant [27].

## **3. Results and discussion**

### *3.1. Nanocapsules characterization*

Results of NC characterization are showed in Table I. The nanocapsules had a mean diameter of  $263.50 \pm 2.40$  nm and the OMC total was  $102, 15 \pm 2,47\%$ . The entrapment efficiency of OMC in nanoparticles was of  $96.57 \pm 2.24 \%$  and the encapsulation yield was of  $61.62 \pm 1.43 \%$ . These results are consistent with other studies in which similar high-loading efficiencies were obtained with encapsulation of lipophilic substances [28, 29].

### *3.2. OMC-loaded formulations*

The degree of penetration of sunscreens into the skin depends greatly on the vehicle in which they are incorporated [30-33]. As example, Montenegro *et al.* [31] demonstrated



that the distribution of OMC from different emulsions in the skin varied significantly depending on the nature of the silicone emulsifier used in the preparation. Novel carrier systems such as cyclodextrins, silica pearls, SLN and polymeric nanoparticles have been developed to minimize sunscreens absorption and to provide a good UV-radiation stability [9, 20, 34]. Among them, nanoparticles presented the advantage to confer a good substantivity and an enhanced UV protection to antisolar formulations in which they are incorporated. However, the choice of the final vehicle containing these nanoparticles greatly influenced the penetration rate and the amount of sunscreen in the skin [30, 33, 35]. Yener *et al.*, [33] have demonstrated *in vitro* with Franz diffusion cells that OMC-loaded microspheres formulated in an oleaginous cream or a Carbopol® gel released OMC in greater amount than an o/w emulsion. However, the OMC amounts released from the OMC-loaded microspheres in the gel or the oleaginous cream were always lower than the amounts released from the same vehicles containing free OMC. In the present work, the stability of NC was determined in suspension and after their incorporation in the HEC gel by evaluating the percentage of free OMC in the preparations. The results showed that only 2.52 % of OMC were released after 24 h and after 7 days in the NC suspension. After incorporation in the HEC gel, the percentage of free OMC increased to 15 % probably because of the mechanical stirring necessary to produce a homogeneous gel. It should be noticed that the polymeric shell thickness of NC is very thin and could be broken under shear. However, this result was dramatically modified when the OMC-NC were introduced in a conventional o/w emulsion containing PEG-5 glyceryl stearate as surfactant and mineral oil C12-C15 alkyl benzoate and caprylic/capric triglyceride as lipophilic phase. Indeed, the percentage of free OMC in the NC- loaded emulsion was 52 % after 24h. This fast release could be attributed to the presence of the surfactant which could extract OMC from the NC. Moreover, OMC could have a great affinity for the lipophilic phase of the emulsion. A simple gel was then chosen to transport OMC-NC in the upper skin layers.

### 3.3. Skin permeation studies

Encapsulation using nanoparticulate systems is a novel strategy in drug targeting and delivery. With respect to the skin, nanoparticles have been proposed for topical use to

prolong the residence time of sunscreen agents in the stratum corneum or to target the upper layers of the skin by overcoming the skin barrier [9, 19, 20, 36].

Encapsulation of OMC in polymeric nanoparticles has been already studied by Alvarez-Román *et al.* [19] and Jimenez *et al.* [20]. The results of these studies firstly showed that OMC could be successfully encapsulated in NC (> 99 %) and that an OMC-NC-gel significantly reduced *in vivo* UV-induced erythema compared to a simple OMC-gel. Moreover, Jimenez *et al.* have demonstrated *in vitro* using the Franz cell method that an OMC-NC-emulsion at 5 % significantly minimized the transepidermal penetration of OMC in the skin compared to the same emulsion containing free OMC [20].

The purpose of the present percutaneous penetration experiments was firstly to investigate the *distribution* of OMC in the skin using a gel as final vehicle and to compare the results with those of Jimenez *et al.* Moreover, the objective of this present study was to investigate the *sustained release* of OMC from the vehicle and its deposition in the skin layers as a function of time. The protocol B was designed to estimate the OMC released from the NC.

The results of the percutaneous study performed with the OMC-gel and the OMC-NC-gel, analysed using both protocols *i.e.* A and B, are presented in table II. In the first case (protocol A) the total amount of OMC (encapsulated or not) (OMC-BNC) was quantified in each skin layer because the treatment of each skin sample with acetonitrile dissolves the NC shell releasing the entrapped OMC. In the second case (protocol B) the OMC still entrapped in the core of the NC is not quantified and the use IPM as extraction solvent allows only quantifying the OMC released in each skin layer (OMC-UBNC).

Both methods allowed indirectly estimating if NC were present or not in the skin layer investigated. If the OMC amounts quantified in a skin layer for BNC and UBNC are close it signified that no NC are present and that the quantified OMC corresponds to the free OMC, which has permeated. If both amounts are significantly different, it suggested that NC containing entrapped OMC was still present in the skin level investigated.

### 3.3.1 *In vitro* distribution of OMC in the flank pig skin layers from BNC and the control gel (OMC-NC-gel)

The distributions of OMC in the skin after application of an OMC-NC-gel and of the OMC-gel were investigated using the Franz cell method. The experiments were stopped after 3 h and 6 h roughly correspond to spending one-half day (3 h) or the entire day (6 h) under UV-exposure.

As shown on figure 1, the penetration of OMC after 3 h, using the control gel, was low with 1.57 % of the applied dose penetrating in the viable skin layers (VSL) and 98.43 % remaining in the skin surface (SS) and the stratum corneum (SC). It could be noticed that no OMC was found in the receptor fluid (RF) after 3 h (and even after 6 h). The reason is the lipophilicity of OMC which accumulated preferentially in the upper skin layers ( $\log P=5.96$ ) [7].

A significant increase was noticed after a 6 h exposure in all skin compartments with 5.49 % of the applied dose recovered in the viable skin (against 1.57 % after 3 h) and 94.51 % in SC and SS. The quantity found in the SS decreased from 78.18 % to 66.27 % between 3 h and 6 h whereas it increased in SC (20.25 % to 28.24 %). The stripping technique allowed us to see that the difference concerned especially the first three tapes (S2).

The mean quantity accumulated in SC after 3 or 6 h was not higher than 15-20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . This result is in accordance with Potard *et al.* and with Benech-Kieffer *et al.* who found the same amount of 15-20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of OMC whatever the exposure time compared to the other skin levels [7, 14].

The results of penetration studies of OMC from the NC-gel (OMC-BNC) are showed in figure 2. The encapsulation of OMC in the NC did not modify the OMC distribution in the skin after 3 h, since no significant differences were found between OMC distributions using either OMC-gel or OMC-BNC. However, after 6 h, a significant difference was observed in the dermis (D) (Table II). The mean amount recovered in this compartment was higher (1.88 % versus 0.73 %) in the case of the control gel. Consequently, the total amount which has permeated in the viable skin compartments (VE (viable epidermis)+D (dermis) +RF (receptor fluid)) was significantly higher in the case of the OMC-gel (5.49 % versus 4.13 %).

The OMC distribution was quite similar between 3 h and 6 h for BNC except for the mean amount accumulated in VE which increased from 1.44 to 3.40 % (Figure 2). Interestingly, this increase had no repercussion on the amount recovered in the D or RF as if the VE had limited the OMC progression. This result is in accordance with the preliminary study carried out by Jimenez *et al.* who evidenced that the major OMC quantity was found in the epidermis with NC based formulations [20]. They studied the distribution of OMC (5 %) from OMC-loaded NC incorporated in a conventional o/w emulsion after 3 h and 24 h. The same emulsion containing 5 % of free OMC was used as control. The comparison of their penetration experiments with the present study allowed showing the influence of the final vehicle on the OMC distribution in the skin from NC based preparations. After 3 h the comparison between both experiments showed that the distribution of OMC released from the NC-loaded vehicles (emulsion in the study of Jimenez and a gel in the present study) was roughly similar: in the present study the transepidermal amount of OMC is 1.97 % versus 1.83 % in the study of Jimenez. In the upper skin levels (SC+SS) if the total amount recovered is greater than 90 % the ratio of OMC between the SC and the SS is different: Jimenez *et al.* found 10 % of the total (SS+SC) amount in the SC whereas we found 26 % of the same quantity in the SC for both NC-loaded formulations.

Interestingly, a significant difference was noticed between the skin distribution from the control emulsion studied by Jimenez and the control gel used in this study. If the global amount recovered in the SS+SC was higher than 90 % (as previously noticed for OMC-NC-formulations) the ratio between SS and SC were very different: 26 % was distributed in the SC for the gel whereas the ratio was 50/50 between SS and SC for the emulsion. It can be concluded that the control gel is a better vehicle than the control emulsion because it favoured the OMC location at the skin surface. The NC carrier strongly influences the location of OMC at the surface in the case of the emulsion studied by Jimenez *et al.* [2, 20].

In summary if the skin distribution did not vary after 3 h between the OMC-gel and the OMC-BNC in the present study, the distribution described by Jimenez *et al.* between the emulsion and the NC-emulsion was very different. It happened just like the gel was the limiting factor of the UV-filter permeation because it slowed down the OMC permeation

whereas it is obvious that the release rate limiting factor in the study of Jimenez *et al.* is the carrier [2, 20]. We can draw the same conclusion but only after 6 h probably because the rate of release depends further on the vehicle: regarding the formulations it can be stated that the emulsion was a “better vehicle” to deliver OMC in the skin due to its strong amphiphilic character. In the present case it rather constitutes a side effect. In this study after 6 h the NC accumulated mainly in the epidermis. OMC was mainly located in this compartment but did not cross the viable epidermis level. This behaviour was in accordance with previous studies performed by Alvarez-Román *et al.* [19]. The visualisation of fluorescent nanoparticles of either 200 nm or 400 nm by confocal microscopy revealed that nanoparticles accumulated preferentially in the follicular openings and in the upper skin layers (10 µm). The authors suggested that the enhanced delivery into the skin of lipophilic compounds such as OMC from nanoparticle formulations was probably not attributable to the penetration of the polymer but rather to an efficient release of the lipophilic permeants into the stratum corneum.

### 3.3.2. Release rate from the NC: protocols A (BNC) and B (UBNC)

The distribution of the free OMC (UBNC) in the skin layer evaluated with the protocol B was quite similar between 3 and 6 h (Figure 3), except for VE as described previously for BNC (0.35 % after 3 h versus 0.68 % after 6 h). The significant difference noticed between 3 and 6 h in VE for BNC and UBNC experiments (Table II) indicated that OMC was still entrapped in intact NC. Indeed, the release profile of OMC was constant after 3 or 6 h with around 20 % of the total OMC released in VE in both cases. Therefore; a sustained release is observed which delayed the OMC permeation in the D or the RF. In the dermis after 3 h the OMC quantified for BNC and UBNC are quite close. This result was interesting because it indirectly showed the absence of NC in the dermis. In the RF, whatever the protocol applied, no OMC was detected. The VE seemed to be the limiting barrier in this experiment. Moreover, the encapsulation in NC is an effective way to slow down the release of OMC in deeper skin levels.

At the skin surface the situation is different. After 3 h, the OMC liberated at the skin surface is 43.20 % and 54.61 % of applied dose after 6 h (Table II). Comparatively, for BNC, the total amount remaining at the surface after 3 and 6 h was respectively 77.30 %

and 68.59 %. This result indicated that 55 % of the entrapped OMC was released after 3 h and that this quantity rose to almost 80 % after 6 h. In the SC these ratio decreased to 39 % after 3 h and 23 % after 6 h.

A pronounced difference did exist between the upper layers and the deeper skin levels. The release of OMC was higher from the NC near the surface (between 39 % and 78 %) and lower in the viable skin (around 20 %).

The release profiles are not identical in the different skin layers investigated. The high release near the surface favoured an efficient protection against UV-radiations whereas the low release verified in the deeper layers strongly limited the contact of OMC with the viable skin and therefore its toxic effect towards these tissues. The differences noticed in the extraction profiles could be attributed to the local environment: at the surface the NC are formulated in a gel and deposited on the skin at 32 °C. The water evaporated quickly and after 3 h the NC were in a dry environment and could aggregate favouring their breakdown and consequently OMC release. By penetrating in the skin, the NC could be more individualised and consequently could remain intact. Moreover, at the surface and even in the SC, the local environment is rather lipophilic and the water percentage is low, comprised between 10 and 13 %. In the viable skin, the water content increases to reach almost 70 % in the dermis. It could be therefore suggested that the break of the OMC-NC in such environment is different.

The mechanism by which NC break down still not fully elucidated. Lemoine *et al.* have studied the stability of nanoparticles (in buffered solution or freeze-dried) prepared by the nanoprecipitation method using different polymer such as PCL (Mw 78000), PLA [Poly(D,L-lactide) acid] or PLGA [Poly(D,L-lactide-coglycolide) acid] [37]. These authors pointed out that the stability of polymeric nanoparticles depended on the storage temperature, and the storage conditions (in a buffered solution or freeze-dried for example). PCL-based nanoparticles gave the best stability results. It justified why we preferentially chose this polymer to formulate our nanocapsules. The key parameters controlling the release rate of drugs *in vivo* through the eroded nanoparticles is still under debate: the hydrophobicity and the surface charge of the polymer coating as well as its cristallinity or its molecular weight have been evoked. Because PCL hydrolyzes slowly compared to PLA and PLGA, it is most suitable for long-term drug delivery. *In*

*vivo*, PCL is degraded by hydrolysis of its ester linkages in physiological conditions (such as in the human body) and it has therefore received a great deal of attention for use as an implantable biomaterial or as excipient to formulate nanoparticles. It was demonstrated that the release of drugs from PCL-microspheres was diffusion controlled rather than erosion controlled [38]. Nitrofurantoin, an antibacterial agent used in the treatment of urinary tract infections, has been incorporated into PCL microspheres [39]. The drug release rate was proportional to the square-root of time, i.e., following the Higuchi equation. The same mechanism was reported for the release of progesterone from PCL films [40]. The kinetic release of drugs from nanocapsules, nanoemulsions and nanospheres was compared for Cruz *et al.*[44]. In this work the analysis showed that the polymer (PCL) is organized in the nanocapsules and suggested that constituents in these nanocarriers are differently organized. The mathematical modelling used for to evaluate the release profiles showed that the presence of the polymer increases the half-lives of the burst phases while the presence of the oil increases the half-lives of the sustained phases. PCL is relatively stable against abiotic hydrolysis, but it was shown early that it is degraded by microorganisms [41]. The molecular weight of PCL remained unchanged during the degradation and it was stated that the biotic degradation occurred at the surface. Generally, it has been shown that the biodegradation of PCL proceeds by rapid weight loss through surface erosion with minor reduction of the molecular weight. In contrast, the abiotic hydrolysis of PCL proceeds by a reduction in molecular weight combined with minor weight loss. Frozen pig skin has been shown to exhibit weak enzymatic activity [42]. However, at the skin surface the presence of microflora shouldn't be discarded. It should be interesting in the future to perform the same permeation study on viable skin.

#### **4. Conclusion**

The skin penetration experiments of OMC-loaded NC incorporated to different vehicles have shown that these particulate delivery systems are promising for the cutaneous administration of OMC. The influence of the type of vehicle was an important factor

considered in this study, which demonstrated that gel form allowed a faster release of OMC on the skin than the other formulations.

The new methodology (protocol B) developed in this study has allowed to investigate the sustained release behavior of OMC from NC in each skin layers. The OMC release was more important in the upper skin layers where UV radiation have to be absorbed by sunscreens. This effect could be explained by small size of the nanocapsule and by hydrophobicity of the PCL. Both factors contributed to the accumulation of NC on the skin surface.

### **Acknowledgements**

Rede Nanocosméticos-CNPq/MCT- Brazil, PROPESQ-UFRGS e Rede Cooperativa Brasil França-França em Processos de Produção de Nanopartículas para Aplicação em Saúde (CNPq)..

### **References**

1. Berset, G., *et al.*, Proposed protocol form determination of photostability. Part I: Cosmetic UV filters. *Int. J. Cosm. Sci*, 1996. 18: p. 167-177.
2. Jiménez, M.M., *et al.*, Poly-epsilon-caprolactone nanocapsules containing octyl methoxycinnamate: preparation and characterization. *Pharm Dev Technol*, 2004. 9(3): p. 329-39.
3. Tarras-Wahlberg, N., *et al.*, Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol*, 1999. 113(4): p. 547-53.
4. Urbach, F., The historical aspects of sunscreens. *J Photochem Photobiol B*, 2001. 64(2-3): p. 99-104.
5. Vanquerp, V., *et al.*, High-performance liquid chromatographic method for the comparison of the photostability of five sunscreen agents. *J Chromatogr A*, 1999. 832(1-2): p. 273-7.
6. Berardesca, E., *et al.*, In vivo biophysical characterization of skin physiological differences in races. *Dermatologica*, 1991. 182(2): p. 89-93.
7. Benech-Kieffer, F., *et al.*, Percutaneous absorption of sunscreens in vitro: interspecies comparison, skin models and reproducibility aspects. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2000. 13(6): p. 324-35.



8. Schulz, J., *et al.*, Distribution of sunscreens on skin. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54 Suppl 1: p. S157-63.
9. Wissing, S.A. and R.H. Muller, Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J Control Release*, 2002. 81(3): p. 225-33.
10. Gupta, V.K., J.L. Zatz, and M. Rerek, Percutaneous absorption of sunscreens through micro-yucatan pig skin in vitro. *Pharm Res*, 1999. 16(10): p. 1602-7.
11. Hagedorn-Leweke, U. and B.C. Lippold, Accumulation of sunscreens and other compounds in keratinous substrates. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998. 46(2): p. 215-21.
12. Hayden, C.G., M.S. Roberts, and H.A. Benson, Systemic absorption of sunscreen after topical application. *Lancet*, 1997. 350(9081): p. 863-4.
13. Maier, H., *et al.*, Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar-simulated radiation. *J Invest Dermatol*, 2001. 117(2): p. 256-62.
14. Potard, G., *et al.*, Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during in vitro percutaneous penetration studies. *Int J Pharm*, 1999. 189(2): p. 249-60.
15. Faihurst, D. and M. Mitchnick, Submicron encapsulation of organic sunscreens. *Cosmet. toiletries*, 1995. 110(9): p. 47-50.
16. Jennings, V., *et al.*, Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000. 49(3): p. 211-8.
17. Jennings, V., M. Schafer-Korting, and S. Gohla, Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J Control Release*, 2000. 66(2-3): p. 115-26.
18. Olvera-Martinez, B.I., *et al.*, Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: penetration across the stratum corneum. *J Pharm Sci*, 2005. 94(7): p. 1552-9.
19. Alvarez-Román, R., *et al.*, Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur J Pharm Biopharm*, 2001. 52(2): p. 191-5.
20. Jimenez, M.M., *et al.*, Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *Int J Pharm*, 2004. 272(1-2): p. 45-55.

21. Klein, K., Sunscreen Products : *Formulation and Regulatory Considerations, in Sunscreens : Development, Evaluation and Regulatory Aspects* N.J. Lowe, N.A. Shaath, and M.A. Pathak, Editors. 1997, Marcel Dekker: New York. p. 285.
22. Pattanaargson, S. and P. Limphong, Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. *Int J Cosm Sci*, 2001. 23(3): p. 153-160.
23. Fessi, H., *et al.*, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*, 1989. 55(1): p. R1-R4.
24. SCCNFP, Notes of guidance for testing of cosmetic ingredients for their safety evaluation, T.S.C.o.C.P.a.N.-F.P.I.f.C. (SCCNFP), Editor. 1999.
25. Clarys, P., *et al.*, There is no influence of a temperature rise on in vivo adsorption of UV filters into the stratum corneum. *J Dermatol Sci*, 2001. 27(2): p. 77-81.
26. SCCNFP, Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients., S.C.o.C.P.a.N.-F.P.I.f.C. (SCCNFP), Editor. 2003.
27. Brand, R.M. and C. Mueller, Transdermal penetration of atrazine, alachlor, and trifluralin: effect of formulation. *Toxicol Sci*, 2002. 68(1): p. 18-23.
28. Alvarez-Román, R., *et al.*, Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm Res*, 2004. 21(10): p. 1818-25.
29. Calvo, P., J.L. Vila-Jato, and M.J. Alonso, Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J Pharm Sci*, 1996. 85(5): p. 530-6.
30. Cross, S.E., *et al.*, Can increasing the viscosity of formulations be used to reduce the human skin penetration of the sunscreen oxybenzone? *J Invest Dermatol*, 2001. 117(1): p. 147-50.
31. Montenegro, L., D. Paolino, and G. Puglisi, Effects of silicone emulsifiers on in vitro skin permeation of sunscreens from cosmetic emulsions. *J Cosmet Sci*, 2004. 55(6): p. 509-18.
32. Treffel, P. and B. Gabard, Skin penetration and sun protection factor of ultra-violet filters from two vehicles. *Pharm Res*, 1996. 13(5): p. 770-4.
33. Yener, G., T. Incegul, and N. Yener, Importance of using solid lipid microspheres as carriers for UV filters on the example octyl methoxy cinnamate. *Int J Pharm*, 2003. 258(1-2): p. 203-7.

34. Felton, L.A., C.J. Wiley, and D.A. Godwin, Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the transdermal permeation and skin accumulation of oxybenzone. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002. 28(9): p. 1117-24.
35. Varvaresou, A., Percutaneous absorption of organic sunscreens. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2006. 5(1): p. 53-57.
36. Scalia, S., *et al.*, Encapsulation in lipospheres of the complex between butyl methoxydibenzoylmethane and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Int J Pharm*, 2006. 320(1-2): p. 79-85.
37. Lemoine, D., *et al.*, Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, 1996. 17(22): p. 2191-7.
38. Edlund, U. and A.C. Albertsson, Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery, in Degradable Aliphatic Polyesters. 2001, Springer Berlin Heidelberg. p. 67-112.
39. Dubernet, C., *et al.*, Microencapsulation of nitrofurantoin in poly([epsilon]-caprolactone): tableting and in vitro release studies. *Int J Pharm*, 1987. 35(1-2): p. 145-156.
40. Schindler, A., *et al.*, *Biodegradable polymers for sustained drug delivery, in Contemporary Topics in Polymer Science*, E.M. Pearce and J.R. Schaeffgen, Editors. 1977, Plenum Press: New York. p. 251-89.
41. Hakkarainen, M., Aliphatic Polyesters: Abiotic and Biotic Degradation and Degradation Products, in Degradable Aliphatic Polyesters 2001, Springer Berlin Heidelberg. p. 113-138.
42. Diembeck, W., *et al.*, Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association. *Food Chem Toxicol*, 1999. 37(2-3): p. 191-205.
43. Alves, M.P., *et al.*, Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Int J Pharm*, 2007, doi: 10.1016/i.jpharm.2007.03.031.
44. Cruz, L., *et al.*, Diffusion and mathematical modelling of release profiles from nanocarriers. *Int J Pharm*, 2006. 313 (1-2): p. 198-205.

Table I : Results of nanocapsule characterization (n= 3).

NC mean diameter (nm $\pm$ D.S.)	263.5 $\pm$ 2.40.
Encapsulation efficiency (% $\pm$ D.S.)	96.57 $\pm$ 2.24.
OMC entrapment (mg/100mg of NC $\pm$ D.S.)	61.62 % $\pm$ 1.43.

**Table II : *In vitro* skin distribution of OMC (mean of applied dose (%) ± S.D., n=6).**

Skin Portion	OMC-G		OMC-BNC		OMC-UBNC	
	3h	6h	3h	6h	3h	6h
SS	78.184 ± 1.180	66.269 ± 1.695	77.297 ± 5.265	68.588 ± 1.335	43.151 ± 5.065	54.577 ± 4.388
SC	20.250 ± 1.206	28.244 ± 1.531	20.736 ± 5.032	27.281 ± 1.227	8.185 ± 0.548	6.173 ± 0.916
SS + SC	98.435 ± 0.055	94.513 ± 0.202	98.033 ± 0.283	95.869 ± 0.563	60.700 ± 10.388	60.749 ± 4.030
VE	1.165 ± 0.047	3.603 ± 0.271	1.443 ± 0.182	3.402 ± 0.559	0.350 ± 0.008	0.681 ± 0.094
D	0.401 ± 0.033	1.884 ± 0.259	0.524 ± 0.174	0.729 ± 0.174	0.455 ± 0.092	0.257 ± 0.098
VSL	1.565 ± 0.055	5.487 ± 0.202	1.967 ± 0.283	4.131 ± 0.563	0.717 ± 0.116	0.938 ± 0.167
RF	0	0	0	0	0	0

SS : surface skin

SC : stratum corneum

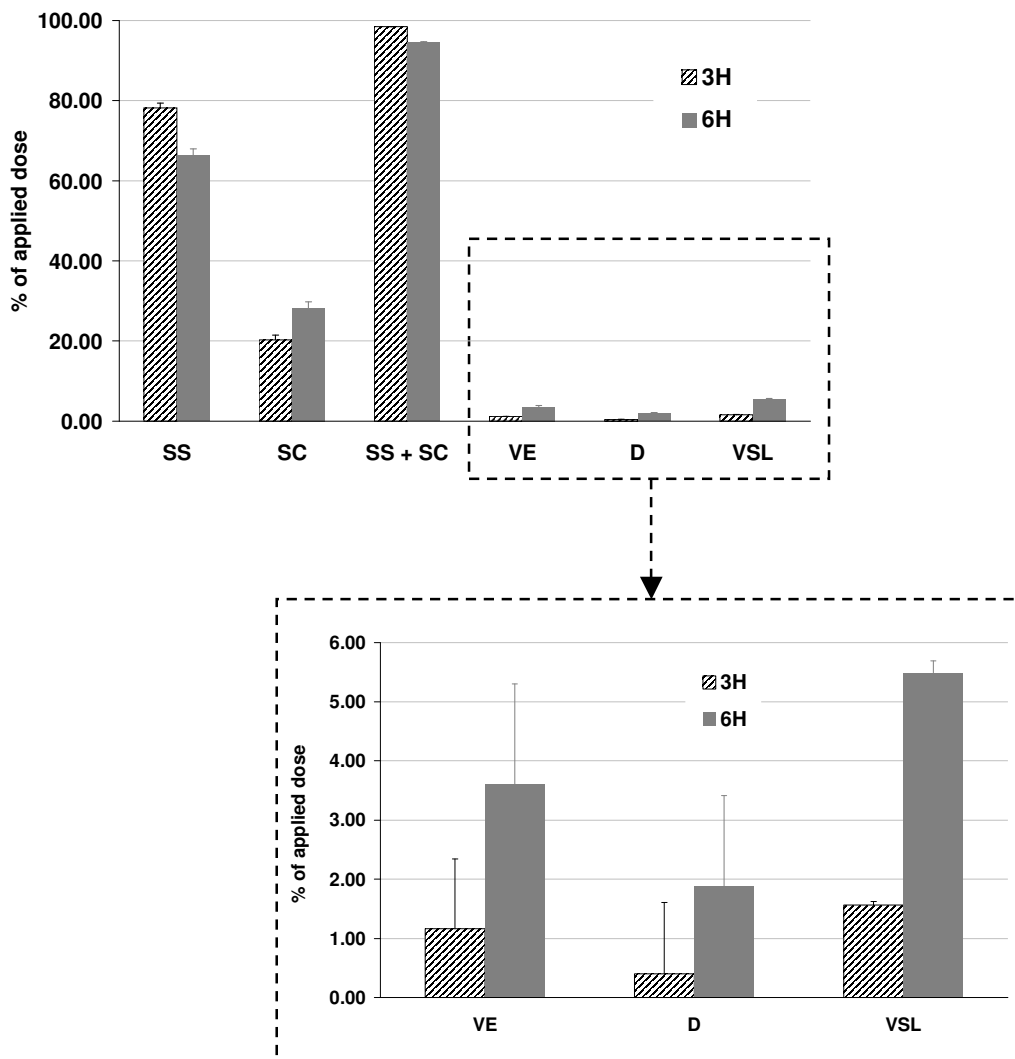
VE : viable epidermins

E : SC + VE (epidermis)

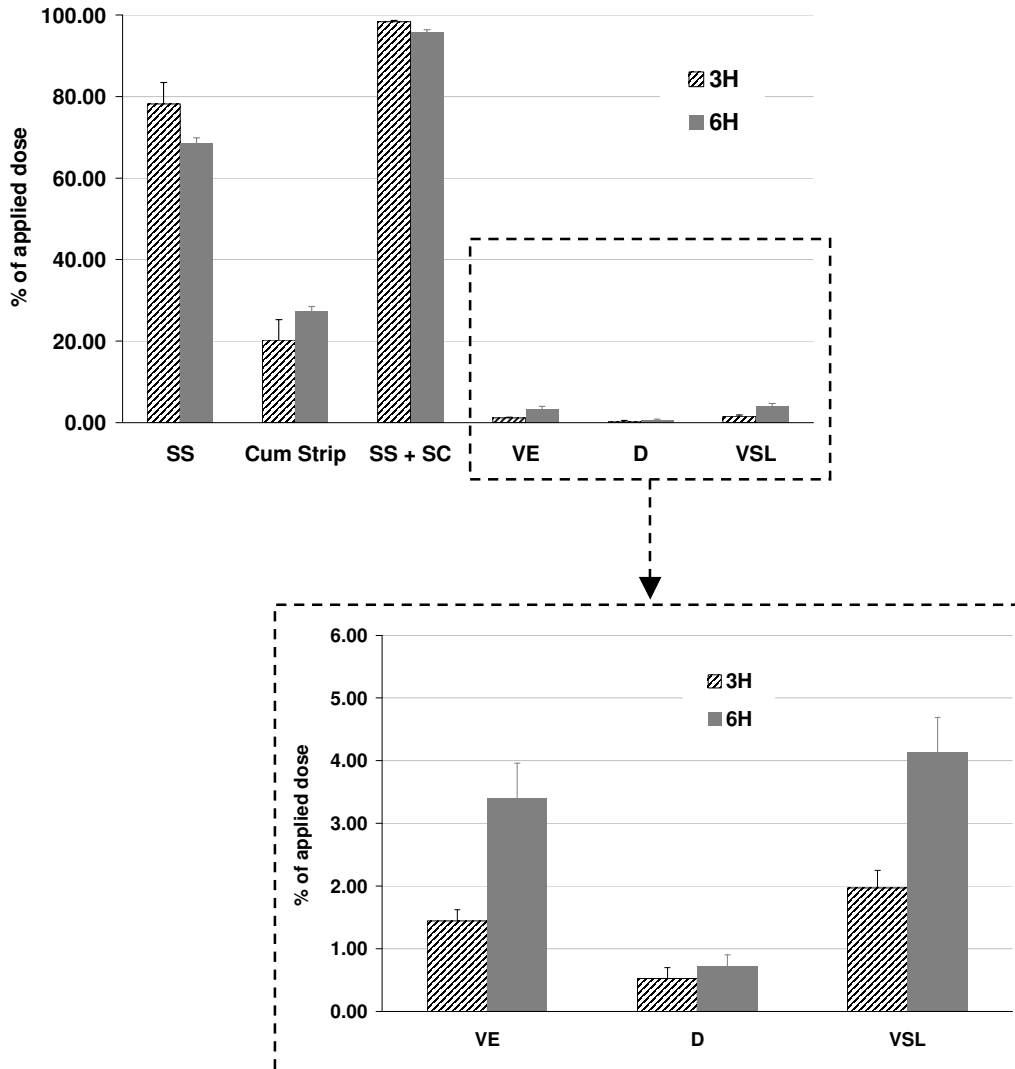
D : dermis

RF : receptor fluid

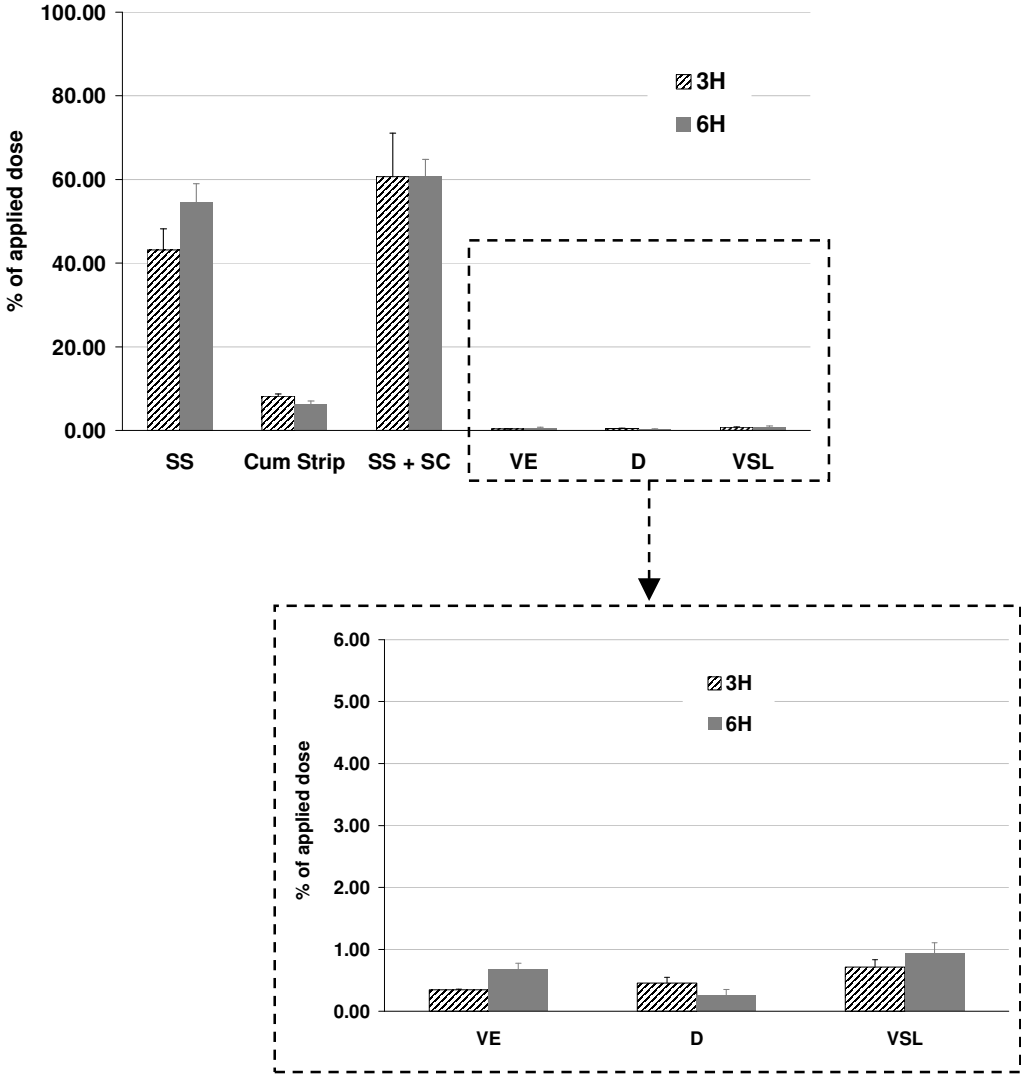
VSL : viable skin layers (VE+D+RF)



**Figure 1 : Percutaneous penetration of OMC for the control gel (OMC-Gel) at 3 and 6 h. Percentages of the OMC applied dose ( $\% \pm$  S.D.) in various skin layers : skin surface (SS), stratum corneum (SC), viable epidermis (VE), dermis (D) and viable skin layers (VSL=VE+D+RF receptor fluid) (n=6).**



**Figure 2 : Percutaneous penetration of OMC for BNC (protocol A) at 3 and 6 h. Percentages of the OMC applied dose (%  $\pm$  S.D.) in various skin layers : skin surface (SS), stratum corneum (SC), viable epidermis (VE), dermis (D) and viable skin layers (VSL=VE+D+RF receptor fluid) (n=6).**



**Figure 3 : Percutaneous penetration of OMC for UBNC (protocol B) at 3 and 6 h. Percentages of the OMC applied dose (% ± S.D.) in various skin layers : skin surface (SS), stratum corneum (SC), viable epidermis(VE), dermis(D) and viable skin layers (VSL=VE+D+RF receptor fluid) (n=6).**



## *DISCUSSÃO GERAL*



No cenário da saúde e também da estética a busca por tratamentos mais efetivos é o fator estimulante de novas e desafiadoras pesquisas. Dentro deste contexto a nanotecnologia surge como uma ferramenta inovadora na área do diagnóstico e da terapêutica. Esta estratégia é alicerçada na teoria de Erlich, em que partículas diminutas, vulgarmente conhecidas como “balas mágicas”, seriam capazes de carrear a moléculas ativas nelas associadas até sítios específicos de ação do organismo (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). Tendo por base esta teoria, os sistemas nanoparticulados passam a ser entendidos como uma estratégia promissora na administração, liberação e vetorização de substâncias ativas para os locais específicos do organismo onde devem exercer seus efeitos terapêuticos.

Levando em consideração a proposta de vetorização na área cosmética, onde o desenvolvimento de novas moléculas é um pouco limitado, torna-se necessária à utilização de substâncias já existentes, otimizando, então, seus efeitos. Dessa forma, a pesquisa na área da cosmética encontra-se bastante focada na formulação e na proposição de diferentes metodologias de encapsulação/ associação de substâncias.

Os vetores têm por objetivo principal transportar e proteger as substâncias ativas nele encapsuladas e este efeito deve se manter durante todo o transporte até o sítio de ação, provocando neste local a liberação controlada. No que se refere a cosmetologia estes vetores devem possuir requisitos de hipoalergenicidade, biodegradabilidade e inocuidade cutânea.

Os primeiros estudos explorando o princípio da vetorização iniciaram com os lipossomas, por volta de 1968; posteriormente, as nanopartículas foram desenvolvidas com a vantagem de apresentarem maior estabilidade em fluidos biológicos e durante o armazenamento que os lipossomas (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). Pesquisas apontaram que as vantagens destes sistemas estão relacionadas com o seu diminuto tamanho de partícula o que permite a penetração de substâncias neles associadas através de capilares existentes na pele e posterior captura pelas células cutâneas, resultando no acúmulo destas substâncias em determinados locais da pele. Outra vantagem destes sistemas é a capacidade de permitirem a encapsulação, dispersão ou dissolução de

substâncias com características físico-químicas variadas (Fahmy *et al.*, 2005). A versatilidade destes sistemas também possibilita que os mesmos sejam estudados para a administração por diferentes vias (Legrand *et al.*, 1999; Couvreur *et al.*, 2002).

De acordo com a vasta bibliografia existente sobre estes sistemas, bem como por sua atividade promissora, o presente trabalho centralizou-se no desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo a associação de um flavonóide, a quercetina (QUE) e de um filtro solar químico, o metoxicinamato de octila (MCO). A quercetina é um potente antioxidante, amplamente descrita na literatura pela efetiva atividade de bloquear radicais livres, atuando dessa forma, na prevenção de inúmeras patologias cuja etiologia está ligada a processos oxidativos. O estress oxidativo pode ocorrer ao nível de diferentes tecidos tais como sistema nervoso central, cardíaco e também cutâneo (envelhecimento cutâneo) (Grieb *et al.*, 1998; Rustin *et al.*, 1999).

O MCO é um filtro solar químico, UVB, presente atualmente em vários produtos de ação fotoprotetora e de reconhecida atividade frente à radiação UV, sendo que seu efeito protetor consiste na capacidade que possui de absorver esta radiação antes que a mesma entre em contato com a pele (Pattanaargson e Limphong, 2001). Embora este filtro químico apresente vantagens quanto à fotoproteção ele apresenta inconvenientes como fotosensibilização e fotoalergenicidade, além de ter sua capacidade de absorção diminuída por exposição à radiação (Tarras-Wahlberg *et al.*, 1999).

O grande alerta feito pelos órgãos de saúde em relação aos problemas relacionados à exposição solar bem como os inconvenientes dos fotoprotetores existentes no mercado estimularam a busca de novos produtos capazes de protegerem a pele da radiação solar de forma mais efetiva e com redução dos efeitos alergênicos. Por esta razão, a associação da QUE e do MCO em sistemas nanocarreadores poliméricos foi proposto como objetivo de estudo desta tese, uma vez que não existem relatos científicos com esta abordagem.

Percorrendo então, os objetivos específicos propostos, o Capítulo 2, focaliza-se na preparação das suspensões de nanocápsulas, fazendo em paralelo

uma avaliação qualitativa das formulações, uma vez que este parâmetro pode influenciar nas características físico-químicas dos sistemas obtidos (Mosqueira *et al.*, 2000; Schaffazick *et al.*, 2002). As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (Fessi *et al.*, 1989) e os resultados de caracterização das nanocápsulas comprovaram a viabilidade da obtenção destes sistemas nanoestruturados. As nanocápsulas foram preparadas com diferentes tensioativos, o Span 60<sup>®</sup> e o Epikuron 170<sup>®</sup>, com a finalidade de avaliar a influência que o tipo de tensioativo exerce sobre as características físico-químicas das suspensões obtidas. De uma forma geral, os sistemas apresentaram diâmetros de partículas inferiores a 500 nm e potências zeta negativos (-21 mV a -56 mV), sendo os resultados mais negativos para as formulações preparadas com Epikuron 170<sup>®</sup>. No que se refere aos teores de QUE e MCO, as formulações apresentaram valores para ambas as substâncias maiores que 90 %. As taxas de associação da QUE às nanocápsulas situaram-se próximas a 100 % e os valores de pH situaram-se entre 5,0 e 6,5.

Por se tratarem de formulações inovadoras fez-se necessário determinar experimentalmente se a nanoencapsulação contribuiria para a estabilização da QUE e MCO frente à degradação provocada pela radiação UVA, uma vez que o objeto de estudo consiste em um produto de aplicação fotoprotetora. Dessa forma, as formulações contendo como ativos a QUE e o MCO, apenas MCO, apenas QUE e soluções controles de QUE e MCO foram submetidas à radiação UVA por 15 dias. Durante este período os teores totais de QUE e de MCO, foram determinados nos tempos 3, 6, 9 12 e 15 dias e após este período foi possível perceber que o tipo de tensioativo influenciou nos resultados obtidos. As formulações preparadas com Span 60<sup>®</sup> permitiram maior estabilização tanto da QUE quanto do MCO, quando comparadas às formulações contendo Epikuron 170<sup>®</sup>. No entanto, os resultados também evidenciaram que além das características dos tensioativos a associação da QUE e MCO é fator fundamental para a estabilização de ambas as substâncias. As formulações contendo apenas QUE ou apenas MCO, apresentaram, ao final de 3 dias de exposição à radiação teores em torno de 50 %, constituindo-se sistemas menos estáveis que as

nanocápsulas contendo a associação da QUE e do MCO. As suspensões de nanocápsulas também apresentaram resultados superiores às soluções controles de QUE e MCO comprovando a capacidade dos sistemas nanoparticulados em proteger as substâncias nela associadas. As análises das formulações de nanocápsulas por calorimetria diferencial exploratória demonstraram que a presença da QUE não influenciou no comportamento térmico das mesmas e que a PCL interage com o núcleo oleoso utilizado (MCO), independente do tipo de composição das suspensões de nanocápsulas analisadas.

A associação da QUE com o MCO teve como objetivo principal a obtenção de um produto versátil do ponto de vista de proteção solar. Sabe-se que os filtros químicos têm a sua eficiência diretamente ligada ao tempo de exposição frente à radiação solar, ou seja, à medida que absorvem a radiação sofrem alterações em sua estrutura química que provocam perda na capacidade de absorção da radiação. Além disso, estudos recentes mostram que alguns filtros químicos produzem radicais livres quando em contato com a pele (Hanson *et al.*, 2006). Neste contexto, a presença de um antioxidante associado a um fotoprotetor, terá a função de bloquear os radicais livres gerados durante a exposição solar protegendo a pele dos danos oxidativos e contribuindo para a preparação de um produto de aplicação solar mais eficaz.

Levando em consideração os resultados obtidos nos testes de estabilidade, o terceiro capítulo desta tese direcionou-se para a avaliação do potencial antioxidante das suspensões de nanocápsulas. Utilizou-se para esta verificação um modelo *in vivo* de células de *Saccharomyces cerevisiae* onde se avaliou a capacidade das suspensões de nanocápsulas contendo QUE e MCO em proteger as células de levedura frente aos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio, agente estressor escolhido para este ensaio. Além disso, foram testadas as soluções preparadas apenas com QUE e MCO. O teste de avaliação do potencial antioxidante, mediante determinação da taxa de sobrevivência transcorreu durante um tempo máximo de incubação de 35 h com tempos específicos de avaliação das taxas de sobrevivência (1, 7, 15, 20, 25, 30, 35 h). Os resultados destes testes demonstraram que as nanocápsulas contendo QUE e MCO foram capazes de

reduzir a mortalidade das células de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao agente estressor. A associação da QUE com o MCO contribuiu para a viabilidade celular, o que pode ser atribuído à existência de um efeito sinérgico entre estas substâncias. Em relação aos tensioativos testados, as formulações preparadas com Span 60<sup>®</sup> foram mais efetivas, o que permitiu concluir, aliando estes resultados com os obtidos no Capítulo 2 que as nanocápsulas preparadas com este tensioativo são mais promissoras. Ao final do tempo de 35 h observou-se que a liberação da QUE a partir das nanocápsulas teve início no tempo 7 h e manteve-se de forma gradual até as 35 h. Este resultado pode ser justificado através da comparação entre os valores de taxa de sobrevivência celular das amostras em que foi adicionada suspensão de nanocápsulas com as taxas de sobrevivência das amostras que receberam o agente estressor. As taxas de sobrevivência entre estas amostras foram significativamente diferentes, nos tempos testados, permitindo inferir que os sistemas nanoparticulados possuem a capacidade de provocar liberação controlada das substâncias neles associadas (Alvarez Román *et al.*, 2004a; Sahoo e Labhastwar, 2004). Esta vantagem é desejável no caso de encapsulação de substâncias que são instáveis ou então irritantes em altas concentrações (Couvreur *et al.*, 2002).

Os testes de estabilidade e de determinação do potencial antioxidante permitiram traçar um perfil da formulação proposta, evidenciando que para ambos os testes as potencialidades destes sistemas estão relacionadas com o tipo de tensioativo utilizado bem como da associação da QUE e do MCO.

Após estas primeiras etapas de estudo, através das quais foi possível selecionar a melhor formulação de nanocápsulas, o próximo capítulo tratou da sua incorporação em formulações semi-sólidas para aplicação tópica. Assim, o Capítulo 4 desta tese apresenta os resultados dos estudos de permeação e penetração cutânea das suspensões de nanocápsulas em formulações semi-sólidas, os quais foram desenvolvidos no Laboratório de Dermofarmacia e Cosmetologia da Universidade Claude Bernard (Lyon-France) sob orientação do Prof. Dr Hatem Fessi. As suspensões de nanocápsulas contendo QUE e MCO foram incorporadas em uma emulsão do tipo O/A e também em um gel hidrofílico

em concentração correspondente a 5 % de MCO. Os estudos foram conduzidos em células de Franz, utilizando como membrana de permeação a pele de porco. As amostras utilizadas para os testes foram: gel com nanocápsulas (5 % de MCO), e gel contendo MCO livre (5 %). O gel contendo nanocápsulas foi analisado quanto o teor total de MCO após preparação e após 7 dias. O resultados obtidos demonstraram a estabilidade das suspensões de nanocápsulas após a incorporação no gel, comprovando, então, que não houve liberação do filtro químico para o veículo. Este mesmo procedimento foi realizado para a emulsão O/A, no entanto, o resultado não foi satisfatório, uma vez que algumas horas após a incorporação da suspensão de nanocápsulas foi possível encontrar cerca de 50 % de MCO no veículo. O resultado obtido para a emulsão pode ser atribuído a grande concentração de tensoativos presentes na formulação, sendo estes responsáveis pela desestabilização do sistema nanoparticulado. Os testes de penetração cutânea foram conduzidos, avaliando-se sempre os teores de MCO, pois a concentração de QUE utilizada na preparação das suspensões de nanocápsulas, após a incorporação no gel e acima de tudo após aplicação na pele encontrava-se abaixo do limite de detecção da técnica utilizada.

As amostras foram então aplicadas sobre a pele de porco sendo a quantidade de aplicação definida por protocolos específicos. As células foram incubadas por 3 e 6 h e a cada um destes tempos a pele foi processada para análise do teor total de OMC.

A avaliação do perfil de liberação do MCO utilizou a técnica de “tape stripping”, com o objetivo de verificar as diferentes concentrações deste filtro químico presentes nas camadas mais externas da epiderme; além disso, os teores de MCO também foram determinados na epiderme viável, derme e líquido receptor. A avaliação do perfil de penetração do MCO na pele também teve como propósito o desenvolvimento de uma metodologia capaz de quantificar apenas o MCO liberado na pele, ou seja, o MCO livre. Cabe ressaltar que os estudos relatados até o presente momento descrevem a utilização de solventes que provocam a total solubilização da fração polimérica destes sistemas, realizando apenas a determinação do MCO total (livre e encapsulado).

Ao final dos ensaios de penetração verificou-se que as nanocápsulas associadas ao gel hidrofílico não permitiram a passagem do MCO até o líquido receptor, comprovando ausência de absorção deste filtro. Além disso, observou-se que a maior quantidade de MCO foi localizada na superfície cutânea, o que é satisfatório para um produto destinado à aplicação solar. A utilização do miristato de isopropila como forma de verificação do MCO livre demonstrou que as nanocápsulas, não propiciaram maior penetração do filtro químico, mas provocaram uma liberação lenta e gradual deste filtro, na superfície cutânea, atingindo um teor de cerca de 78 %, após 6 h de aplicação do produto. Esta constatação está de acordo com os trabalhos desenvolvidos por Alvarez-Román (2004 a, b), para o mesmo filtro químico, através dos quais foi verificado que as nanocápsulas, devido seu diminuto tamanho de partícula, ao invés de propiciarem um grande perfil de penetração, se acumulam em determinadas regiões da pele provocando a liberação lenta das substâncias nela contidas.

De uma forma global, os resultados obtidos neste trabalho comprovaram que a associação da QUE e do MCO nas nanocápsulas é promissora, para o desenvolvimento de um produto fotoprotetor, bem como a utilização de nanocápsulas configura-se em um sistema satisfatório para a liberação gradual do MCO na pele. Adicionalmente, algumas metodologias utilizadas neste trabalho como a avaliação do potencial antioxidante e da quantidade de MCO livre nas diferentes camadas da pele, são pouco exploradas ou até mesmo inovadoras, constituindo-se, portanto, ferramentas importantes para os estudos de novas formulações de base nanotecnológica para aplicação cutânea.



## *CONCLUSÕES*



- Suspensões de nanocápsulas contendo quercetina (1mg/mL) e metoxicinamato de octila (0,033 g/mL), utilizando Epikuron 170<sup>®</sup> e Span 60<sup>®</sup> foram preparadas através do método de nanoprecipitação e demonstraram ser sistemas viáveis, no que diz respeito ao tamanho de partícula (200 a 500 nm), potencial zeta (-21 a -56 mV) e taxas de associação (em torno de 100 %);
- A avaliação morfológica (microscopia eletrônica de transmissão) das suspensões de nanocápsulas preparadas com quercetina e metoxicinamato de octila, independentemente do tensioativo utilizado indicou a presença de formas esféricas com superfície rugosa;
- As formulações contendo ambas as substâncias, quercetina e metoxicinamato de octila, mantiveram a concentração destas substâncias mais elevadas após a exposição à radiação UVA por 15 dias;
- As soluções aquosas e metanol/ água (80:20) (v/v) de quercetina e metoxicinamato de octila apresentaram intensa degradação durante o teste de estabilidade à radiação UVA por 15 dias;
- As suspensões de nanocápsulas preparadas com Span 60<sup>®</sup>, conferiram maior fotoestabilidade à quercetina e ao metoxicinamato de octila que as formulações preparadas com Epikuron 170<sup>®</sup>;
- Foi possível avaliar o potencial antioxidante das suspensões de nanocápsulas utilizando linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- As suspensões de nanocápsulas quando testadas sem o agente estressor não demonstraram efeitos tóxicos frente às células de levedura, ou seja, os componentes da formulação não foram tóxicos, nas concentrações testadas;

- As suspensões de nanocápsulas contendo quercetina e metoxicinamato de octila mostraram atividade antioxidante *in vivo* significativa frente aos danos causados pelo peróxido de hidrogênio, principalmente quando comparadas a uma solução de quercetina;
- A atividade antioxidante das suspensões de nanocápsulas pode ser atribuída à capacidade de liberação lenta da quercetina a partir destes sistemas. Esta atividade iniciou-se após 7 h de incubação e manteve-se até 35 h;
- As suspensões de nanocápsulas preparadas com Span 60<sup>®</sup> apresentaram taxas de sobrevivência mais elevadas do que aquelas obtidas para as formulações preparadas com Epikuron 170<sup>®</sup>;
- Os ensaios de penetração cutânea das suspensões de nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila incorporadas em um gel hidrofílico comparados ao mesmo gel contendo 5 % deste (porém na sua forma livre) permitiram constatar que os sistemas nanoparticulados ocasionam uma liberação lenta deste filtro, após aplicação na pele;
- A metodologia de “tape stripping” constituiu-se em ferramenta fundamental para a determinação da quantidade de metoxicinamato de octila nas diferentes camadas da epiderme. A maior concentração deste filtro localizou-se na camada mais superficial da epiderme;
- Os ensaios de penetração demonstraram que as nanocápsulas não induzem a absorção do metoxicinamato de octila, uma vez que este filtro não foi detectado no líquido receptor das células de Franz.

- A grande concentração de metoxicinamato de octila encontrada na superfície da pele demonstra que as nanocápsulas são sistemas, que devido seu tamanho reduzido de partícula são capazes de se acumular nas estruturas cutâneas provocando a liberação lenta das substâncias contidas nestes carreadores;
- Não foi possível evidenciar diferença significativa entre os perfis de liberação do gel contendo metoxicinamato de octila livre e do gel contendo o metoxicinamato de octila associado às nanocápsulas em termos de concentração total deste filtro químico nas diferentes estruturas cutâneas, após 3 h de incubação. Esta diferença passa a ser observada após 6 h de incubação principalmente ao nível de derme, no entanto, em termos globais pode se dizer que não houve diferença significativa e este resultado pode ser atribuído as características do veículo;
- A diferença entre os perfis de liberação do gel contendo ou não nanocápsulas é observada quando se utiliza a metodologia com o miristato de isopropila. Esta metodologia permite evidenciar que após 3 h de incubação existe diferença significativa entre o teor de metoxicinamato de octila encontrado, sobretudo na superfície cutânea e epiderme viável, quando se utiliza o protocolo A (acetonitrila) e o protocolo B (miristato de isopropila), demonstrando que neste tempo ainda existe filtro encapsulado que passa a ser liberado nas diferentes camadas da pele com o passar do tempo.
- A metodologia de determinação da concentração de metoxicinamato de octila durante os tempos estudados, no teste de penetração cutânea, demonstrou ser capaz de traçar o comportamento das nanocápsulas durante a liberação do OMC nas diferentes camadas da pele;

- O conjunto de resultados obtidos e apresentados nesta tese demonstram a viabilidade tecnológica em se obter suspensões de nanocápsulas contendo quercetina e metoxicinamato de octila. Estes sistemas mostraram-se eficazes em estabilizar ambas as substâncias, em conferir um potencial antioxidante e foram passíveis de incorporação em bases de aplicação cosmética. Estas formulações foram promissoras na manutenção de níveis satisfatórios do filtro químico na superfície cutânea.

## *REFERÊNCIAS*



## REFERÊNCIAS

Abdulmajed, K. & Heard, C.M. Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug. 1. Synthesis, penetration into and permeation across human skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 6, 280 (1-2), p. 113-24, 2004.

Adegoke, G.O.; Kumar, M.V.; Krishna, A.G.G.; Varadaj, M.C.; Sambaiah, K.; Lokesh, B.R. Antioxidants and lipid oxidation in foods- a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, v. 35(4), p. 283-298, 1998.

Agache, P.; Mary, S.; Muret, P.; Matta, A. M.; Humbert, T.P. Assesment of the water content of the stratum corneum using a sorption desorption test. *Dermatology*, v. 2002, p. 308-313, 2001.

Allemán, E.; Gurny, R.; Doelker, E. Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 87, p. 247-253, 1992.

Allen, J. M.; Gossett, C. J.; Allen, S. K. Photochemical formation of singlet molecular oxygen in illuminated aqueous solution of several commercially available sunscreen active ingredients. *Chemical Research Toxicology*, v. 9, p. 605-609, 1996.

Al Khouri, N.; Roblot-Treupel, L.; Fessi, H.; Devissaguet, J-P.; Puisieux, F. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 28, p. 125-132, 1986.

Alvarez-Román, R.; Barré, G.; Guy, R.H.; Fessi, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, p. 191-195, 2001.

Alvarez-Román, R.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Guy, R.; Fessi, H. Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v.21; n. 10, p. 1818-1823, 2004a.

Alvarez-Román, R.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Guy, R.; Fessi, H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 301-316, 2004b.

Ammoury, N.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Allix, M.; Plotkine, M.; Boulu, R. G. Effect on cerebral blood flow of orally administered indomethacin-loaded poly(isobutylcyanoacrylate) and poly(DL-lactide) nanocapsules. *Journal of Pharmaceutical and Pharmacology*, v. 42, p. 558-561, 1990.

Ammoury, N.; Dubrasquet, M.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; Benita, S. Indomethacin - loaded poly (D, L-lactide) nanocapsules: protection from gastrointestinal ulcerations and anti-inflammatory activity evaluation in rats. *Clinical Materials*, v.13, p. 121-130, 1993.

Aquino, R.; Morelli, S.; Tomaino, A.; Pellegrino, M.; Saija, A.; Grumetto, L.; Puglia, C.; Ventura, D.; Bonina, F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, v.79, p. 183-191, 2002.

Areias, F.M.; Rego, A.C.; Oliveira, C.R.; Seabra, R.M. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/ Fe +2- induced oxidative stress in culture retinal cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 62, p. 11-118, 2001.

Aruoma, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chemical and Toxicology*, v. 32(7), p. 671-683, 1994.

Asbill, C.S & Machniak, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *Research Focus*, v. 3, n. 1, p. 35-40, 2000.

Aust, E.D.; Chignell, C.F.; Bray, Y.M.; Kalyana-Raman, B.; Mason, R.P. Contemporary issues in toxicology: free radicals in toxicology. *Toxicology Applied and Pharmacology*, v. 120, p.168-178, 1993.

Babior, B.M. Superoxide: a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medicine and Biology Research*, v. 30(2): p. 141-155, 1997.

Bach, M.; Lippold, B.C. Percutaneous penetration enhancement and its quantification. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*, v. 46, p.1-13, 1998.

Beckman, K. B. & Ames, B.N. The free radical theory of aging matures. *Physiology. Review*, v. 78(2), p. 547-581, 1998.

Bastuji-Garin, S.; Diepgen, T.L. Cutaneous malignant melanoma, sun exposure and sunscreen use: epidemiological evidence. *British Journal Dermatology*, v. 146, p. 24-30, 2002.

Benthey, M.V.L.B. Desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo corticosteróides: Avaliação da liberação e penetração transcutânea por metodologia *in vitro*, 155 p. Dissertação (Doutorado) Curso de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 1994.

Berlett, B.S. & Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 272, n. 33, p. 20313-20316, 1997.



- Bernareggi, A. Clinical pharmacokinetics of nimesulide. *Clinical Pharmacokinetics*, v.35 (4), p. 247-274, 1998.
- Biloti, D.N.; Reis, M.M.; Ferreira, M.M.C.; Pessine, F.B.T. Photochemical behaviour UVA radiation of  $\beta$ - cyclodextrin included Parsol<sup>®</sup> 1789 with a chemometric approach. *Journal of Molecular Structure*, v. 480-481, p. 557-561, 1999.
- Blanco, M.D.; Bernardo, M.V.; Teijón, C.; Sastre, R.L.; Teijón, M.J. Transdermal application of bupivacaine-loaded poly(acrylamide(A)-co-monomethyl itaconate) hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 255, p. 99-107, 2003.
- Blum, D.; Torch, S.; Nissou, M.F.; Banabib, A.L.; Verna, J.M. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. *Neuroscience. Lett*, v. 283, p.193-196, 2000.
- Bonina, F.; Lanza, M.; Montenegro, L.; Puglisi, C.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Castelli, F.; Saija, A. Flavonoides as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 145, p. 87-94, 1996.
- Borgia, S.L.; Regehly, M.; Sivarmakrihnan, R.; Mehnert, W.; Korting, H.C.; Danker, K.; Röder, B.; Kramer, K. D.; Schäfer-Korting, M. Lipide nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and pareletric spectroscopy. *Journal of Controlled Release*, v.110, p.151-163, 2005.
- Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants-determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymology*, v. 186, p. 343-355, 1990.
- Boveris, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B. Aires)*, v. 58, p. 350-356,1998.
- Busch, C. H.; Macmillan, M.; Gillespy, M.; Fessler, R.G.; Montgomery, W.J. CT-guided percutaneous fusion of the lumbosacral spine. *Radiology*, v. 185, p: 117-117 Suppl, 1992.
- Bulkley, G.B. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery*, v. 113(5), p. 479-483, 1993.
- Cal, K. How does the type of vehicle influence the in vitro skin absorption and elimination Kinetics of terpenes. *Archives Dermatology Research*, v. 297, 311-315, 2006.
- Cantral, A.; McGarvery, D. J.; Truscott, T.G. Photochemical and photophysical properties of sunscreens. In: Giacomoni P.U. (ed). *Sun protection in man*. Amsterdam: Elsevier, p. 495-519, 2001.

Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997.

Casagrande, R.; Georgetti, S. R.; Verri, W. A.; Dorta, D. J.; Dos Santos, A. C.; Fonseca, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB- induced oxidative stress in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 84, p. 21-27, 2006.

Caswell, M. Sunscreen formulation and testing. *Cosmectic & Toiletries*, v.116, n.9, 2000.

Cevc, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p. 675-671, 2004.

Chasteigner, S.; Fessi, H.; Cavé, G.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux. Gastrointestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules. *STP Pharma Sciences*, v. 5, n. 3, p. 242-246, 1995.

Citernes, U. Photostability of sun filters complexed in phospholipids or  $\beta$ -cyclodextrin. *Cosmetics & Toiletries*, v. 116, n. 9, p. 77-86, 2001.

CNRS. Paris, Centre National de la Recherche Scientifique. Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: < [http:// www. cnrs. fr](http://www.cnrs.fr) >. Acesso em 10 jan. 2007.

COLIPA, Cosmetics Ingredients: Guidelines for percutaneous absorption/ penetration. The European Cosmetic Toiletry and Perfumery associatio, COLIPA. 2 ed, agosto 1997.

Conjacaru, A.F.; Ruzieva, R.I.I.; Topaly, E.E.; Topaly, V.P. Uncoupling of oxidative phosphorylation by pea flavonoids. I. Model experiments with lipids artificial membranes. *Study Biophysical*, v. 72, p. 15-22, 1978.

Contreras, M.J.F.; Soriano M.M.J.; Diéguez A.R. In vitro percutaneous absorption of all-trans retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 297, p. 134-145, 2005.

Cornwell, P. A.; Barry, B. W. Effects of penetration enhancer treatment on the statistical distribution of human skin permeabilities. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 117, p. 101-112, 1995.

Couvreur, P.; Dubernet, C.; Puisieux, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical*, v. 41, n. 1, p. 2-13, 1995.

Couvreur, P.; Barrat, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C. Nanocapsule Technology: A review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System*, v. 19, p. 99-134, 2002.

Cronin, M. T. D.; Dearden, J. C.; Moss, G. P.; Murray-Dickson, G. Investigation of the mechanism of flux across human skin in vitro by quantitative structure-permeability relationships. *European Journal of Pharmaceuticals Sciences*, v. 7, p. 325-330, 1999.

Cross, S.E.; Pugh, W.J.; Hadgraft, J.; Roberts, M.S. Probing the effect of Vehicles on topical Delivery: Understanding the Basic Relationship Between Solvent and Solute Penetration Using Silicone Membranes. *Pharmaceutical Research*, v. 18(7), p. 999-1005, 2001.

Cross, S.E.; Magnusson, B. M.; Winckle, G.; Anissimov, Y.; Roberts, M.S. Determination of the effects of lipophilicity on the in vitro permeability and tissue reservoir characteristics of topically applied solutes in human skin layers. *Journal Investigation on Dermatology*, v. 120(5), p. 759- 764, 2003.

Darr, D.; Pinnel, S. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Protection in Photodermatology. In: Lowe, N.J.; Shaat, N.A.; Pathak, M.A. *Sunscreen: Development, Evaluation and Regulatory Aspects*. Marcel Dekker: New York, 1997, p. 155-174.

Dechemeux, T.; Dubois, F.; Beauloye, C.; Wattiaux-de-Coninck, S.; Waniaux, R. Effect of various flavonoids on lysosomes subjected to an oxidative stress. *Biochemistry and Pharmacology*, v. 44, p. 1243-1248, 1992.

De Souza, K.C.B.; Schapoval, E.E. S.; Bassani, V.L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O- methylquercetin an Achyroline satureioides preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 771-777, 2002.

Devissaguet, J-P.; Seine, N.; Fessi, H.; Puisieux, F.; Alfort, M. *Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules*. US n. PI 5,049,322, 17 sep., 1991.

Diaz, J.; Serrano, E.; Acosta, F. Carbonell, L. F. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. *Clinical and Chemistry*, v.44, n.10, p. 2215-2217,1998.

Dick, I. P.; Scott, R. C. Pig ear skin as an *in vitro* model for human skin permeability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 44 (8), p. 640-645, 1992.

Diffey, B. Sunscreen isn't enough. *Journal and Photochemistry and Photobiology*, v. 64, p. 105-108, 2001.

Dijk, C.; Driessen, A.J.M.; Recourt, K. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochemical Pharmacology*, v. 60, p. 1593-1600, 2000.

Dingler.; Blum,R.P.; Niheus,H.; Muller, R.H.; Gohlas. Solid lipid nanoparticles (SLN tm/ Lipopearls TM)- a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. *Journal Microencapsulation*, v. 16, n. 6, p. 751-767, 1999.

Dringen, R. Metabolism and function of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol*, v. 62, p. 649-671, 2000.

Dugas, A. J.; Castañeda-Costa, J.; Bonin, G.C.; Price, K.L.; Fischer, N. H.; Winston, G.W. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *Journal Natural Products*. v. 63, p. 327-331, 2000.

Dunn, R.L. Polymeric matrices. In: Ottenbrite, R. M.; Dunn, L. R. *Polymeric Drugs Delivery and Drugs Delivery Systems*. Washington, D. C: American Chemical Society, p.182-193, c. 2, 1991.

Essa, E.A.; Bonner, M.C.; Barry, B. W. Human skin sandwich for assessing shunt route penetration during passive and iontophoretic drug and liposome delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 54, p. 1481-1490, 2002.

Fahmy, T.M.; Fong, P.M.; Goyal, A.; Saltzman, W.M. *Targeted for Drug Delivery*. *Nanotoday*. August, p. 18-26, 2005.

Fawaz, F.; Bonini, F.; Guyot, M.; Laguény, A. M.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph. Disposition and protective effect against irritation after intravenous and rectal administration of indomethacin loaded nanocapsules to rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 133, p. 107-115, 1996.

Felippe Jr., J. & Percário, S. Radicais livres em medicina intensiva. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 3(3), p. 66-72,1991.

Fernandez, C.; Mart-Mestres, G.; Ramos, J.; Maillols, H. LC analysis of benzophenone-3 application to determination of in vitro and in vivo skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 155-165, 2000.

Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-Ph. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. *European Patent*, 0274961 A1, 1988.

Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-Ph.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, R1-R4, 1989.

Filho, D.W.; Silva, E.L.; Boveris, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. São Paulo: Argos Editora Universitária. p. 317, 2001.

Florence, A. T & Attwood, D. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

Foldvari, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 3, n.12, p. 417-425, 2000.

Forman, H.J. & Thomas, M.J. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Annu. Ver. Physiology*. v. 48. p. 669-680, 1986.

Fórmica, J. V.; Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical and toxicology*, v. 33, p. 1061-1080, 1995.

Frankel, E.N. Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*, v. 19, p. 1-22, 1980.

Franz, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of the *in vitro* data. *Journal of Investigative Dermatology*, 64, p. 190-196, 1975.

Fridovich, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

Gallardo, M. M.; Treupel, L.; Matheau, J.; Genin, I.; Couvreur, P.; Plat, M.; Puisieux, F. Nanocapsules et nanospheres d'alkylcyanoacrilate, interactions principe actif/polymere. *International Technologie Pharmaceutique*, v. 4, p. 36-45, 1989.

Gallardo, M. M.; Couarraze, G.; Denizot, B.; Treupel, L.; Couvreur, P.; Puisieux, F. Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 100, p. 55-64, 1993.

Gasparro, F.P. New perspectives in sunscreen photobiology. In: Gasparro, F.P. *Molecular, cellular and physiological aspects*. Berlin: Springer- Verlag. p. 177-186, 1997.

Gawkrodger, D. *Dermatologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Gomathi, K.; Gopinath, D.; Rafiuddin Ahmed, M.; Jayakumar, R. Quercetin incorporates collagen matrices for dermal wound healing process in rat. *Biomaterials*, v. 24; p. 2767-2772, 2003.

Grieb, P.; Ryba, M.S.; Debicki, G.S.; Gordon-Kracejer, W.; Januszewski, S.; Chrapusta, S.J. Change in oxidative stress in the rat brain during post cardiac

arrest reperfusion, and the effect of treatment with the free radical scavenger idebenone. *Resuscitation*, v. 39, p. 107-113, 1998.

Guardia, T.; Rotelli, A.E.; Juarez, A.O.; Pelzer, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Fármaco*, v. 56, p. 683-687, 2000.

Guterres, S. S. *Etude pharmacotechnique, pharmacocinetique et de tolerances digestive et tissulaire des nanocapsules de diclofenac*. Paris: Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, 1995. Tese de Doutorado em Farmácia).

Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Devissaguet, J-P.; Puisieux, F. Poly (D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 113, p. 57-63, 1995.

Hanson, K.M.; Gratton, E.; Bardeen, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free radical Biology & Medicin*, v. 41, p. 1205-1212, 2006.

Inal, M.E.; Kaharaman, A. Antioxidant anzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Toxicology*, v.154, p. 21-29, 2000.

Hadgraft, J.; Peck, J.; Williams, D.G.; Pugh, W. J.; Allan, G. Mechanisms of action of skin penetration enhancers/retarders: Azone and analogues. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 141, p. 17-25, 1996.

Hadgraft, J. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 224, p. 1-18, 2001.

Hagedorn-Leweke, U.; Lippold, B.C. Accumulation of sunscreen and other compounds in keratinous substrates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 46, p. 215-221, 1998.

Halliwell, B. & Gutteridge, M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal*, v. 219, p. 1-14, 1984.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysical*, v. 246(2), p. 501-514, 1986.

Halliwell, B. & Aruoma, O.I. DNA damage by oxigen derived species. *FEBS*, v. 281 (1/2), p. 9-19, 1991.

Halliwell, B. & Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *American Journal of Clinical Nutritional*, v. 57, p. 715-725, 1993.

Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Löliger, J.; Aruoma, O.I. The characterization of antioxidants. *Food Chemical and Toxicology*, v. 33(7), p. 601-617, 1995.

Halliwell, B & Gutteridge, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. 3 ed. Oxford University press: New York, 2000.

Hanson, K. M.; Gratton, E.; Bardeen, C. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 41, 1205-1212, 2006.

Harbone, J.B.; Willians, C. Advances in flavonoides reserch since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.

Hardgraft, J. Passive enhancement strategies in topical an transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 184 (1), p. 1-6, 1999.

Hayashi, S.; Takeshita, H.; Nagao, N.; Nikaido, O.; Miwa, N. The relationship between UVB screening and cytoprotection by microcorpuscular ZnO or ascorbate against DNA photodamage and membrane injuries in keratinocytes by oxidative stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 64, p. 27-35, 2001.

Heim, Kelly. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants:chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 572-584, 2002.

Henriques, J.A.P.; Dafré, A.L.; Picada, J.N.; Maris, A.F.; Salvador, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. (Ed) *Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria*, v. 1. Guaíba, Agropecuária, p.227-252, 2001.

Hertog, M.G.L.; Hollman, P. C. H. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea, wine and fruit juice. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v.41, p. 1241-1246, 1993.

Imlay, J.A. & Linn, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, v. 24, p. 1302-1309, 1998.

Inal, M.E.; Kahramant, A.; Kokent, T. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clinical and Experimental Dermatology*, v.26, p. 536-539, 2001.

Ingold, K. U.; Bowry, V. W.; Stocker, R. Autoxidation of lipids and antioxidation the contrast between bulk lipids and low density lipoproteins. *Abstracts of papers of the american chemical society* 205: 126-ORGN, Part 2, 1993.

Jacobi, U.; Tassapoulus, T.; Surber, C.; Lademann, J. Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Archive Dermatology Research*, v. 297, p. 303-310, 2006.

Jager, A. D.; Ellis, H.; Hundt, H. K. L.; Swart, K. J.; Hundt, A. F. High-performance liquid chromatographic determination with amperometric detection of piroxicam in human plasma and tissues. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 729, p. 183-189, 1999.

Jalón, E. G.; Blanco-Prieto, M. J.; Ygartua, P.; Santoyo, S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 226, p. 181-184, 2001.

Jamouille, J. C. Cutaneous Penetration. *Annales de dermatologie et de venerologie*, v. 115 (5), p. 627-640 1988.

Jenning, V.; Gysler, A.; Schafer-Korting, M.; Gohla, S.H. Vitamin A loaded solid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *European Journal of Biopharmaceutics*, v.49, p. 211-218, 2000 a.

Jenning, V.; Gysler, A.; Schafer-Korting, M.; Gohla, S.H. Vitamin A loaded solid nanoparticles for topical use: drug release properties. *Journal of Controlled Release*, v. 66, p. 115-126, 2000b.

Jiang, R.; Roberts, M.S.; Prankerd, R.J.; Benson, H.A.E. Percutaneous absorption of sunscreen agents from liquid paraffin: Self-association of octyl salicylate and effects on skin flux. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 86, n. 7, p. 791-796, 1997.

Jiménez, M. M.; Pelletier, J.; Bobin, M.F. Matini, M. C. Fessi, H. Poly-epsilon – caprolactona nanocapsules containing octyl methoxycinnamate: Preparation and characterization. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 9, n.3, p. 329-339, 2004a.

Jiménez, M.M.; Pelletier, J.; Bobin, M.F.; Martini, M.C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 272, p. 45-55, 2004b.

Kalia, N. Y.; Guy, R. H. Modeling transdermal drug release. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, n. 2-3, p. 159-172, 2001.

Kamikkanann, N.; Singh, N. Skin permeation enhancement effect and skin irritation of saturated fatty alcohols. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 248, p. 219-228, 2002.

Kattan, E.; Asbill, C. S.; Haidar, S. Transdermal testing: practical aspects and methods. *Pharmaceutical Science Technology Today*, v.3 (12), p. 426-430, 2000.



- Kawanishi, S.; Hiraku, Y.; Oikawa, S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Research*, v. 488, p. 65-76, 2001.
- Klein, K. Sunscreen products: Formulation and regulatory considerations. In: Lowe, N. J.; Shaat, N. A.; Pathak, M. A.; *Sunscreen: Development, Evaluation and Regulatory Aspects*. Marcel Dekker: New York, 1997.
- Kligman, L.; Kligman, A. Ultraviolet radiation-Induced Skin Aging. In: Lowe, N. J.; Shaat, N. A.; Pathak, M. A.; *Sunscreen: Development, Evaluation and Regulatory Aspects*. Marcel Dekker: New York, 1997.
- Kootstra, A. Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Molecular Biology*, v. 26, p. 771-774, 1994.
- Kourie, J.I. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, v. 275(1), p.C1-C24, 1998.
- Kreuter, J. Nanoparticle-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v. 16, p. 169-176, 1991.
- Kwon, G.E.; Okano, T. Polymeric micelles a new drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 21, p. 107-116, 1996.
- Lai, C.T. & Yu, P.H. Dopamine and L- $\beta$ -3-4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-DOPA)- induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochemistry and Pharmacology*, v. 53, p. 317-328, 1997.
- Legrand, P.; Barrat, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P. Polymeric nanocapsules a drug delivery systems A review. *S.T.P. Pharma Sciences*, 9 (5) 411-418, 1999.
- Le Quellec, A.; Dupin, S.; Genissel, P.; Saivin, S.; Marchand, B.; Houin, J. P. M. Microdialysis probes calibration: gradient and tissue dependent changes in no net flux and reverse dialysis methods. *Journal Pharmacology and Toxicology Methods*, v. 33, p. 11-16, 1995.
- Leveque, N.; Makki, S.; Hadgraft, J.; Humbert, P. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 269, p. 323-328, 2004.
- Lippacher, A.; Muller, R.H.; Mader, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v.214, p. 9-12, 2001.
- Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*, v. 79, n. 4, p. 1431-1568, 1999.

Lopes, M.I.L. Avaliação da atividade antioxidante e mutagênica do látex de *Croton lechleri* em sistemas biológicos. Dissertação de mestrado. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil, 2000.

Lopes, R.; Collett, J. H.; Bentley, M. V. L. B. Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 2000(1), p. 127-132, 2000.

Lopez-Torres, M.; Thiele, J.J.; SINDO, Y.; *et al.* Topical application of alpha - tocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet-induced oxidative damage in murine skin. *British Journal Of Dermatology*, v. 138, n. 2, p. 207-215, FEB 1998.

Lowe, N.J; Meyers, D. P; Scott, I.R; Exposure to low levels of ultraviolet light B ou ultraviolet light A induces cutaneous photodamage in human skin. In: Lowe, N. J.; Shaat. N. A.; Pathak, M. A.; *Sunscreen: Development, Evaluation and Regulatory Aspects*. Marcel Dekker: New York, 1997.

Machlin, L.J. *Handbook of Vitamins*, 2 ed., Marcel Derek Inc., New York, 1990.

Magenheim, B.; Benita, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharma Sciences*, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.

Margail, I.; Plotkine, M.; Lerouet, D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 39, p. 429-443, 2005.

Maris, A.F. (Estratégias de proteção antioxidante da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Tese de doutorado*. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil, 1999.

Marrot, L.; Belaidi, J.P.; Chaubo, C.; Meunier, J.R.; Perez P.; Agapakis-Causse, C. Fluoroquinolones as chemical tools to define a strategy for photogenotoxicity in vitro assessment. *Toxicology in vitro*, v.15, n. 2, p. 131-142, 2001.

Martini, M.C. Introducción a la dermofarmacia y la cosmetología. Editorial Acribia: Zaragoza, 2005.

Mestres, G.M.; Fernandez, C.; Parsotam, N.; Nielloud, F.; Mestres, J.P.; Maillols, H. Stability of UV filters in different vehicles: solvents and emulsions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 23, n. 7, p. 647-655, 1997.

Michel, C.; Aprahamian, M.; Defontaine, L.; Couvreur, P.; Damgé, C. The effect of site of administration in the gastrointestinal tract on the absorption of insulin from nanocapsules in diabetic rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 43, p. 1-5, 1991.

Moore, K.P.; Darley-USmar, V.; Morrow, J.; Roberts, L. J. Formation of F-2 isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite. *Circulation Research*, v. 77, p. 335-341, 1995.

Moure, A.; Cruz, J.C.; Franco, D.; Domínguez, M.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; Núñez, M.J.; Parajó, J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, v.72, p. 145-171, 2001.

Morganti, P.; Ruocco, E.; Wolf, R.; Ruocco, V. Percutaneous absorption and delivery systems. *Clinics in Dermatology*, v.19, p. 489-501, 2001.

Moser, K.; Kriwet, K.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*, v. 52, p. 103-112, 2001.

Mosqueira, V, C, F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barrat, G. Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutical Science*. v. 89, n.5, 2000.

Müller, C. R. *Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo diclofenaco*. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1999. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

Muller, B.; Kreuter, J. Enhanced transport of nanoparticles associated drugs through natural and artificial membranes- a general phenomenon? *International Journal of Pharmaceutics*, v. 178, p. 23-32, 1999.

Okereke, C.O.; Abdel-Rhaman, M.S.; Friedman, M.A. Disposition of benzophenone-3 after dermal administration in male rats *Toxicology Letters*, v. 73, p. 113-122, 1994.

Olvera-Martinez, B.I.; Cazares-Delgadillo, J.; Calderilla-Faardo, SB.; Villalobos-Garcia, R.; Ganem-Quintanar, A.; Quintar-Guerrero, D. Preparation of nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: penetration across the stratum corneum. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 94 (7), 1552-1557, 2005.

Ohshima, H.; Yoshie, Y.; Auriol, S.; Gilibert, I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free radical Biology & Medicine*, v. 25, n.9, pp. 1057-1065, 1998.

Pandey, R.K.; Ganga, S.; Jayaswal, S. B.; Singh, J. Transdermal transport of piroxicam from ointment bases. *Pharmazie*, v. 47, p. 800-801, 1992.

Patanaargson, S.; Limphong, P.; Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product, *International Journal of Cosmetics Science*, v. 23, p. 153-160, 2001.

Pathak, M.A. Photoprotection against harmful effects of solar UVB and UVA radiation: an update. In: Lowe, N. J., Shaat, N. A., Pathak, M.A., *Sunscreen: Development, Evaluation and Regulatory Aspects*. Marcel Dekker: New York, 1997.

Patini, G. Perfluoropolyethers in sunscreen. *Drug Cosmetology and Industrial Pharmacy*, p. 143-142, 1988.

Pellet, M. A.; Roberts, M. S.; Hadgraft, J. Supersaturated solutions evaluated with an in vitro stratum corneum tape stripping technique. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 151, p. 91-98, 1997a.

Pellet, M. A.; Castellano, S. *et al.* The penetration of supersaturated solutions of piroxicam across silicone membranes and human skin in vitro. *Journal of Controlled Release*, v. 46, p. 205-214, 1997b.

Pinto-Alphandary, H.; Andremont, A.; Couvreur, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 13, p. 155-168, 2000.

Póvoa, H. *Radicais Livres em Patologia Humana*. Rio de Janeiro; Imago, 1995.

Pugh, W. J.; Roberts, M. S.; Hadgraft, J. Epidermal permeability – penetrant structure relationships: 3. The effect of hydrogen bonding interactions and molecular size on diffusion across the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 138, p. 149-165, 1996.

Puglia, C.; Bonina, F.; Trapani, G.; Franco, M.; Ricci, M. Evaluation of in vitro percutaneous absorption of lorazepam and clonazepam from hydro-alcoholic gel formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 228, p. 79-87, 2001.

Puglisi, G.; Fresta, M.; Giammona, G.; Ventura, C.A. Influence of the preparation conditions on poly(ethylcyanoacrylate) nanocapsules formation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 125, p. 283-287, 1995.

Puisieux, F.; Barrat, G.; Couarraze, G.; Couvreur, P.; Devissaguet, J. P.; Dubernet, C.; Fattal, E.; Fessi, H.; Vauthier, C.; Benita, S. Polymeric micro- and nanoparticles as drug carriers. In: *Polymeric Biomaterials*, Canadá: Marcel Dekker, 1994. Cap. 16.

Quintanar-Guerrero, D.; Allemán, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed

polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

Rabello-Gay, M.N.; Rodrigues, M.A.L.A.R.; Monteleone Neto, R. Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo, 1991.

Roblot, L. T.; Couvreur, P.; Puisieux, F. Some physicochemical properties of polyalkylcyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. *Chimicaoggi*, p. 37-39, [Sep.], 1988.

Rollot, J. M.; Couvreur, P.; Roblot, L. T.; Puisieux, F. Physicochemical and morphological characterization of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 75, n. 4, p. 361-364, 1986.

Rustin, P.; von Kleist Retzow, J.C.; Chautel Groussard, K.; Sidi, D.; Munnich, A.; Rötting, A. Effect of idebenone on cardio-myopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet*, v. 354, p. 477-479, 1999.

Saffi, J.; Sonogo, L.; Varela, Q.D.; Salvador, M. Antioxidant activity of L-ascorbic acid in wild-type and superoxide dismutase deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report*, v. 11, n.4, p.179-184, 2006.

Sahoo, S.K.; Labhasetwar, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*. v.8, p. 1112- 1120, 2004.

Saija, A.; Scales, M.; Lanza, M.; Marzullo, D.; Bonina, F.; Castelli. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 19, n. 4, p. 481-486, 1995.

Sandt, J.J.M.; Burgsteden, J.A.; Cage, S.; *et al.* *In vitro* predictions of skin absorption of caffeine, testosterone and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. v. 30, p. 271-181, 2004.

Santos, A.L.G. Ripoll, D.; Vardi,N.; Bassani,V,L. *Phitotherapy Research*, v. 13, p. 65-66, 1999.

Santoyo, S.; Arellano, A.; Ygartua, P.; Martín, C. Penetration enhancer effects on the in vitro percutaneous absorption of piroxicam through rat skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 117, p. 219-224, 1995.

Santoyo, S.; Ygartua, P. Effect of skin pretreatment with fatty acids on percutaneous absorption and skin retention of piroxicam after its topical application. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50 ( 2), p. 245-250, 2000.

Santos-Magalhães, N.S.; Pontes, A.; Pereira, V. M. Caetano, M. N. Coloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 208 (1-2), p. 71-80, 2000.

Sartorelli, P.; Andersan. H.R.; Angerer, J.; Corler, J.; Dresler, N.; Goen.; Griffin, P.; Hotckinss, S. A. M.; Larese, F.; Montomoli, L.; Perkins, J.; Schmetz, M.; Van de Sandt, J.; Willians, F. *Percutaneous penetration studies for risk assessment. Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 9, p. 133-152, 2000.

Schaefer, H.; Shalla, A.; Zesch, A.; Stüttgen, G. *Skin Permeability*. New York: Springer-Verlag, 1982.

Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A.R.; Freitas, L. L.; Guterres, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

Schauder, S.; Ippen, H. Contact and photocontact sensitivity to sunscreens. Review of a 15-year experience and of the literature. *Contact Dermatology*, v. 37, p. 221-232, 1997.

Schneider, I.; Dobner, B.; Neubert, R.; Wohlrab, W. Evaluation of drug penetration into human skin ex vivo using branched fatty acids and propylene glycol. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 145, p. 187-196, 1996.

Schulz, J.; Hohenberge, H.; Pflücker, F.; Gärter, E.; Will, T.; Pfeiffer, S.; Wepf, R.; Wendel, V.; Gers-Barlag, H.; Wittern, P. Distribution of sunscreens on skin. *Advanced Drug Delivery Reviews. Suppl. 1*, v. 54, p. S157-S163, 2002.

Shaat, N.A.; Fares, H.M.; Klein, K.K. *Cosmetics & Toiletries*, v. 105, p. 41-44, 1990.

Shaat, N.A. Evolution of Modern Sunscreen Chemicals. In: Lowe, N. J.; Shaat, N. A.; Pathak, M. A. *Sunscreen: Development, Evaluation and Regulatory Aspects. Marcel Dekker*. New York, 1997.

Shah, V.P. Skin penetration enhancers: scientific perspective. In: *Drug Permeation e Enhancement*. p. 19-23. New York: Marcel Dekker, 1994.

Shim, J.; Kang, H.S.; Park, W.S.; Han, S.H.; Kim, J.; Chang, I.S. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 97, p. 477-484, 2004.

Singh, P.; Roberts M. S. Skin permeability and local tissue concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 268, p. 144-151, 1994.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Langeloh, E. *Etnopharmacology*, v. 22, p. 281-293, 1988.

Simon, R.H.; Scoggin, C.H.; Patterson, D. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *Journal Biology and Chemistry*, v. 256(14), p. 7181-7186, 1981.

Slater, T.F. Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochemistry Journal*, v. 222, p.1-15, 1984.

Suhonen, M. T.; Bouwstra, J. A.; Urtti, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *Journal of Controlled Release*, v. 59, p. 149-161, 1999.

Takabe, W.; Nick, E.; Uchida, K.; Yamada, S.; Satoh, K.; Noguchi, N. Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein. *Carcinogenesis*, v.22, p. 935-941, 2001.

Tapiero, H.; Tew, K.D.; Nguyen, B.A.; Mathé, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedical Pharmacotherapy*, v. 56, p. 200-207, 2002.

Tarras-Wahlberg, N.; Stenhagen, G.; Larko, O.; Rosen, A.; Wennberg, A. M.; Wennerstrom, O. Changes in ultraviolet absorption of sunscreen after ultraviolet irradiation. *Journal Investigation Dermatology*, v. 113, p. 548-553, 1999.

Tauber, U. Drug metabolism in the skin: advantages and disadvantages, in: Hadgraft, J.R.H. Guy (Eds.), *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Marcel Dekker, NewYork, p. 99–112, 1989.

Ting, W.W.; Vest, C. D.; Sontheimer, R.D. Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. *International Journal of Dermatology*, v. 43, p. 538-547, 2004.

Touitou, E.; Meidan, V. M. *et al.* Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *Journal of Controlled Release*, v. 56, p. 7-21, 1998.

Torel, J.; Cillard, J.; Collard, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxi radical, *Phytochemistry*, v. 25, n. 2, p. 383-385, 1986.

Trueba, G.P.; Sánchez, G.M. Los flavonoides como antioxidantes naturales, *Acta Farmaceutica. Bonaerense*, v. 20, n. 4, p. 297-306, 2001.

Turunen, T. M & Urtii, A. Penetration enhances in transdermal drug delivery. *Acta Pharmaceutica. Fennica*, v. 101, p. 3-10, 1992.

- Van Lente, F. Free radicals. *A. Clinical Chemistry*, v. 65(12), p. 374-377, 1993.
- Venter, J. P.; Müller, D. G. *et al.* A comparative study of in situ adapted diffusion cell and in vitro Franz diffusion cell method for transdermal absorption of doxylamine. *European Journal of Pharmaceutics Sciences*, v.13, p.169-177, 2001.
- Verma, D.D.; Verma, S.; Blume, G.; Fahr, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 258, (1-2), p. 141-151, 2003.
- Umbach, V. Kosmetik: Entwicklung, Herstellung u. Anwendung Kosmetischer Mittel. Stuttgart: Thieme Verlag, 1995.
- Wagner, H.; Kostka K. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *Journal of Controlled Release*, v.75, p. 283-295, 2001.
- Wartha Wright, M.; Wright, S. T.; Wagner, R. F. Mechanism of sunscreen failure. *Journal American Academy Dermatology*. V. 44, p. 781-784, 2001.
- Williams, A. C; Barry, B. W. Skin Absorption Enhancers. *Critical Reviews in therapeutic drug carriers systems*, v.9, n. (3-4), p. 305-353, 1992.
- Wissing, S.A.; Muller, H. Solid lipid nanoparticles (SLN)- a novel carrier for UV blockers. *Pharmazie*, v. 56, p. 783-786, 2001.
- Wohlgemuth, M.; Mächtle, W.; Mayer, C. Improved preparation and physical studies of polybutylcyanoacrylate nanocapsules. *Journal Microencapsulation*, v. 17, n. 4, p. 437-448, 2000.
- Wolf, R., Wilf, D., Morganti.; Ruocco,V. Sunscreens. *Clinics in Dermatology*, v. 19, p. 452-459, 2001.
- Yokomizo, Y.; Sagitani, H. Effects of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of guinea pigs in vitro. *Journal of Controlled Release*, v. 38, p. 267-274, 1996.
- Yener, G.; Gonullu, U.; Uner, M.; Degim, T.; Araman, A. Effect of vehicles and penetration enhancers on the in vitro percutaneous absorption of celecoxib through human skin. *Pharmazie*, v. 58, p. 330-333, 2003.
- Yokoyama, M.; Okano, T. Targetable drug carriers: present status and a future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 21, p. 77-80, 1996.
- Zeitlinger, M.; Müller, M.; Joukhadar. C. Lung Microdialysis – A Powerful Tool for the Determination of Exogenous and Endogenous Compounds in the Lower Respiratory Tract. *AAPS Journal*, v. 3, n. 33, 2005.



## *BIOGRAFIA*



## BIOGRAFIA

- **Graduação:**

Farmácia (1993-1997): UFRGS.

- **Especialização**

Indústria de Medicamentos: UFRGS.

- **Pós- Graduação**

- Mestrado (1999-2001): Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas- UFRGS, Porto Alegre, R.S. Dissertação: Avaliação tecnológica de suspensões e nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo indometacina.
- Doutorado (2003-atual): Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas- UFRGS, Porto Alegre, R.S. Tese: Desenvolvimento e caracterização de Formulações Fotoprotetoras Contendo Nanocápsulas.

- **Artigos completos publicados em periódico**

Pohlmann, A.R.; Weiss,V.; Mertins, O.; Silveira, N. P.; Guterres, S. S.

Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres- development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.1, p. 305-312, 2002.

Guterres, S. S., Weiss-Angeli.V., Lucca Freitas, L, Pohlmann, A. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried

powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. Drug Delivery, v.7, p.195 - 199, 2000.

- **Capítulo de Livro**

WEISS-ANGELI,V.;GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A.R. Indomethacin -loaded polyester nanocapsules and nanospheres, development and stability evaluation. In: Symposium on new trends in polymers for oral and parenteral administration, 2001, Paris. Symposium on new trends in polymers for oral and parenteral administration, 2001.

- **Trabalhos resumidos publicados em anais de evento**

WEISS-ANGELI,V.; BONESI,C.; COLOMBO, M.; SALVADOR, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Preparation and evaluation of antioxidant effect of nanocapsules containing quercetin and Octylmethoxycinnamate. In: ISNAPOL, VI International Symposium on natural Polymers and Composites, 2007, Gramado, R.S, Brasil, Resumos, 2007.

WEISS-ANGELI,V.; POLETTTO, F.S.; ZANCAN, L.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Stability under UVradiation of nanocapsules containing quercetin and octylmethoxycinnamate. In: ISNAPOL, VI International Symposium on natural Polymers and Composites, 2007, Gramado, R.S, Brasil, Resumos, 2007.

WEISS-ANGELI.V.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S.; BALDASSO, F. Quercetin and octylmethoxycinnamate loaded nanocapsules: stability under UV radiation. In: Skin And Formulation 2<sup>nd</sup> Symposium". October 9-10, 2006. Versailles,France. Programme and Abstracts, Versailles, 2006. p.97.

WEISS-ANGELI, V.; BOURGEOIS, S.; KHENNICHE, S.; PELLETIER, J.;GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BOLZINGER, M.A. Original study of OMC release

profile from NC in the skin: comparison with topical formulations containing free OMC. In: Skin And Formulation 2<sup>nd</sup> Symposium". October 9-10, 2006. Versailles – France. Programme and Abstracts, Versailles, 2006. p.147.

WEISS-ANGELI,V.; ZANCAN, L.R.; GUTERRES, S. S. Avaliação da Aplicabilidade de Filtros Solares Físicos como suporte para nebulização de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo quercetina In: XVI Salão de Iniciação Científica- UFRGS, 2004, Porto Alegre. XVI Salão de Iniciação Científica. Porto Alegre: Editora da Universidade, 2004.

WEISS-ANGELI,V.; GUTERRES, S. S.; ZANCAN, L.R. Avaliação da estabilidade de suspensões de nanocápsulas contendo quercetina In: XV Salão de Iniciação Científica- UFRGS, 2003, Porto Alegre. XV Salão de Iniciação Científica. Porto Alegre: Editora da Universidade, 2003.

WEISS-ANGELI.V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A.R.; MERTINS, O, SILVEIRA, N.P. Spray-dried indomethacin-loaded poly(epsilo-caprolactone) nanocapsules and nanospheres, development and nanostructure models In: Particles, 2002, Orlando, 2002. p.145 - 146

WEISS-ANGELI,V.;GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A.R. Indomethacin -loaded polyester nanocapsules and nanospheres, development and stability evaluation. In: Symposium on new trends in polymers for oral and parenteral administration, 2001, Paris. Symposium on new trends in polymers for oral and parenteral administration, 2001.

WEISS-ANGELI,V.; POHLMANN, A.R.; LUCCA FREITAS, L.; GUTERRES, S. S. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin In: Congresso de Ciências Farmacêuticas de Las Americas, 2001, Orlando. Congresso de Ciências farmacêuticas de Las Américas, 2001. p.130 - 130

WEISS-ANGELI,V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A.R. Oral spray-dried indomethacin loaded polyester nanocapsules and nanospheres, development and stability evaluation In: Symposium on new trends in polymers for oral and parenteral administration, 2001, Paris. Symposium on new trends in polymers for oral and parenteral administration, 2001.

WEISS-ANGELI,V.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S.  
Suspensions spray-dried nanocapsules containing indomethacin stability study In: Congresso de ciências farmacêuticas de las americas, 2001, Orlando.  
Congresso de ciências Farmacêuticas de las Americas, 2001. p.130 – 130.

WEISS-ANGELI,V.; LUCCA FREITAS, L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S.  
Estudo da estabilidade de suspensões coloidais poliméricas contendo indometacina In: 23 Reunião Anual - Sociedade Brasileira de Química, 2000, Poços de Caldas.Livro de Resumos, 2000. v.3.

WEISS-ANGELI.V.; MERTINS, O.; POHLMANN, A.R.;GUTERRES, S. S.;  
SILVEIRA, N.P. Particle size of nanocapsules and nanospheres suspensions by photon correlation spectroscopy In: V Pharmatech- New Perspectives in Drug delivery Systems, 2000, Porto Alegre. V Pharmatech- New Perspectives in Drug Delivery Systems, 2000.

WEISS-ANGELI.V.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S. Physico-chemical characterization of spray-dried powders from polymeric nanospheres containing indomethacin In: V- Pharmatech- New perspectives in drug delivery systems, 2000, Porto Alegre. V- Pharmatech - New perspectives in drug delivery systems, 2000.

WEISS-ANGELI,V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A.R.; LUCCA FREITAS, L

Preparação e caracterização morfológica de nebulizados de nanopartículas poliméricas contendo indometacina In: 23 Reunião Anual- Sociedade Brasileira de Química, 2000, Poços de Caldas. Livro de Resumos, 2000. v.3.

WEISS-ANGELI,V.; BECKER, C. R.; MICHALOWSKI, C.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S., BASSANI, V. L. Preparation and Characterization of Spray-dried Polymeric Nanocapsules. In: XIII Journees Scientifiques., 1998, Paris. XIII Journees Scientifiques, 1998.

WEISS-ANGELI,V.; LOPES, E.; BECKER, C. R.; GUTERRES, S. S. Otimização de Formulações de Suspensões de Nanocápsulas Poliméricas Contendo Etionamida. In: Congresso Paulista de Farmacêuticos, II Seminário Internacional dos Farmacêuticos, 1997, São Paulo.Congresso Paulista de Farmacêuticos, II Seminário Internacional dos Farmacêuticos, 1997.

WEISS-ANGELI,V.; GUTERRES, S. S.; LOPES, E.; BECKER, C. R. Otimização de Formulações de Suspensões de Nanocápsulas Poliméricas contendo Etionamida In: IX Salão de Iniciação Científica, 1997, Porto Alegre. IX Salão de Iniciação Científica, 1997.

WEISS-ANGELI.V.; GUTERRES, S. S.; BECKER, C. R. Desenvolvimento de Nebulizados de Nanocápsulas Poliméricas Contendo Diclofenaco. In: VIII Salão de Iniciação Científica-UFRGS, 1996, Porto Alegre. VIII Salão de Iniciação Científica-UFRGS,1996.