

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES CONTENDO NANOCÁPSULAS DE ÁCIDO  
RETINÓICO E TETRAISOPALMITATO DE ASCORBILA PARA USO CUTÂNEO**

**Flávia Pires Peña**

**Porto Alegre, junho de 2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES CONTENDO NANOCÁPSULAS DE ÁCIDO  
RETINÓICO E TETRAISOPALMITATO DE ASCORBILA PARA USO CUTÂNEO**

**Flávia Pires Peña**

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

**Co-orientadora: MSc. Leidyana Moraes da Costa**

**Porto Alegre, junho de 2019**

## **Agradecimentos**

Aos meus pais e minha irmã, Valéria, Marcelo e Fernanda, por toda educação, amor, apoio e carinho durante a minha vida, que fizeram eu me tornar uma pessoa melhor;

Aos meus amigos, da infância, da fase escolar e em especial, da fase universitária, que estiveram comigo e me ajudaram a vencer os desafios que a faculdade nos proporciona;

Ao meu namorado Henrique, que me acompanha desde o início da faculdade, por todo amor, apoio e incentivo a sempre continuar, respeitando os momentos em que precisei estudar;

Aos colegas do Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia, que com muito carinho me acolheram em 2015 no início da minha iniciação científica, por todos os ensinamentos, momentos de alegria e superação, além das amizades que foram construídas ao longo desses anos de vivência;

À minha Professora Orientadora Sílvia Stanisçuaski Guterres, que me permitiu realizar a iniciação científica e descobrir o maravilhoso mundo da nanotecnologia, me proporcionando também o desenvolvimento deste Trabalho de Conclusão de Curso;

À minha Co-orientadora Leidyana da Costa e à Professora Karina Paese, amigas que acreditaram em mim e me ajudaram incansavelmente a tornar este trabalho uma realidade, me apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis;

À Denise Jornada, Franciele Bruinsmann, Aline Cardoso e Ricardo Lorenzoni, amigos que o Lab 405 me proporcionou, que tiveram um papel muito importante na minha vida e me incentivaram a continuar;

A todos os professores da Faculdade de Farmácia da UFRGS, que com muito amor e dedicação, transmitiram seus conhecimentos para que eu pudesse me tornar uma profissional farmacêutica;

À UFRGS, que em 2014/1 virou a minha segunda casa, me proporcionando viver novas experiências, fazer novas amizades, adquirir conhecimentos, amadurecer e virar uma profissional.

*“O sucesso nada mais é que ir de fracasso em fracasso sem que se perca o entusiasmo”.*  
*(Winston Churchill).*

## RESUMO

O envelhecimento cutâneo é um processo fisiológico que sofre influência de fatores externos como poluição ambiental, condições climáticas, e principalmente, exposição excessiva à radiação ultravioleta. Nessa perspectiva, a utilização de produtos cosméticos contendo agentes antioxidantes como as vitaminas A e C e seus derivados é promissora. O ácido retinóico tem a capacidade de promover a renovação celular e reduzir hiperpigmentação e enrugamento, e o tetraisopalmitato de ascorbila atua como hidratante cutâneo, além de reduzir a hiperpigmentação causada pela radiação ultravioleta B. Os cosméticos em filmes caracterizam-se como uma inovação na tecnologia de cosméticos tendo em vista sua facilidade de utilização, praticidade e comodidade. As nanocápsulas poliméricas atuam como carreadores de substâncias ativas e apresentam as vantagens de proteção, liberação controlada e redução de irritação local. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo desenvolver filmes poliméricos contendo nanocápsulas poliméricas de ácido retinóico e tetraisopalmitato de ascorbila para aplicação como máscaras faciais. Primeiramente, foram desenvolvidas duas metodologias analíticas em cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar as substâncias ativas, após as nanocápsulas obtidas foram desenvolvidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e os filmes poliméricos foram obtidos após o processo de secagem em estufa à vácuo a 40 °C por 24 horas. Além disso, o potencial irritativo das suspensões e dos filmes foram avaliados em membrana cório-alantóide de ovo embrionado (HET-CAM). As suspensões de nanocápsulas continham 0,5 mg/mL de tetraisopalmitato de ascorbila e ácido retinóico e apresentaram diâmetro médio de  $148 \pm 2,08$  nm e baixo índice de polidispersão e potencial zeta de  $-7,4 \pm 0,62$  mV. Os teores obtidos foram de  $98,8 \pm 4,59\%$  para o tetraisopalmitato de ascorbila e  $102,02 \pm 0,02\%$  para o ácido retinóico. A eficiência de encapsulação para ambas as substâncias foi de 100%. Os filmes inovadores desenvolvidos apresentaram características satisfatórias quanto aos parâmetros relacionados à textura, flexibilidade e homogeneidade visual, além de proporcionarem uma recuperação do perfil de distribuição nanométrico nas avaliações por diversas técnicas analíticas. As formulações contendo as substâncias ativas nanoencapsuladas foram classificadas como “não irritantes”, já as formulações contendo as substâncias ativas na forma de nanoemulsões foram classificadas como “irritação fraca” e os filmes como “irritação moderada”. Sendo assim, os filmes poliméricos contendo as suspensões de nanocápsulas desenvolvidos apresentaram resultados promissores para a utilização como máscaras faciais.

**Palavras-chave:** ácido retinóico, envelhecimento cutâneo, filmes poliméricos, nanocápsulas e tetraisopalmitato de ascorbila.

## ABSTRACT

Skin aging is a physiological process controlled by natural factors, such as environmental, climatic conditions, and specially, excessive exposure to ultraviolet radiation. In this perspective, the use of products such as antioxidants like vitamins A and C and their derivatives is promising. Retinoic acid has the ability to promote cell renewal and reduce hyperpigmentation and wrinkling, and ascorbyl tetraisopalmitate acts as a cutaneous moisturizer, besides reducing skin hyperpigmentation by ultraviolet B radiation. Film cosmetics are characterized as an innovation in cosmetic technology due to its ease of use, practicality and convenience. Polymeric nanocapsules act as carriers of active substances and exhibit the advantages of protection, controlled release and reduction of local irritation. Thus, this work aims to develop polymeric films containing retinoic acid and ascorbyl tetraisopalmitate loaded polymeric nanocapsules for application as facial masks. Firstly, two analytical methodologies were developed in high performance liquid chromatography to quantify the active substances, after the nanocapsules obtained were developed by interfacial deposition of preformed polymer and the polymeric films were obtained after the drying process in a vacuum oven at 40 ° C for 24 hours. In addition, the irritative potential of suspensions and films was evaluated on Hen's Egg Chorionallantoic Membrane (HET-CAM). Nanocapsule suspensions contained 0.5 mg/mL ascorbyl tetraisopalmitate and retinoic acid and displayed a mean diameter of  $148 \pm 2.08$  nm, low PDI and zeta potential of  $-7.4 \pm 0.62$  mV. The contents were  $98.8 \pm 4.59\%$  for ascorbyl tetraisopalmitate and  $102.02 \pm 0.02\%$  for retinoic acid. Encapsulation efficiency was close to 100% for both substances. The innovative films developed presented satisfactory characteristics regarding the parameters related to texture, flexibility and visual homogeneity, besides providing a recovery of the nanometric distribution profile in the evaluations by various analytical techniques. Formulations containing nanoencapsulated active substances were classified as "non-irritating", and formulations containing active substances in the form of nanoemulsions were classified as "mild irritation" and films as "moderate irritation". Thus, the polymeric film containing the polymeric nanocapsules developed showed promising results for use as facial masks.

**Keywords:** ascorbyl tetraisopalmitate, nanocapsules, polymeric films, retinoic acid and skin aging.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fórmula estrutural do tetraisopalmitato de ascorbila. ....	18
<b>Figura 2.</b> Fórmula estrutural do ácido retinóico. ....	20
<b>Figura 3.</b> Curva de calibração para o tetraisopalmitato de ascorbila nas concentrações de 7,5 a 37,5 µg/mL. ....	38
<b>Figura 4.</b> Curva de calibração para o ácido retinóico nas concentrações de 2,5 a 12,5 µg/mL. ....	40
<b>Figura 5.</b> Sobreposição dos perfis de distribuição de diâmetro das 3 formulações por difração de laser, sendo (—) o gráfico representando a formulação a 0,5 mg/mL, (—) o gráfico representando a formulação a 1,0 mg/mL e (—) o gráfico representando a formulação. ....	43
<b>Figura 6.</b> Filme F1 obtido após o processo de secagem, com presença de agregados no centro da placa. ....	44
<b>Figura 7.</b> Filmes obtidos após processo de secagem a estufa a 40 °C (A) e 25 °C (B). ....	444
<b>Figura 8.</b> Filme obtido após a adição de 5% de álcool polivinílico na formulação. ....	455
<b>Figura 9.</b> Filme F6 NC Vit obtido após processo de secagem em estufa a vácuo à 40 °C após 24 horas. ....	466
<b>Figura 10.</b> Filmes F6 NE Vit obtidos após processo de secagem em estufa a vácuo à 40 °C após 24 horas. ....	46
<b>Figura 11.</b> Distribuição de diâmetro das formulações NC BR obtida pela técnica de difração de laser. ....	477
<b>Figura 12.</b> Distribuição de diâmetro das formulações NC Vit obtida pela técnica de difração de laser. ....	477
<b>Figura 13.</b> Perfil de distribuição do tamanho de partículas por difração de laser, sendo (—) H <sub>2</sub> O UP, (—) MetOH:Isop (25:75), (—) H <sub>2</sub> O UP: (MetOH:Isop (25:75)) (1:1), (—) H <sub>2</sub> O UP:(MetOH:Isop (25:75)) (10:90), (—) H <sub>2</sub> O UP:(MetOH:Isop (25:75)) (20:80), (—) H <sub>2</sub> O UP:(MetOH:Isop (25:75)) (30:70), (—) H <sub>2</sub> O UP:ACN (1:1), (—) H <sub>2</sub> O UP:Isop (1:1), (—) H <sub>2</sub> O UP:MetOH (1:1). ....	488
<b>Figura 14.</b> Perfil de distribuição do tamanho de partículas por difração de laser, sendo (—) H <sub>2</sub> O UP, (—) MetOH:Isop (25:75), (—) H <sub>2</sub> O UP:ACN (1:1), (—) H <sub>2</sub> O UP:MetOH (1:1). ....	488
<b>Figura 15.</b> Perfil de distribuição de diâmetro de partículas obtido por difração de laser do filme F6 NC Vit. ....	49
<b>Figura 16.</b> Perfil de distribuição de diâmetro das formulações NC BR obtido pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons. ....	500

<b>Figura 17.</b> Perfil de distribuição de diâmetro das formulações NC Vit pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons. ....	500
<b>Figura 18.</b> Perfil de distribuição de diâmetro dos filmes F6 NC Vit pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons. ....	511
<b>Figura 19.</b> Potencial zeta das formulações NC BR pela técnica de mobilidade eletroforética. ....	522
<b>Figura 20.</b> Potencial zeta das formulações NC Vit pela técnica de mobilidade eletroforética. ....	522
<b>Figura 21.</b> Potencial zeta dos filmes F6 NC Vit pela técnica de mobilidade eletroforética....	53
<b>Figura 22.</b> Superfície dos filmes, visualizada por microscopia eletrônica de varredura, em aumento de 30 vezes. Em A está demonstrado a superfície do filme F6 NC Vit e em B está demonstrado a superfície do filme F6 NE Vit. ....	54
<b>Figura 23.</b> Superfície dos filmes, visualizada por microscopia eletrônica de varredura, em aumento de 500 vezes. Em A está demonstrado a superfície do filme F6 NC Vit e em B está demonstrado a superfície do filme F6 NE Vit. ....	544
<b>Figura 24.</b> Representação dos poros dos filmes em aumento de 3000 vezes, visualizados por microscopia eletrônica de varredura. Em A está demonstrado o poro formado no o filme F6 NC Vit e em B está demonstrado o poro formado no filme F6 NE Vit. ....	55
<b>Figura 25.</b> Demonstração das nanocápsulas aderidas à matriz polimérica do filme F6 NC Vit em aumento de 5000 vezes em A e aumento de 7000 vezes em B, visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. ....	555
<b>Figura 26.</b> Imagens demonstrando os controles utilizados para a realização do HET-CAM. Em A está representado o controle negativo (soro fisiológico); em B e C, os controles positivos solução de lauril sulfato de sódio a 1% (m/v) e solução de hidróxido de sódio 0,1.....	56
<b>Figura 27.</b> Imagens demonstrando a membrana cório-alantóide dos ovos após a aplicação das formulações NC Vit em A e F6 NC Vit em B. ....	57
<b>Figura 28.</b> Imagens demonstrando a membrana cório-alantóide dos ovos após a aplicação das formulações NE Vit em A e F6 NE Vit em B. ....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros avaliados para otimização de metodologia de quantificação do tetraisopalmitato de ascorbila. ....	23
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros utilizados para validação de metodologia do tetraisopalmitato de ascorbila. ....	24
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros avaliados para otimização de metodologia de quantificação do ácido retinóico. ....	27
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros utilizados para validação de metodologia do ácido retinóico. ....	28
<b>Tabela 5.</b> Composição quali-quantitativa das três formulações de nanocápsulas desenvolvidas, para volume final de 10 mL de formulação. ....	30
<b>Tabela 6.</b> Composição quali-quantitativa das soluções utilizadas para produzir os seis filmes desenvolvidos. ....	31
<b>Tabela 7.</b> Soluções utilizadas para solubilização dos filmes. ....	34
<b>Tabela 8.</b> Classificação do grau de irritação para as formulações analisadas. ....	36
<b>Tabela 9.</b> Resultados obtidos de limite de detecção e limite de quantificação para o tetraisopalmitato de ascorbila. ....	38
<b>Tabela 10.</b> Resultados obtidos na determinação do teor do tetraisopalmitato de ascorbila na amostra pela metodologia cromatográfica. ....	39
<b>Tabela 11.</b> Resultados obtidos no teste de recuperação realizado na amostra contendo tetraisopalmitato de ascorbila. ....	39
<b>Tabela 12.</b> Resultados obtidos de limite de detecção e limite de quantificação para o ácido retinóico. ....	41
<b>Tabela 13.</b> Resultados obtidos na determinação do teor do ácido retinóico na amostra pela metodologia cromatográfica. ....	41
<b>Tabela 14.</b> Resultados obtidos no teste de recuperação realizado na amostra contendo ácido retinóico. ....	42
<b>Tabela 15.</b> Diâmetro e valores de span das formulações NC Vit e NC BR pela técnica de difração de laser. ....	477
<b>Tabela 16.</b> Diâmetro médio e índice de polidispersão das formulações pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons. ....	4949
<b>Tabela 17.</b> Potencial zeta das formulações pela técnica de mobilidade eletroforética. ....	511
<b>Tabela 18.</b> Escores de irritação obtidos por HET-CAM para cada formulação proposta testada. ....	577

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Geral .....	15
2.2. Específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1. Pele .....	16
3.2. Envelhecimento cutâneo.....	17
3.3. Vitaminas.....	18
3.3.1. Tetraisopalmitato de ascorbila .....	18
3.3.2. Ácido retinóico .....	19
3.4. Nanotecnologia .....	20
3.5. Filme.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
4.1. Materiais .....	22
4.1.1. Solventes e outros .....	22
4.1.2. Equipamentos e Acessórios .....	22
4.1.3. Matérias-Primas .....	22
4.2. Métodos Analíticos.....	23
4.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	23
4.2.1.1. Tetraisopalmitato de ascorbila .....	23
4.2.1.1.1. Validação da metodologia .....	25
4.2.1.2. Ácido retinóico .....	27
4.2.1.2.1. Validação da metodologia .....	28
4.3. Formulações .....	30
4.3.1. Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas .....	30
4.3.1.1. Preparação da formulação .....	30
4.3.2. Desenvolvimento dos filmes.....	31
4.3.2.1. Preparação dos filmes.....	32
4.3.2.2. Concentração teórica dos ativos nos filmes .....	33
4.4. Caracterização das suspensões de nanocápsulas e dos filmes desenvolvidos.....	33
4.4.1. Difração de laser .....	33
4.4.2. Espectroscopia de correlação de fótons .....	34
4.4.3. Mobilidade eletroforética.....	35
4.4.4. Potenciometria .....	35

4.5.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
4.6.	Avaliação do potencial de irritação cutânea – HET-CAM.....	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	38
5.1.	Métodos Analíticos.....	38
5.1.1.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	38
5.1.1.1.	Tetraisopalmitato de ascorbila .....	38
5.1.1.1.1.	Validação da metodologia .....	38
5.1.1.2.	Ácido retinóico.....	40
5.1.1.2.1.	Validação da metodologia .....	40
5.2.	Formulações .....	42
5.2.1.	Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas .....	42
5.2.2.	Desenvolvimento dos filmes.....	43
5.3.	Caracterização das suspensões de nanocápsulas e dos filmes desenvolvidos.....	46
5.3.1.	Difração de laser .....	47
5.3.2.	Espectroscopia de correlação de fótons .....	49
5.3.3.	Mobilidade eletroforética.....	51
5.3.4.	Potenciometria .....	53
5.4.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
5.5.	Avaliação do potencial de irritação cutânea – HET-CAM.....	55
6.	CONCLUSÕES.....	59
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior e mais externo órgão do corpo e devido a sua composição química e organização estrutural, atua como uma barreira protetora entre o meio interno e externo, protegendo contra choques mecânicos, agentes químicos, perda de fluidos por desidratação, penetração de microrganismos, radiações, além de regular a temperatura e transmitir estímulos nervosos. A pele é organizacionalmente estruturada em epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é uma camada com constante estratificação e renovação celular, responsável pela proteção adaptativa, imunológica, química, física e bioquímica da pele. Subdivide-se em diferentes camadas, começando pela camada basal e passando pelas camadas espinhosa, granulosa e lúcida (presente apenas nas palmas das mãos e solas dos pés) até chegar na camada córnea (Bolzinger et al., 2012).

A derme é uma matriz de tecido conjuntivo altamente vascularizada, com nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, composta por proteínas fibrosas como colágeno, elastina e reticulina. Ainda, possui uma alta quantidade de folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas, além de conter células como fibroblastos e macrófagos. Subdivide-se em derme superficial e derme profunda e tem função de transporte de nutrientes à epiderme, sustentação e eliminação de produtos de degradação ou tecido lesado. A hipoderme é a camada mais profunda da pele e é constituída por tecido adiposo, oferecendo proteção térmica e contra choques mecânicos, além de servir como estoque de energia (Baroni et al., 2012; Bolzinger et al., 2012).

A pele é uma via de administração de fármacos devido as suas características gerais e inúmeras vantagens como possibilidade de redução dos efeitos sistêmicos, ação local específica, redução dos efeitos adversos, modulação dos intervalos de administração devido à grande superfície disponível e distribuição transdérmica. No entanto, a função de barreira das camadas da pele acaba interferindo na permeabilidade dessa via. Além disso, deve-se considerar ainda as diferentes formas de absorção dérmica que são divididas em penetração, permeação e absorção (Guterres et al., 2007; Bolzinger et al., 2012; Jepps et al., 2013).

O envelhecimento cutâneo é um processo fisiológico que acomete a todos os seres vivos naturalmente caracterizado por alterações bioquímicas, morfológicas e funcionais da pele. Devido ao acúmulo de alterações sofridas ao longo dos anos, ocorre o aparecimento de marcas características do envelhecimento cutâneo, sendo essas permanentes. Esse processo pode ainda ser intensificado pela exposição excessiva à radiação ultravioleta ou a agentes irritantes

cutâneos, o que leva a um aumento da produção de radicais livres, de modo que o corpo não consegue neutralizar naturalmente essas espécies. Dessa forma, surgem os sinais clínicos na pele, como afinamento da espessura, ressecamento, palidez, enrugamento e eritema. Ocorre também uma redução de queratinócitos presentes na pele, conseqüentemente levando a um afinamento na epiderme que prejudica suas funções (Varani et al., 2000; Wagemaker et al., 2017).

Existem diversas substâncias ativas utilizadas nos cuidados da pele. Tendo em vista as características cutâneas e os fatores envolvidos no envelhecimento cutâneo, a pesquisa por formulações de uso cosmético envolvendo a utilização de vitaminas como antioxidantes está em crescente aumento, pois essas atuam diminuindo os danos causados pela radiação UV, restaurando uma camada de pele saudável (Gaspar e Maia Campos, 2007) e ajudariam a neutralização de radicais livres, aumentando a resistência ao estresse oxidativo e atenuando os sinais de envelhecimento da pele (Wagemaker et al., 2017). Nas formulações de uso tópico anti-envelhecimento, os antioxidantes mais utilizados são as vitaminas A, C, E e seus derivados esterificados, por possuírem um grande potencial de proteção contra radiação ultravioleta (Gaspar e Maia Campos, 2007). Além disso, sabe-se que a associação das vitaminas A e C em formulações para aplicação dérmica pode reverter algumas alterações cutâneas como espessamento, alterações histológicas, enrugamento e desidratação cutânea que foram causadas pelo envelhecimento intrínseco da pele ou pela exposição aos raios ultravioletas (Seité et al., 2005).

O ácido ascórbico possui ação antioxidante, regula a produção de colágeno e atua na proteção frente às modificações induzidas por UV, no entanto é muito instável na sua forma pura sendo susceptível à degradação em altas temperaturas, umidade e luz (Nováková et al., 2008). Em contrapartida, os seus derivados esterificados quimicamente contornam esse problema, como é o caso do tetraisopalmitato de ascorbilo (Gaspar e Maia Campos, 2007). Esse derivado é uma forma hidrofóbica e não oxidável da vitamina C que tem a capacidade de reduzir danos celulares causados pelas radiações UVB, reduzindo também a pigmentação causada por essas radiações (Gianeti et al., 2012).

O ácido retinóico ou tretinoína é um metabólito ativo da vitamina A e é utilizado topicamente na pele para tratamento de acne vulgar, ictiose (conjunto de doenças de pele seca, escamosa ou espessa), psoríase (escamas ou manchas que causam coceira) e neoplasias. No entanto, algumas desvantagens já foram vistas em formulações que contêm ácido retinóico,

como por exemplo, baixa solubilidade e fotoinstabilidade, levando a casos de irritação da área tratada (Rigopoulos et al., 2004; Ourique et al., 2008).

A evolução da tecnologia tem permitido a produção de formulações cosméticas mais eficazes e estáveis, visando diminuir os efeitos adversos e promover uma melhor performance dos produtos cosméticos. Nesse sentido, a nanotecnologia é uma área promissora tendo em vista suas vantagens, como direcionamento e controle da liberação de fármacos e substâncias ativas, contribuindo para uma melhor biodisponibilidade, eficácia, redução da dose terapêutica e toxicidade, além de proteger o fármaco de possíveis degradações (Contri et al., 2014; Frank et al., 2014).

O mercado cosmético é um ramo que segue em constante crescimento, buscando sempre a renovação dos produtos de beleza para atender às exigências dos consumidores. Tendo em vista os padrões de vida estabelecidos quanto a questões de aparência pessoal, aumento da expectativa de vida, rotinas de trabalho e busca por praticidade, a pesquisa por formulações cosméticas que sejam de fácil utilização e que atendam às expectativas dos consumidores quanto aos cuidados com a pele ganhou grande espaço. Um exemplo dessas formulações inovadoras são os cosméticos na forma de filme. Por serem formulações de dose única, fáceis de usar e leves de transportar, os filmes poliméricos estão sendo intensamente pesquisados para utilização como máscaras faciais (Sanfelice & Truiti, 2010).

Sabendo que as nanocápsulas poliméricas atuam como carreadores de substâncias ativas, em especial substâncias lipofílicas, e são capazes de controlar a permeação do ativo na pele (Guterres et al., 2007), a nanoencapsulação do tetraisopalmitato de ascorbila e ácido retinóico, assim como sua posterior incorporação em produtos cosméticos no formato de filme para utilização como máscara facial, visando a prevenção do envelhecimento cutâneo, poderá levar à formação de um sistema reservatório na superfície da pele com controle da liberação das substâncias ativas e modulação da penetração/permeação cutânea dos mesmos, assim como diminuição dos efeitos adversos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

- Desenvolver filmes poliméricos contendo nanocápsulas poliméricas de ácido retinóico e tetraisopalmitato de ascorbila para uso cutâneo.

### **2.2. Específicos**

- Desenvolver e caracterizar suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo ácido retinóico e tetraisopalmitato de ascorbila;
- Desenvolver filmes poliméricos contendo as nanocápsulas obtidas;
- Desenvolver e validar metodologia analítica utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar as substâncias ativas cosméticas;
- Avaliar a segurança das formulações desenvolvidas em teste de HET-CAM.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Pele

A pele é um órgão complexo do corpo humano devido a sua organização anatômica e composição química, que desempenha diversas funções. Sua estrutura fornece cobertura externa para toda a superfície do corpo, sendo que nela estão presentes as glândulas sudoríparas e sebáceas, além dos pelos. Sua principal atividade é atuar como barreira física contra invasão de agentes externos, além de atuar como barreira defensiva contra choques mecânicos e agentes químicos, proteção contra radiação UV, regulação térmica, transmissão de estímulos nervosos e manutenção da hidratação. Adicionalmente, a pele é uma porta de entrada de substâncias por diferentes mecanismos como a penetração, que consiste na entrada de uma substância ativa em uma camada específica da pele. A permeação é a passagem da substância pelas diferentes camadas da pele, tanto funcional como estruturalmente. Já a absorção é a entrada de uma substância na corrente sanguínea (Baroni et al., 2012; Bolzinger et al., 2012; Jepps et. al, 2013; Prow et al., 2011).

A pele é dividida em epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é o epitélio mais externo e sofre constante renovação sendo constituído predominantemente por células diferenciadas denominadas de queratinócitos, que são responsáveis pela síntese de lipídeos e proteínas ao longo de sua maturação, que compõem a estrutura da pele. Além dos queratinócitos, encontram-se na epiderme linfócitos, melanócitos, células de Langerhans e Merkel. Este epitélio é subdividido em camada basal, espinhosa, granular, lúcida (apenas nas palmas das mãos e solas dos pés) e estrato córneo, o qual não possui células metabolicamente ativas (Baroni et al., 2012). Na camada basal, encontram-se as células responsáveis pela formação das demais camadas da pele e renovação constante da epiderme. Nesta camada ocorrem as divisões celulares, proporcionando a diferenciação celular e a migração das células para as camadas mais superiores. O processo de diferenciação dos queratinócitos se encerra quando são formadas as células escamosas planas e anucleadas que constituem o estrato córneo, denominadas de corneócitos. Os corneócitos estão dispostos em 18 a 20 camadas e são circundadas por uma matriz lipídica sendo constituídos por filamentos de queratina que por sua vez são envoltos por um envelope cornificado (Baroni et al., 2012; Cevc, 2004).

A derme é uma camada altamente vascularizada, com fibras elásticas e de colágeno em seu tecido conjuntivo, possuindo também uma rede de vasos sanguíneos, localizada logo abaixo da epiderme. Nessa camada se encontram os folículos pilosos e as glândulas sebáceas e

sudoríparas, além de fibroblastos, responsáveis pela renovação da matriz extracelular e macrófagos, responsáveis por fagocitar os tecidos danificados e material estranho (Baroni et al., 2012; Bhushan, 2012)

A hipoderme é a camada localizada na região mais interna da pele. Sua composição é basicamente de células de adipócitos, sendo por isso, responsável pelo isolamento térmico, armazenamento e metabolização de energia e proteção mecânica (Baroni et al., 2012).

### **3.2. Envelhecimento cutâneo**

O envelhecimento cutâneo é um processo natural que acomete a todos os seres vivos com o decorrer dos anos, podendo gerar alterações perceptíveis ou não. Muitos são os fatores que influenciam diretamente o envelhecimento cutâneo, podendo ser fatores extrínsecos como a exposição aos raios ultravioleta, poluição ambiental, medicamentos, qualidade de vida, tabagismo, alimentação, condições climáticas e algumas doenças, ou fatores intrínsecos como a genética, cor da pele, fatores hormonais ou mutações espontâneas. Todos os seres humanos podem estar expostos diariamente a todos esses fatores, os quais influenciam de forma decisiva no aceleração do envelhecimento cutâneo por terem efeito cumulativo (Maia Campos et al., 2008; Varani et al., 2000; Wagemaker et al., 2017).

Os raios ultravioleta são os agentes que mais agravam os sinais visíveis do envelhecimento cutâneo. A exposição diária sem a utilização de proteção adequada a que as pessoas estão sujeitas, mesmo que moderada, ao longo dos anos é uma ameaça potencial para o aparecimento de sinais de envelhecimento visíveis na pele. Os raios solares nocivos são divididos em ultravioleta A (UVA) com comprimentos de onda entre 320-400 nm, ultravioleta B (UVB) com comprimentos de onda entre 290-320 nm e ultravioleta C (UVC) com comprimentos de onda entre 100-290 nm (Benny, 2003; Maia Campos et al., 2008; Buchli, 2002; Wagemaker et al., 2017).

A exposição aos diferentes tipos de radiação ultravioleta promove a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), também chamados de radicais livres, que quando em grande quantidade, tem sua neutralização pelo corpo dificultada. Como consequência, a presença dos radicais livres em excesso promove uma desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e dano oxidativo ao DNA, gerando o aparecimento de alterações fisiológicas e biológicas como eritema, edema, enrugamento, fotoenvelhecimento, hipersensibilidade, anormalidades de queratinização, ressecamento, hiperpigmentação e flacidez (Wagemaker et al., 2017).

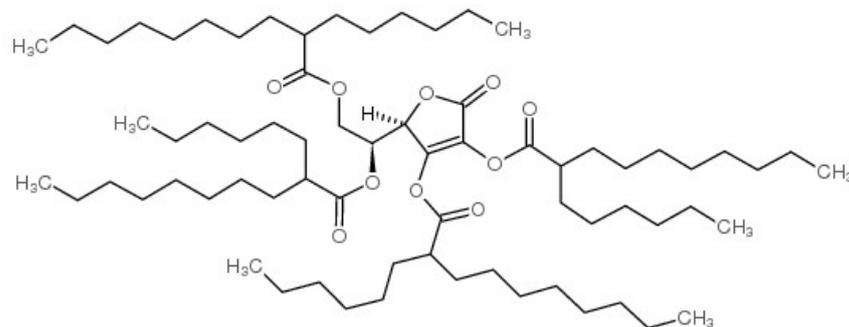
### 3.3. Vitaminas

A relação entre saúde e vitaminas já é conhecida e determinada há muito tempo. No entanto, a utilização dessas substâncias ativas em formulações para aplicação cutânea é recente, corroborando o crescente aumento das pesquisas na área da cosmetologia, juntamente com um maior entendimento dos mecanismos de permeabilidade de substâncias através da pele. Atualmente, sabe-se que a utilização tópica de vitaminas isoladas ou em associação promove benefícios na prevenção e tratamento de processos característicos do envelhecimento cutâneo como ressecamento, queratinização e enrugamento (Leonardi et al., 2002).

#### 3.3.1. Tetraisopalmitato de ascorbila

O tetraisopalmitato de ascorbila (Figura 1) é um precursor lipossolúvel e não oxidável da vitamina C, utilizado com o intuito de contornar as desvantagens e limitações do seu derivado, como rápida oxidação quando exposta ao ar e penetração deficiente na pele devido sua característica hidrofílica (Machado et al., 2016). Sua absorção ocorre na epiderme e após sofrer hidrólise libera o ácido ascórbico que possui muitas funções na manutenção das características da pele.

O tetraisopalmitato de ascorbila atua diretamente na hidratação cutânea prevenindo danos associados com o ressecamento da pele, assim como o envelhecimento cutâneo. Além disso, possui a capacidade de diminuir o dano celular induzido pela radiação ultravioleta B, reduzindo a hiperpigmentação associada à exposição a essa radiação (Ochiai et al., 2006; Maia Campos et al., 2008).



**Figura 1.** Fórmula estrutural do tetraisopalmitato de ascorbila.

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel muito instável sendo susceptível à oxidação em situações de aumento de temperatura, mudanças de pH, exposição à luminosidade

ou contato com enzimas ou íons metálicos (Nováková et al., 2008). Sua eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo é atribuída ao seu grande potencial antioxidante atuando diretamente na diminuição dos radicais livres formados por agentes endógenos ou exógenos, que possuem a capacidade de provocar danos severos ao DNA (Gaspar e Maia Campos, 2007). Além disso, o ácido ascórbico é um co-fator essencial na síntese e regulação do colágeno tipo I e tipo III presente na pele, promovendo também a síntese de inibidores de metaloproteinases, responsáveis pela degradação da matriz extracelular, reduzindo a degradação do colágeno da pele. (Farris, 2005; Gaspar e Maia Campos, 2007).

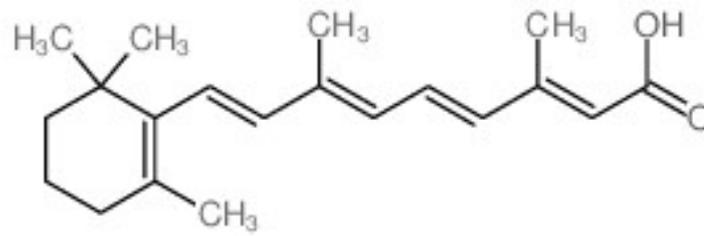
### **3.3.2. Ácido retinóico**

A classe dos retinóides inclui compostos muito importantes e muito utilizados no tratamento de diferentes tipos de lesões cutâneas. No entanto, são substâncias que possuem uma grande limitação no seu uso devido a sua sensibilidade frente a radiação ultravioleta (Guénin e Zatz, 1995 ).

O ácido retinóico (Figura 2) (ácido all-trans-retinóico ou tretinoína) é um produto da metabolização da vitamina A, sendo a principal forma ativa biologicamente natural. Juntamente com a isotretinoína, faz parte da primeira geração dos retinóides e sofre degradação muito fácil quando exposto a temperaturas elevadas, ar e luz (Yamaguchi et al., 2005; Rigopoulos et al., 2004; Carlotti et al., 2002; Ourique et al., 2008).

O ácido retinóico atua promovendo a renovação celular nos folículos epiteliais e acelerando a liberação de corneócitos. Com isso, ocorre a normalização da queratinização, diminuindo e inibindo a formação de novos comedões (Rigopoulos et al., 2004), sendo, portanto, o agente comedolítico de uso tópico mais efetivo (Brown e Shalita, 1998).

Além de atuar nos processos de desordens de queratinização, o ácido retinóico aplicado topicamente é efetivo no tratamento de lesões cutâneas como acne, psoríase e alterações cutâneas como enrugamento, flacidez e hiperpigmentação causadas pelo envelhecimento cutâneo. No entanto, a aplicação tópica do ácido retinóico pode provocar reações adversas como irritação local, eritema, inflamação, ressecamento e descamação da pele, queimação e sensibilidade solar, sendo necessária a utilização de protetores solares (Webster, 1998; Kligman et al., 1986; Yamaguchi et al., 2005).



**Figura 2.** Fórmula estrutural do ácido retinóico.

### 3.4. Nanotecnologia

Muito tem sido investido no aperfeiçoamento da permeação de substâncias ativas e fármacos através da pele por essa ser uma barreira muito bem estruturada e de difícil penetração. Dessa forma, a pesquisa por diferentes carreadores que consigam controlar a liberação de fármacos no local de ação, direcionar os ativos para as camadas mais profundas da pele, modificar as características físico-químicas da pele, ter alta capacidade de transporte, otimizar a velocidade de cedência e diminuir a concentração administrada das substâncias, é uma área que está em constante e evolução (Schaffazick et al., 2003).

Dentro dessa perspectiva, os sistemas nanoestruturados destacam-se como carreadores devido ao seu pequeno tamanho, menor que 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, pois apresentam uma extensa área superficial. Há diferentes tipos de sistemas nanoestruturados destacando-se as nanopartículas poliméricas, que podem ser divididas em nanocápsulas ou nanoesferas, dependendo da sua composição. As nanocápsulas são partículas formadas por um núcleo oleoso circundado por uma parede polimérica, podendo o fármaco estar adsorvido nessa parede e/ou dissolvido no núcleo. Diferentemente, as nanoesferas, devido à ausência de óleo, apresentam uma organização matricial dos polímeros em sua composição, em que o fármaco pode estar tanto retido quanto adsorvido (Guterres et al., 2007; Schaffazick et al., 2003; Prow et al., 2011).

Os sistemas nanoestruturados, em especial as nanocápsulas, vêm estudadas para aplicação cutânea dermatológica e cosmética devido a sua capacidade produzir formulações cosméticas mais estáveis e eficazes, contornando os problemas limitantes referentes às propriedades físico-químicas de substâncias ativas e fármacos, além de serem capazes de promover uma maior permeação na pele (Bonina et al., 2001). O aumento da permeação está relacionado ao fato de que as nanoestruturas aderem fortemente ao estrato córneo, possuem a capacidade de alterar a atividade da substância e por serem capazes de modular a difusão transdérmica (Cevc, 2004; Contri et al. 2016).

Devido ao seu pequeno tamanho, as nanocápsulas são utilizadas como carreadores de fármacos e substâncias ativas de uso cosmético visando o aumento do índice terapêutico com consequente redução de efeitos adversos e toxicidade, transposição das características físico-químicas das substâncias, controle da liberação, aumento da biodisponibilidade, proteção frente à degradação física ou química, além de serem capazes de carrear eficientemente substâncias lipofílicas de interesse em formulações cosméticas (Contri et al., 2015; Guterres et al., 2007; Schaffazick et al., 2003).

### **3.5. Filme**

O aumento da expectativa de vida aliado à preocupação com a aparência pessoal, saúde e bem-estar, assim como a tentativa de atingir os padrões de beleza e ser bem visto no ambiente de trabalho impulsiona a indústria cosmética a estar em constante pesquisa e desenvolvimento por produtos que consigam suprir as demandas do mercado. Nesse contexto, formulações cosméticas na forma de filmes para serem utilizadas como máscaras faciais representam um campo novo no mercado que está ganhando grande destaque devido às vantagens dessas formulações como transporte facilitado e seguro, dosagem única, peso reduzido, facilidade de uso e praticidade (Sanfelice & Truiti, 2010).

Formulações farmacêuticas na forma de filme já vêm sendo utilizadas por representarem potenciais vetores para a liberação controlada de substâncias ativas. Diferentes polímeros já foram utilizados para a obtenção de filmes, como, por exemplo, álcool polivinílico, hidroxipropilmetilcelulose, Pullulan, quitosana, polivinilpirrolidona, carbômeros, dentre outros (Sievens-Figueroa et. al, 2012; Sanfelice & Truiti, 2010; Garrastazu et al., 2014; Llabot et al, 2004; Contri et al., 2016). Esses filmes são utilizados como formulações no tratamento de queimaduras ou lesões na pele, como revestimento de formulações sólidas orais, como filmes de aplicação bucal, controlando a liberação dos ativos ou até mesmo como embalagens em produtos comestíveis (Sanfelice & Truiti, 2010; Garrastazu et al., 2014).

Os filmes poliméricos são vantajosos quando comparados a outras formas farmacêuticas como líquidos e semi-sólidos devido a sua grande área superficial, fixação na área de aplicação desejada e prevenção da perda de água (Sievens-Figueroa et. al, 2012; Drago et al., 2010; Garrastazu et al., 2014). Ainda, como formulação cosmética, representam um produto inovador devido as suas vantagens quando comparadas às formulações cosméticas tradicionais.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Solventes e outros

Os solventes utilizados foram de grau analítico.

- Metanol (Tedia<sup>®</sup>);
- Álcool isopropílico (Tedia<sup>®</sup>);
- Acetonitrila (Tedia<sup>®</sup>);
- Etanol (P.A) (Neon);
- Acetona (P.A) (Neon);
- Ácido acético glacial (Neon);
- Água ultrapurificada,
- Unidade filtrante Millipore<sup>®</sup> Millex – HV Hydrophilic PVDF 0,45 µm.

#### 4.1.2. Equipamentos e Acessórios

- Balança analítica Bel engineering<sup>®</sup>;
- Placa de aquecimento e agitação Velp Scientifica<sup>®</sup>;
- Rotaevaporador Buchi<sup>®</sup>;
- Cromatógrafo Líquido Shimadzu Bomba LC – 20AT, Autoinjeter SIL – 20AMT, Detector UV SPD – 20A;
- Estufa a vácuo Tecnal, modelo TE- 395;
- Coluna LiChrospher<sup>®</sup> RP-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm);
- Potenciômetro digital Digimed -DM22;
- Chocadeira elétrica ChocMais;
- Centrífuga Sigma;
- Micro centrífuga ServyLab;
- NanoSight LM 10;
- Mastersiser<sup>®</sup> 2000, Malvern,
- Zetasizer nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA.

#### 4.1.3. Matérias-Primas

- Poli(ε-caprolactona) 14000 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>);
- Monoestearato de sorbitano (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (Delaware<sup>®</sup>);

- $\alpha$ -bisabolol (Delaware<sup>®</sup>);
- Polissorbato 80 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>);
- Ácido retinóico (TRC Canada);
- Tetraisopalmitato de ascorbila (TRC Canada);
- Hidroxipropilmetilcelulose (Colorcon<sup>®</sup>);
- Álcool polivinílico (Aksy);
- Polivinilpirrolidona (Synth<sup>®</sup>);
- Glicerina (Synth<sup>®</sup>);
- D-pantenol (Delaware<sup>®</sup>)

## 4.2. Métodos Analíticos

### 4.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para realizar a quantificação das substâncias ativas nas formulações propostas, foi necessário desenvolver e validar duas diferentes metodologias analíticas de quantificação, uma para cada ativo. Os parâmetros utilizados no processo de validação (exatidão, linearidade, precisão e especificidade do método analítico) estão em consonância ao exigido pela RDC 166/2017 (Brasil, 2017).

#### 4.2.1.1. Tetraisopalmitato de ascorbila

Para o tetraisopalmitato de ascorbila, diferentes condições foram analisadas conforme descrito na Tabela 1:

**Tabela 1.** Parâmetros avaliados para otimização de metodologia de quantificação do tetraisopalmitato de ascorbila.

<b>Fase estacionária</b>	Coluna LiChrospher <sup>®</sup> RP-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu$ m)
<b>Modo</b>	Fase reversa
<b>Fase móvel</b>	Metanol:Isopropanol (25:75) Acetonitrila:Isopropanol (45:55) Acetonitrila:Isopropanol (25:75)
<b>Método</b>	Isocrático
<b>Vazão</b>	0,8 mL/min 1,0 mL/min

<b>Comprimento de onda</b>	222 nm
	254 nm
<b>Volume de injeção</b>	60 µL
<b>Solução padrão</b>	Isopropanol
	Acetonitrila:Isopropanol (45:55)
	Acetonitrila:Isopropanol (25:75)
	Metanol:Isopropanol (25:75)
<b>Soluções de trabalho</b>	Isopropanol
	Acetonitrila:Isopropanol (1:1)
	Acetonitrila:Isopropanol (70:30)
	Acetonitrila:Isopropanol (30:70)
	Acetonitrila:Isopropanol (60:40)
	Acetonitrila:Isopropanol (40:60)
	Acetonitrila:Isopropanol (75:25)
	Acetonitrila:Isopropanol (25:75)
	Acetonitrila:Isopropanol (45:55)
	Metanol:Isopropanol (25:75)
	Metanol:Isopropanol (75:25)
Metanol:Isopropanol (1:1)	

Após a análise dos parâmetros citados anteriormente, os que foram definidos como ideais para a metodologia analítica estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros utilizados para validação de metodologia do tetraisopalmitato de ascorbila.

<b>Fase estacionária</b>	Coluna LiChrospher® RP-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm)
<b>Modo</b>	Fase reversa
<b>Fase móvel</b>	Metanol:Isopropanol (25:75)
<b>Método</b>	Isocrático
<b>Vazão</b>	0,8 mL/min
<b>Comprimento de onda</b>	222 nm
<b>Volume de injeção</b>	60 µL
<b>Solução padrão</b>	Isopropanol

#### 4.2.1.1.1. Validação da metodologia

##### a) Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

A avaliação da linearidade do método analítico foi realizada pela proporcionalidade entre a concentração e a resposta através da obtenção de três curvas analíticas, pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR%) entre os pontos da curva e pelo coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) (Brasil, 2017). Para a preparação da solução padrão foram pesados 10 mg de tetraisopalmitato de ascorbila e transferidos para balão volumétrico âmbar de 10 mL. Dissolveu-se essa substância ativa em isopropanol e completou-se o volume do balão volumétrico de forma a obter-se uma concentração final de 1 mg/mL.

As soluções de trabalho foram obtidas utilizando-se alíquotas de 75, 150, 225, 300 e 375  $\mu$ L da solução padrão em balões volumétricos âmbar de 10 mL com metanol:isopropanol (25:75) para completar o volume. Homogeneizou-se as soluções, obtendo-se dessa forma, concentrações de 7,5, 15, 22,5, 30 e 37,5  $\mu$ g/mL. Após, as soluções foram filtradas em unidades filtrantes de 0,45  $\mu$ m e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com a IUPAC, na qual foram utilizadas as seguintes equações:

$$LD = \frac{3,3 \times S}{m} \qquad LQ = \frac{10 \times S}{m}$$

Onde S é o desvio padrão da leitura de 3 determinações e m o coeficiente angular da curva analítica (Ribani et al., 2004).

##### b) Precisão

Para esta avaliação, foram obtidas soluções de trabalho a partir da pipetagem de 450  $\mu$ L da suspensão de nanocápsulas em balão volumétrico âmbar de 10 mL, obtendo-se assim uma concentração equivalente ao ponto médio da curva de calibração (22,5  $\mu$ g/mL) e, completou-se o volume com metanol:isopropanol (25:75). Levou-se então essa solução ao sonicador durante 10 minutos, e após procedeu-se com mais 3 minutos de vórtex seguidos por 5 minutos de centrifuga a 4500 rpm. Esse processo foi realizado em sextuplicata, em dois dias diferentes. As soluções foram filtradas em unidades filtrantes de 0,45  $\mu$ m e quantificadas. A precisão foi calculada a partir do desvio padrão relativo (DPR%), conforme descrito na RDC 166/2017.

c) Exatidão

A exatidão corresponde à relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente em termos percentuais (Ribani et al., 2004). Para esta avaliação, foram preparadas três soluções padrões em balão volumétrico âmbar na concentração de 1 mg/mL de tetraisopalmitato de ascorbila dissolvido em isopropanol, que foram levadas por 10 minutos ao sonicador para completa dissolução. De cada solução padrão, foi aliquotado 75, 225 e 375  $\mu\text{L}$  em balão volumétrico âmbar de 10 mL, obtendo-se concentrações de 7,5, 22,5 e 37,5  $\mu\text{g/mL}$ . Foram adicionados 450  $\mu\text{L}$  de suspensão de nanocápsula branca (NC BR) em cada solução extratora e completado o volume com metanol:isopropanol (25:75). Após, foi feita a homogeneização de cada solução, seguida da filtração em unidades filtrantes de 0,45  $\mu\text{m}$  e quantificação empregando o método analítico previamente descrito.

d) Especificidade

A especificidade foi realizada com a finalidade de determinar a presença de interferentes experimentais. Para a realização da especificidade, procedeu-se retirando uma alíquota de 450  $\mu\text{L}$  da NC BR para balão volumétrico âmbar e completando-se o volume com metanol:isopropanol (25:75). Em seguida, submeteu-se essa solução à sonicação por 10 minutos, seguidos de 3 minutos de vórtex e 5 minutos de centrifuga a 4500 rpm. A solução resultante foi filtrada em unidades filtrantes de 0,45  $\mu\text{m}$  e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência.

e) Eficiência de encapsulação

A quantidade de tetraisopalmitato de ascorbila encapsulado foi determinada pela técnica de ultrafiltração-centrifugação. Para a determinação da quantidade livre de substância ativa foram pipetados 400  $\mu\text{L}$  da suspensão de nanocápsulas NC Vit e transferidos para uma unidade filtrante (Ultrafree Microcon 10000 MW, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), que foi levado a centrifugação a 5000 rpm por 600 segundos. Após o ultrafiltrado obtido foi quantificado em cromatógrafo. A quantidade total de tetraisopalmitato de ascorbila foi determinada após total dissolução das nanocápsulas com solvente extrator e quantificação da substância ativa.

A eficiência de encapsulação foi calculada (conforme equação abaixo) determinando-se o ativo cosmético total ( $C_t$ ) nas nanocápsulas e o concentrado de ativo na fase contínua ( $C_w$ ).

$$EE\% = \frac{C_t - C_w}{C_t} \times 100$$

#### 4.2.1.2. Ácido retinóico

Para o ácido retinóico, diferentes condições foram analisadas conforme descrito na Tabela 3:

**Tabela 3.** Parâmetros avaliados para otimização de metodologia de quantificação do ácido retinóico.

<b>Fase estacionária</b>	Coluna LiChrospher® RP-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm)
<b>Modo</b>	Fase reversa
<b>Fase móvel</b>	Metanol:Solução de ácido acético 1% (90:10) Acetonitrila:Água:Ácido acético (85:15:1) Acetonitrila:Metanol:Ácido acético:Água (45:40:1:14) Metanol:Ácido acético 1,8% Metanol:Solução de ácido acético 1,8% (98,5:1,5)
<b>Método</b>	Isocrático
<b>Vazão</b>	0,6 mL/min 0,8 mL/min 1,0 mL/min
<b>Comprimento de onda</b>	325 nm
<b>Volume de injeção</b>	40 µL
<b>Solução padrão</b>	Etanol Metanol
<b>Soluções de trabalho</b>	Acetonitrila:Metanol (1:1)

Após a análise dos parâmetros citados anteriormente, os que foram definidos como ideais para a metodologia analítica estão apresentados na Tabela 4:

**Tabela 4.** Parâmetros utilizados para validação de metodologia do ácido retinóico.

<b>Fase estacionária</b>	Coluna LiChrospher® RP-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm)
<b>Modo</b>	Fase reversa
<b>Fase móvel</b>	Metanol:Solução de ácido acético 1,8% (98,5:1,5)
<b>Método</b>	Isocrático
<b>Vazão</b>	0,6 mL/min
<b>Comprimento de onda</b>	325 nm
<b>Volume de injeção</b>	40 µL
<b>Solução padrão</b>	Metanol
<b>Solução de trabalho</b>	Acetonitrila:Metanol (1:1)

#### 4.2.1.2.1. Validação da metodologia

##### a) Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

A avaliação da linearidade do método analítico foi realizada pela proporcionalidade entre a concentração e a resposta através da obtenção de três curvas analíticas, pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR%) entre os pontos da curva e pelo coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) (Brasil, 2017). Para a preparação da solução padrão foi pesado 10 mg de ácido retinóico e transferido para balão volumétrico âmbar de 10 mL. Dissolveu-se essa substância ativa em metanol e completou-se o volume do balão volumétrico de forma a obter-se uma concentração final de 1 mg/mL.

As soluções de trabalho foram obtidas utilizando-se alíquotas de 25, 50, 75, 100 e 125 µL da solução padrão em balões volumétricos âmbar de 10 mL com acetonitrila:metanol (1:1) para completar o volume. Homogeneizou-se as soluções, obtendo-se dessa forma, concentrações de 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 12,5 µg/mL. Após as soluções foram filtradas em unidades filtrantes de 0,45 µm e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os limites de detecção e quantificação do ácido retinóico foram calculados conforme descrito anteriormente para o tetraisopalmitato de ascorbila.

##### b) Precisão

Para esta avaliação, foram obtidas soluções de trabalho a partir da pipetagem de 150 µL da suspensão de nanocápsulas em balão volumétrico âmbar de 10 mL, obtendo-se assim uma

concentração equivalente ao ponto médio da curva de calibração e, completou-se o volume com acetonitrila:metanol (1:1). Levou-se então essa solução ao sonificador durante 10 minutos, e após procedeu-se com mais 3 minutos de vórtex seguidos por 5 minutos de centrífuga a 4500 rpm. Esse processo foi feito em sextuplicata, em dois dias diferentes. As soluções foram filtradas em unidades filtrantes de 0,45  $\mu\text{m}$  e quantificadas. A precisão foi calculada a partir do desvio padrão relativo (DPR%), conforme descrito na RDC 166/2017.

c) Exatidão

A exatidão corresponde à relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente em termos percentuais (Ribani et al., 2004). Para esta avaliação, foram preparadas três soluções padrões em balão volumétrico âmbar na concentração de 1 mg/mL de ácido retinóico dissolvido em metanol, que foram levadas por 10 minutos ao sonificador para completa dissolução. De cada solução padrão, foi aliquotado 25, 75 e 125  $\mu\text{L}$  em balão volumétrico âmbar de 10 mL, obtendo-se concentrações de 2,5, 7,5 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$ . Foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de NC BR em cada solução e completado o volume com acetonitrila:metanol (1:1). Após, foi feita a homogeneização de cada solução, seguida da filtração em unidades filtrantes de 0,45  $\mu\text{m}$  e quantificação empregando o método analítico previamente descrito.

d) Especificidade

A especificidade foi realizada com a finalidade de determinar a presença de interferentes experimentais. Para a realização da especificidade, aliquotou-se 150  $\mu\text{L}$  da NC BR para balão volumétrico âmbar e completou-se o volume com acetonitrila:metanol (1:1). Em seguida, submeteu-se essa solução à sonicação por 10 minutos, seguidos de 3 minutos de vórtex e 5 minutos de centrífuga a 4500 rpm. A solução resultante foi filtrada em unidades filtrantes de 0,45  $\mu\text{m}$  e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência.

e) Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação do ácido retinóico foi determinada como descrito anteriormente para o tetraisopalmitato de ascorbila.

### 4.3. Formulações

#### 4.3.1. Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram inicialmente preparadas contendo 3 diferentes concentrações de substâncias ativas de uso cosmético, sendo essas 0,5, 1,0 e 1,5 mg/mL, a fim de verificar e estabelecer a melhor formulação (Tabela 5).

**Tabela 5.** Composição quali-quantitativa das três formulações de nanocápsulas desenvolvidas, para volume final de 10 mL de formulação.

	Componente	Quantidades			
		NC1	NC2	NC3	
<b>Fase Orgânica</b>	Poli( $\epsilon$ -caprolactona) 14000	0,100 g	0,100 g	0,100 g	
	Monoestearato de sorbitano	0,0385 g	0,0385 g	0,0385 g	
	Triglicérides dos ácidos cáprico/caprílico	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	55 $\mu$ L	
	$\alpha$ -bisabolol	0,100 g	0,100 g	0,100 g	
	Ácido retinóico	0,005 g	0,01 g	0,015 g	
	Tetraisopalmitato de ascorbila	0,005 g	0,01 g	0,015 g	
	Acetona	25 mL	25 mL	25 mL	
	Etanol	5 mL	5 mL	5 mL	
	<b>Fase Aquosa</b>	Polissorbato 80	0,0770 g	0,0770 g	0,0770 g
		Água purificada	50 mL	50 mL	50 mL

##### 4.3.1.1. Preparação da formulação

Desenvolveram-se formulações contendo os 0,5 mg/mL de substâncias ativas cosméticas, que foram denominadas de NC Vit, e formulações sem as substâncias ativas cosméticas, denominadas de NC BR, para fins comparativos nas análises realizadas. As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado

(Fessi et al., 1989). Nesta metodologia são utilizadas duas fases: fase aquosa e orgânica. Os componentes da fase aquosa, assim como os da fase orgânica, excetuando-se o ácido retinóico, foram mantidos sob agitação e aquecimento a 40 °C até total solubilização das matérias-primas. Após, o ácido retinóico foi adicionado na fase orgânica e aguardou-se sua completa solubilização. Em seguida, com o auxílio de um funil, injetou-se a fase orgânica na fase aquosa, sob agitação magnética constante promovendo a formação das nanocápsulas. Após 10 minutos de agitação, foi realizada a evaporação dos solventes orgânicos e de parte da água, sob pressão reduzida no rotaevaporador a 40 °C, até volume final de 10 mL de formulação.

Desenvolveu-se também uma nanoemulsão contendo as substâncias ativas de uso cosmético cuja metodologia de preparação foi similar às nanocápsulas, excetuando-se a presença de polímero. Essa nanoemulsão foi denominada de NE Vit.

#### 4.3.2. Desenvolvimento dos filmes

Para o desenvolvimento dos filmes, foram testadas diferentes condições de preparação, temperatura e quantidades dos componentes a fim de se estabelecer as concentrações ideais dos constituintes do filme (Tabela 6).

**Tabela 6.** Composição quali-quantitativa das soluções utilizadas para produzir os seis filmes desenvolvidos.

Componente	Função	Quantidades					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
<b>Polivinilpirrolidona</b>		0,6 g	0,6 g	0,6 g	0,075 g	0,075 g	0,12 g
<b>Álcool polivinílico</b>	Filmógeno	1,2 g	5,0 g	1,2 g	0,625 g	0,150 g	0,24 g
<b>Hidroxipropilmetilcelulose</b>		0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,025 g	0,025 g	0,04 g
<b>Glicerina</b>	Umectante	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,0125 g	0,0125 g	20 µL
<b>Pantenol</b>	Hidratante	0,12 g	0,12 g	0,12 g	0,0150 g	0,0150 g	0,024 g
<b>Suspensão de nanocápsulas</b>	Ativos	20 mL	20 mL	20 mL	10 mL	10 mL	10 mL
<b>Água purificada</b>	Veículo	80 mL	80 mL	40 mL	-	-	10 mL

#### 4.3.2.1. Preparação dos filmes

Visando a obtenção de filmes com características tecnológicas adequadas foram realizados diferentes experimentos. Em um primeiro experimento, os componentes da F1 foram adicionados à água purificada, com exceção da suspensão de nanocápsulas, e mantidos sob agitação por um período de 30 minutos, sendo mantidos posteriormente sob refrigeração por 24 horas para finalizar a completa solubilização dos componentes. Após esse período, a suspensão de nanocápsulas foi adicionada à solução e homogeneizada em placa de agitação. Em placas de Petri com 5,5 cm de diâmetro, foram adicionados volumes de 1,0, 1,5, 3,0, 6,0, 8,0, 10,0 e 12,0 mL e deixados secar a temperatura ambiente de  $25 \pm 2$  °C.

Posteriormente, o mesmo procedimento foi repetido, porém alterando-se as condições de secagem de três formas diferentes. Primeiramente, testou-se secar as soluções em placas de Petri utilizando uma placa de agitação horizontal, a temperatura ambiente de  $25 \pm 2$  °C. Em outro experimento, testou-se secar as soluções em placas de Petri em estufa a 25 °C e 40 °C, sem agitação. Para as formulações F2, F3, F4 e F5, a forma de preparo das soluções se deu da mesma forma, porém testou-se apenas a secagem em estufa a 25°C e 40°C.

Em uma nova tentativa, testou-se submeter a F1 ao processo de secagem em estufa a vácuo utilizando 40 °C e 760 mmHg como parâmetros. Para isso, adicionou-se volumes de 6,0, 8,0, 10,0 e 12,0 mL em placas de Petri de 5,5 cm de diâmetro e cobriu-se essas placas com papel alumínio. Esse processo durou cerca de 24 horas, resultando em filmes mais homogêneos quando comparados aos anteriormente testados.

Visando otimizar o processo de formação dos filmes, avaliou-se adicionar o álcool polivinílico em água purificada e manter sob agitação e aquecimento a 60 °C até total solubilização. Após a solubilização, foi realizado o arrefecimento da solução para prosseguir com a adição dos demais componentes da formulação F6, excetuando-se a suspensão de nanocápsulas. Da mesma forma que anteriormente, deixou-se essa solução 24 horas sob refrigeração para finalizar a completa solubilização dos componentes. Após esse período, foi realizada a adição da suspensão de nanocápsulas na solução que em seguida foi homogeneizada em placa de agitação. Posteriormente, foi adicionado um volume de 8 mL por placa de Petri. Após as placas de Petri foram cobertas com papel alumínio previamente furados para permitir a evaporação do solvente. As placas foram levadas para estufa a vácuo a 40 °C e 760 mmHg, com a presença de sílica dentro da estufa para auxiliar na secagem até completa formação de filme, por 24 horas. Esse processo de secagem proporcionou a obtenção de filmes com características tecnológicas mais adequadas para a aplicação pretendida.

Paralelamente, para fins comparativos, foram feitos filmes contendo nanoemulsão com os ativos. Os filmes obtidos após processo de secagem foram denominados de F6 NC Vit, os filmes preparados com as substâncias ativas nanoencapsulados, e F6 NE Vit, os filmes que foram preparados com a nanoemulsão contendo as substâncias ativas.

#### 4.3.2.2. Concentração teórica dos ativos nos filmes

As suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões desenvolvidas apresentaram uma concentração final de substâncias ativas de 0,5 mg/mL. Dessa forma, foram feitos os seguintes cálculos para deduzir a concentração teórica final dos filmes:

- Concentração da NC Vit/NE Vit  $\rightarrow$  0,5 mg/mL;
- Em 10 mL de formulação  $\rightarrow$  5 mg de substâncias ativas;
- Para um volume final de 20 mL (água + NC Vit/NE Vit)  $\rightarrow \frac{20 \text{ mL}}{5 \text{ mg}} = 0,25 \text{ mg/mL}$  de substâncias ativas;
- Em cada placa de Petri foram adicionados 8 mL de formulação  $\rightarrow 8 \text{ mL} \times 0,25 \text{ mg/mL} = 2 \text{ mg}$  de substâncias ativas por placa de Petri;
- O diâmetro das placas é de 5,5 cm  $\rightarrow$  O raio das placas é igual a 2,75 cm<sup>2</sup>,
- Então,  $A = \pi r^2 \rightarrow A = 3,14 \times (2,75)^2 \rightarrow A = 23,74 \text{ cm}^2$ .
- $Concentração = \frac{m}{A} \rightarrow Concentração = \frac{2}{23,74} \rightarrow Concentração = 84 \mu\text{g/cm}^2$

#### 4.4. Caracterização das suspensões de nanocápsulas e dos filmes desenvolvidos

As suspensões de nanocápsulas NC Vit e NC BR desenvolvidas foram caracterizadas quanto ao diâmetro e distribuição granulométrica, índice de polidispersão, potencial zeta e pH. Os filmes F6 NC Vit também foram caracterizados físico-quimicamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata para caracterização, e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

##### 4.4.1. Difração de laser

A análise do diâmetro de partículas e a determinação do *span* para cada formulação proposta foi realizada através da técnica de difração de laser (Mastersizer® 2000, Malvern) a fim de verificar se o diâmetro das partículas se encontrava restrito à faixa nanométrica. A realização das análises do diâmetro dos filmes procedeu-se com a prévia solubilização em diferentes soluções e concentrações testadas, conforme tabela abaixo (Tabela 7):

**Tabela 7.** Soluções utilizadas para solubilização dos filmes.

<b>Amostra</b>	<b>Solução</b>
1	H <sub>2</sub> O UP
2	Metanol:Isopropanol (25:75)
3	H <sub>2</sub> O UP: (Metanol:Isopropanol (25:75)) (1:1)
4	H <sub>2</sub> O UP:(Metanol:Isopropanol (25:75)) (10:90)
5	H <sub>2</sub> O UP:(Metanol:Isopropanol (25:75)) (20:80)
6	H <sub>2</sub> O UP:(Metanol:Isopropanol (25:75)) (30:70)
7	H <sub>2</sub> O UP:Acetonitrila (1:1)
8	H <sub>2</sub> O UP:Isopropanol (1:1)
9	H <sub>2</sub> O UP:Metanol (1:1)

Fragmentos de filme de 0,5 cm<sup>2</sup> (5 no total) foram adicionados em 5 mL de cada solução proposta, sendo posteriormente levados à sonicação por tempos de 10, 15 e 20 minutos, para então poder prosseguir com análise na técnica de difração de laser.

Visando a melhor visualização do perfil nanométrico das formulações, triplicou-se a quantidade de filme utilizada em cada solução, ou seja, foram utilizados 15 fragmentos de filme de 0,5 cm<sup>2</sup> e adicionados às soluções 1, 2, 7 e 9. Essas soluções foram levadas à sonicação por 20 minutos, seguidos de 3 minutos de vórtex para então, poderem ser analisadas.

Após essa análise, aumentou-se a quantidade de filme para 30 fragmentos de 0,5 cm<sup>2</sup>, porém apenas na solução 1, e procedeu-se com o mesmo processo de solubilização e análise. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

#### **4.4.2. Espectroscopia de correlação de fótons**

A distribuição de tamanho de partículas e o índice de polidispersão das formulações propostas foram obtidos pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons em Zetasizer (nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA). Para a realização da técnica, foi feita uma diluição (500 vezes) utilizando 20 µl de NC Vit ou NC BR em balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água ultrapurificada. Já para analisar os filmes, procedeu-se com a diluição de 30 fragmentos de filme de 0,5 cm<sup>2</sup>, adicionados à 5 mL de água ultrapurificada, levados a sonicação por 20 minutos, seguidos de 3 minutos de vórtex. Foram testadas diferentes diluições utilizando essa solução formada com o filme, sendo elas 20 µL em balão volumétrico

de 10 mL, 80 µL em balão volumétrico de 10 mL e 200 µL em balão volumétrico de 10 mL, todas sendo o volume completado com água ultrapurificada. A diluição utilizada foi 20 µL de amostra em balão volumétrico de 10 mL com água ultrapurificada. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

#### **4.4.3. Mobilidade eletroforética**

O potencial zeta das formulações propostas foi obtido pela técnica de mobilidade eletroforética em Zetasizer (nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA). Para a realização da técnica, foi feita uma diluição (500 vezes) utilizando 20 µl de NC Vit ou NC BR em balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com solução de NaCl 1mM. A diluição para análise dos filmes foi otimizada como descrito anteriormente. A diluição que melhor se adequou foi 200 µL de amostra em balão volumétrico de 10 mL com solução de NaCl 1mM para obter-se o potencial zeta. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

#### **4.4.4. Potenciometria**

A determinação do pH das suspensões de nanocápsulas foi realizada em potenciômetro calibrado, imergindo-se diretamente o eletrodo formulações NC Vit e NC BR, após sua preparação. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

#### **4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (4.4.5.)**

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para verificar a morfologia e a superfície das nanocápsulas presentes nos filmes desenvolvidos. Os filmes F6 NC Vit e F6 NE Vit foram metalizados com ouro e analisados em microscópio eletrônico de varredura MEV JSM 6060, com uma tensão de 5 e 8 kV para visualização de suas superfícies, no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS no Campus do Vale.

#### **4.6. Avaliação do potencial de irritação cutânea – HET-CAM**

O potencial de irritação das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões, assim como dos filmes contendo as nanocápsulas e as nanoemulsões, que foram testadas para fins comparativos, foi avaliado *in vitro* pelo teste em ovos de galinha (HET), que utiliza a membrana cório-alantóide (CAM), que é um tecido respiratório altamente vascularizado cuja função é permitir as trocas gasosas entre o embrião e a casca do ovo. Adicionalmente, a CAM mimetiza a cavidade ocular conjuntiva (Katzner et al., 2013; Luepke e Kemper, 1986).

Os ovos embrionados utilizados na realização desse experimento foram uma doação da Faculdade de Zootecnia da UFRGS. Após o recebimento, os ovos foram mantidos durante 10 dias em incubadora (ChocMais) a  $37,0 \pm 0,5$  °C, 60% de umidade relativa, com rotação automática.

O experimento tem como princípio a observação de fenômenos de vasoconstrição, hemorragia e coagulação, o que resulta em uma escala que considera o potencial de irritação das formulações. As cascas de ovos foram abertas na câmara de ar do ovo, a membrana branca foi umedecida com soro fisiológico e removida e 300 µL da formulação foi aplicada ao CAM (n = 6). O tempo de primeira ocorrência dos fenômenos irritativos foi monitorado até 300 s. Utilizou-se três controles, em triplicata, sendo o controle negativo, o soro fisiológico e, os dois controles positivos, a solução de lauril sulfato de sódio a 1% (m/v) para verificar a vasoconstrição, e a solução de hidróxido de sódio a 0,1 M para verificar hemorragia e coagulação (n = 3) (Katzner et al., 2013; Luepke e Kemper, 1986). O escore de irritação (IS) foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$IS = \frac{(301 - h)x5}{300} + \frac{(301 - v)x7}{300} + \frac{(301 - c)x9}{300}$$

Onde h corresponde ao tempo para surgimento de hemorragia, v corresponde ao tempo para surgimento de vasoconstrição e c corresponde ao tempo para surgimento de coagulação.

O grau de irritação foi classificado a partir dos valores obtidos pelo cálculo do escore de irritação (Katzner et al., 2013; Luepke e Kemper, 1986), conforme descrito na tabela 8 abaixo:

**Tabela 8.** Classificação do grau de irritação para as formulações analisadas.

<b>Escore de irritação</b>	<b>Grau de irritação</b>
<b>0 – 0,9</b>	Não irritante
<b>1 – 4,9</b>	Irritação fraca
<b>5 – 8,9</b>	Irritação moderada
<b>9 – 21</b>	Irritação severa

As amostras utilizadas para realização dos testes foram a suspensão de nanocápsulas NC Vit, a nanoemulsão contendo as substâncias ativas NE Vit, o filme contendo a suspensão de nanocápsulas F6 NC Vit e o filme contendo a nanoemulsão com as substâncias ativas F6 NE Vit. Previamente foi feita a dissolução dos filmes em água. Para isso, em 2 tubos falcons

distintos, adicionou-se um filme inteiro de NC Vit e um de NE Vit, juntamente com 4 mL de água ultrapurificada. Procedeu-se com a homogeneização de 20 minutos no ultrason e 3 minutos de vórtex. Dessa forma, foi possível obter soluções de concentrações de 500 µg/mL, tendo em vista que um filme tem 2 mg de cada substância ativa.

Cada formulação foi analisada em sextuplicata, onde aliquotou-se 300 µL de formulação na membrana cório-alantóide exposta de cada ovo, aguardou-se 20 segundos e retirou-se o excesso de formulação com papel absorvente. Em seguida, analisou-se o aparecimento de algum dos fenômenos irritativos, hemorragia, vasoconstrição ou coagulação, ao longo de 5 minutos. Esse volume aplicado por ovo gerou uma concentração de substância ativa de 150 µg por análise, já que as formulações utilizadas, NC Vit, NE Vit, F6 NC Vit e F6 NE Vit tinham uma concentração de 500 µg/mL.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Métodos Analíticos

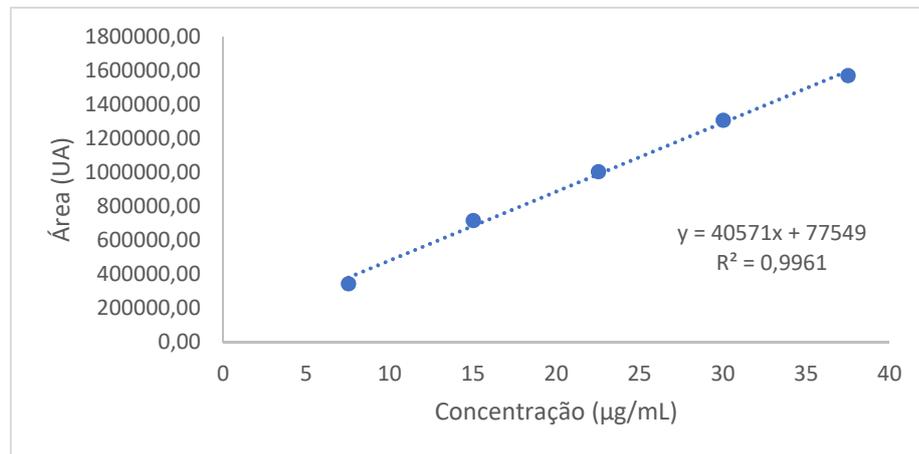
#### 5.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

##### 5.1.1.1. Tetraisopalmitato de ascorbila

##### 5.1.1.1.1. Validação da metodologia

###### a) Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

A linearidade do método foi obtida por meio da construção de curvas analíticas. A figura 3 apresenta a curva de calibração do tetraisopalmitato de ascorbila. Os limites de detecção e quantificação obtidos pelo método desenvolvido (Tabela 9) apresentaram boa sensibilidade, possibilitando a quantificação das substâncias ativas nanoencapsulados (Brasil, 2017).



**Figura 3.** Curva de calibração para o tetraisopalmitato de ascorbila nas concentrações de 7,5 a 37,5 µg/mL.

Através desse gráfico é possível observar que houve um aumento proporcional nas áreas das amostras em relação ao aumento das concentrações, ou seja, atingiu-se uma linearidade através dos valores das áreas *versus* as concentrações, sendo o coeficiente de correlação obtido igual a 0,9961, estando em consonância com os parâmetros exigidos pela ANVISA (Brasil, 2017).

**Tabela 9.** Resultados obtidos de limite de detecção e limite de quantificação para o tetraisopalmitato de ascorbila.

Equação da reta	R <sup>2</sup>	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )
y = 40571x + 77549	0,9961	1,1279	3,423

## b) Precisão

A precisão foi realizada visando-se identificar a reprodutibilidade do método proposto, onde foram preparadas 6 amostras, exatamente da mesma forma, em dois dias diferentes. A partir dos resultados obtidos, o método desenvolvido apresentou-se preciso. A tabela 10 apresenta os valores obtidos nos ensaios para detectar a precisão do método para o tetraisopalmitato de ascorbila.

**Tabela 10.** Resultados obtidos na determinação do teor do tetraisopalmitato de ascorbila na amostra pela metodologia cromatográfica.

		Amostra						Média	DP	DPR
		1	2	3	4	5	6			
<b>Dia 1</b>	Teor (%)	104,798	96,905	95,458	104,906	96,686	104,045	100,467	4,546	4,525
	Teor (mg/mL)	0,524	0,484	0,477	0,524	0,483	0,520	0,502	0,023	4,525
<b>Dia 2</b>	Teor (%)	101,216	96,698	105,287	96,237	99,935	95,287	99,110	3,793	3,828
	Teor (mg/mL)	0,506	0,483	0,526	0,481	0,499	0,476	0,495	0,019	3,828

## c) Exatidão

A tabela 11 apresenta os valores obtidos nos ensaios para detectar a exatidão do método para o tetraisopalmitato de ascorbila.

**Tabela 11.** Resultados obtidos no teste de recuperação realizado na amostra contendo tetraisopalmitato de ascorbila.

Concentração (µg/mL)	7,5	22,5	37,5
<b>Recuperação % Dia 1</b>	102,103	100,404	97,813
<b>Recuperação % Dia 2</b>	97,588	96,669	97,860
<b>Recuperação % Dia 3</b>	101,072	97,004	99,762
<b>Média</b>	100,254	98,026	98,479

<b>DP</b>	2,366	2,066	1,112
<b>DPR</b>	2,359	2,108	1,129

Os ensaios de exatidão indicam o percentual de recuperação da amostra analisada. Dessa forma, foram obtidos valores de recuperação entre  $98,026 \pm 2,108$  % até  $100,254 \pm 2,359$  %, indicando que o método é aplicável para o doseamento do tetráisopalmitato de ascorbila, pois aproxima-se do valor teórico de cada amostra.

#### d) Especificidade

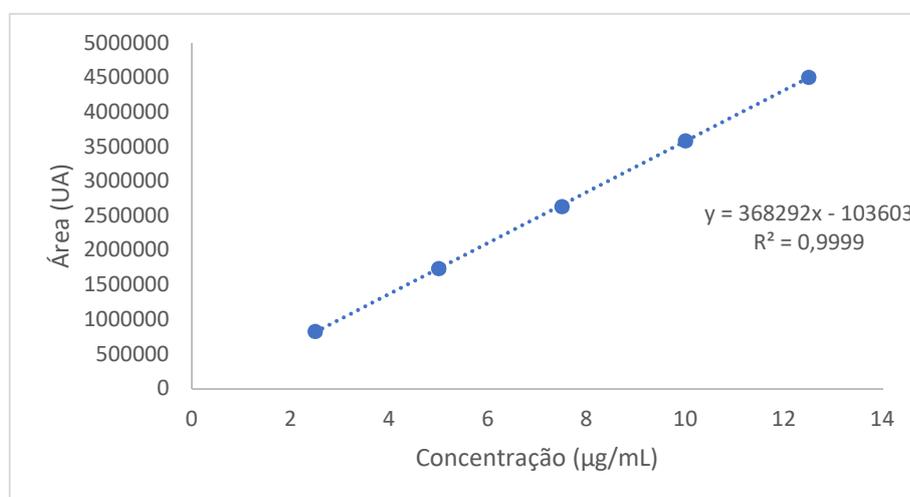
A especificidade foi avaliada utilizando uma amostra contendo suspensão de nanocápsulas sem os ativos farmacêuticos, NC BR, para verificar se algum componente da formulação interferiria no tempo de retenção do ativo. Após a análise realizada, foi verificado que não há nenhum tipo de interferência, demonstrando a especificidade do método desenvolvido para o tetráisopalmitato de ascorbila.

### 5.1.1.2. Ácido retinóico

#### 5.1.1.2.1. Validação da metodologia

##### a) Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

A linearidade do método foi obtida por meio da construção de curvas analíticas. A figura 4 apresenta a curva de calibração do ácido retinóico. Os limites de detecção e quantificação obtidos pelo método desenvolvido (Tabela 12) apresentaram boa sensibilidade, possibilitando a quantificação as substâncias ativas nanoencapsulados (Ribani et al., 2004).



**Figura 4.** Curva de calibração para o ácido retinóico nas concentrações de 2,5 a 12,5 µg/mL.

Através desse gráfico é possível observar que houve um aumento proporcional nas áreas das amostras em relação ao aumento das concentrações, ou seja, atingiu-se uma linearidade através dos valores das áreas versus as concentrações, sendo o coeficiente de correlação obtido igual a 0,9999, estando em consonância com os parâmetros exigidos pela ANVISA (Brasil, 2017).

**Tabela 12.** Resultados obtidos de limite de detecção e limite de quantificação para o ácido retinóico.

Equação da reta	R <sup>2</sup>	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )
$y = 36829x + 103603$	0,9999	0,187	0,567

b) Precisão

A precisão foi realizada visando-se identificar a reprodutibilidade do método proposto, onde foram preparadas 6 amostras, exatamente da mesma forma, em dois dias diferentes. A partir dos resultados obtidos, o método desenvolvido apresentou-se preciso. A tabela 13 apresenta os valores obtidos nos ensaios para detectar a precisão do método para o ácido retinóico.

**Tabela 13.** Resultados obtidos na determinação do teor do ácido retinóico na amostra pela metodologia cromatográfica.

		Amostra						Média	DP	DPR
		1	2	3	4	5	6			
<b>Dia</b> <b>1</b>	Teor (%)	102,008	102,051	102,008	103,227	102,452	102,468	102,369	0,472	0,461
	Teor (mg/mL)	0,510	0,510	0,510	0,516	0,512	0,512	0,512	0,002	0,461
<b>Dia</b> <b>2</b>	Teor (%)	102,069	102,159	103,284	103,140	103,577	102,865	102,849	0,614	0,597
	Teor (mg/mL)	0,510	0,511	0,516	0,516	0,518	0,514	0,514	0,003	0,597

## c) Exatidão

A tabela 14 apresenta os valores obtidos nos ensaios para detectar a exatidão do método para o ácido retinóico.

**Tabela 14.** Resultados obtidos no teste de recuperação realizado na amostra contendo ácido retinóico.

<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>2,5</b>	<b>7,5</b>	<b>12,5</b>
<b>Recuperação % Dia 1</b>	98,831	102,324	97,473
<b>Recuperação % Dia 2</b>	105,099	95,235	100,989
<b>Recuperação % Dia 3</b>	99,732	101,551	103,423
<b>Média</b>	101,221	99,703	100,628
<b>DP</b>	3,388	3,889	2,991
<b>DPR</b>	3,348	3,901	2,972

Os ensaios de exatidão indicam o percentual de recuperação da amostra analisada. Dessa forma, foram obtidos valores de recuperação entre  $99,703 \pm 3,901$  % até  $101,221 \pm 3,348$ %, indicando que o método é aplicável para o doseamento do ácido retinóico, pois aproxima-se do valor teórico de cada amostra.

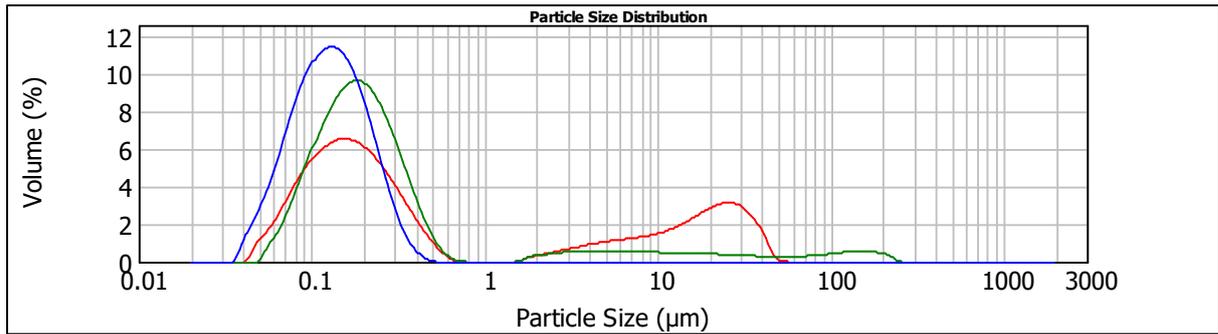
## d) Especificidade

A especificidade foi avaliada utilizando uma amostra contendo suspensão de nanocápsulas sem os ativos farmacêuticos, NC BR, para verificar se algum componente da formulação interferiria no tempo de retenção do ativo. Após a análise realizada, foi verificado que não há nenhum tipo de interferência, demonstrando a especificidade do método desenvolvido para o ácido retinóico.

## 5.2. Formulações

### 5.2.1. Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas

Foram desenvolvidas inicialmente 3 formulações com concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/mL (NC1, NC2 e NC3, respectivamente) conforme descrito no item 4.2.1. e 4.2.1.1., a fim de verificar qual formulação proporcionaria um perfil de distribuição de tamanho mais adequado de nanocápsulas. A figura 5 representa a sobreposição dos perfis de distribuição de diâmetro pela técnica de difração de laser das formulações desenvolvidas.



**Figura 5.** Sobreposição dos perfis de distribuição de diâmetro das 3 formulações por difração de laser, sendo (—) o gráfico representando a formulação a 0,5 mg/mL, (—) o gráfico representando a formulação a 1,0 mg/mL e (—) o gráfico representando a formulação a 1,5 mg/mL.

Observou-se que apenas a formulação NC1 apresentou população unicamente na faixa nanométrica. Diferentemente, as formulações NC2 e NC3 apresentaram o pico referente a população nanométrica, porém apresentaram também picos na faixa micrométrica, indicando que a quantidade adicionada das substâncias ativas foi em excesso, não sendo possível nanoencapsulá-los em sua totalidade. Considerando os resultados obtidos, decidiu-se dar continuidade ao trabalho com a formulação NC1 na concentração de 0,5 mg/mL de tetraisopalmitato de ascorbila e ácido retinóico, a partir deste momento nomeada como NC Vit.

### 5.2.2. Desenvolvimento dos filmes

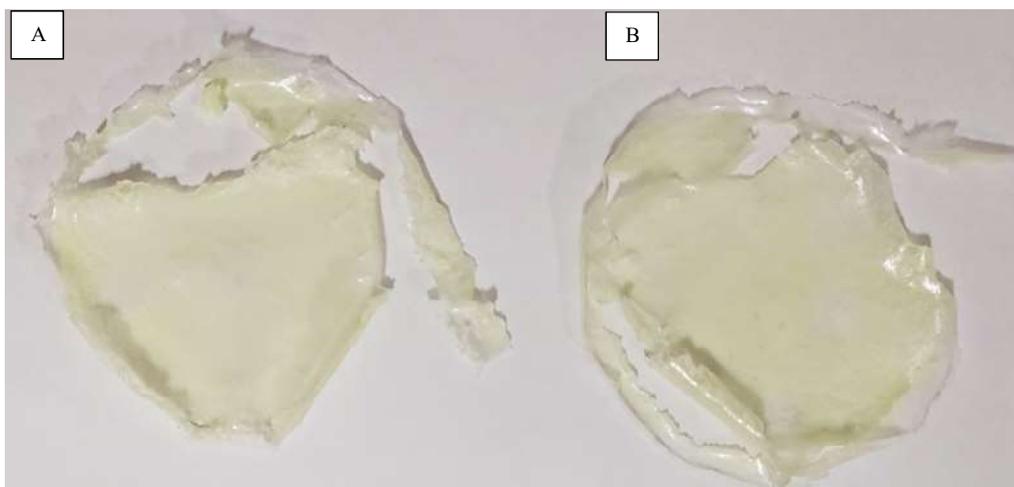
Os primeiros filmes desenvolvidos, F1, não apresentaram um aspecto visual uniforme. Isso pode ser atribuído ao fato do longo período para ocorrer a secagem empregando-se temperatura ambiente de  $25 \pm 2$  °C. Os filmes demoraram em torno de 7 dias para serem formados totalmente, sendo necessário realizar homogeneização manual de tempos em tempos, o que fez com que ocorresse a agregação de alguns componentes em pontos específicos dos filmes, como é possível observar na figura 6. Apesar desse resultado negativo em relação à agregação, os filmes obtidos apresentaram características tecnológicas de textura e flexibilidade satisfatórias.



**Figura 6.** Filme F1 obtido após o processo de secagem, com presença de agregados no centro da placa.

Visando otimizar o processo de secagem e reduzir a formação de agregados, testou-se utilizar uma placa de agitação horizontal no processo de secagem da F1. Essa alternativa não trouxe resultados favoráveis uma vez que o tempo de secagem não reduziu de forma relevante e os filmes continuaram ficando não homogêneos.

Dessa forma, a formulação F1 foi acondicionada em placa de Petri e submetida a um processo de secagem em estufa a 40 °C. Esse processo reduziu o tempo de secagem de 7 dias para 2 dias, porém os filmes obtidos apresentaram-se extremamente secos e quebradiços. Testou-se então reduzir a temperatura de 40 °C para 25 °C objetivando-se evaporar de forma mais gradativa o solvente da formulação. O processo de secagem ocorreu em 3 dias, porém os filmes continuaram quebradiços, como é possível observar na Figura 7.



**Figura 7.** Filmes obtidos após processo de secagem a estufa a 40 °C (A) e 25 °C (B).

Em uma nova tentativa de melhorar as características tecnológicas do filme, realizou-se a adição de 5% de álcool polivinílico visando atingir maior resistência e reduzir a friabilidade do filme. Após as formulações foram submetidas ao processo de secagem em estufa a 25 °C. Os filmes obtidos contendo 5% de álcool polivinílico apresentaram alta rigidez perdendo a sua elasticidade característica, tornando-os desinteressantes para a aplicação proposta (Figura 8).



**Figura 8.** Filme obtido após a adição de 5% de álcool polivinílico na formulação.

Visando a otimização dos filmes, as formulações F3, F4 e F5 foram testadas nas mesmas condições de secagem na estufa a 25 °C. O filme F3 obtido foi produzido com redução do volume de água inicial, considerando que haveria uma redução da duração do processo de secagem e a agregação dos componentes não seria tão acentuada.

Os filmes F4 e F5 foram desenvolvidos com o intuito de obter filmes com maiores concentrações de substâncias ativas, pois extinguiria a quantidade de água utilizada como solvente nas outras formulações. Para isso, testou-se utilizar as quantidades equivalentes dos componentes utilizados anteriormente em F1 para F4, assim como a formulação contendo 5% de álcool polivinílico F2 para F5. A adição dos componentes diretamente nas suspensões de nanocápsulas gerou filmes rígidos e muito quebradiços, impossibilitando a utilização.

Como a F1 foi a formulação que apresentou melhores características tecnológicas, foi submetida ao processo de secagem na estufa a vácuo a 40 °C e 760 mmHg, por até 24 horas. Os filmes obtidos apresentaram-se homogêneos, de textura agradável ao toque, com resistência e elasticidade. No entanto, devido à quantidade elevada de água utilizada na formulação, os filmes apresentaram uma concentração de substâncias ativas muito baixa, sendo necessário alterar novamente a composição da formulação para a obtenção de filmes com maior concentração de substâncias ativas de uso cosmético.

A F6 foi desenvolvida objetivando-se manter as quantidades dos componentes da F1 por placa de Petri, porém com menos quantidade de água utilizada, dessa forma, obtendo-se filmes com as mesmas características desejadas de F1, porém com maiores concentrações das substâncias ativas. Procedeu-se então com a forma de preparo descrita no item 4.2.2., adicionando-se 8 mL por placa de Petri da formulação e levando-as a estufa a vácuo a 40 °C, 760 mmHg, por um período de 24h. Os filmes F6 NC Vit e F6 NE Vit (Figura 9 e 10, respectivamente) formados nesse processo apresentaram as características desejadas de textura, homogeneidade visual e elasticidade.



**Figura 9.** Filme F6 NC Vit obtido após processo de secagem em estufa a vácuo a 40 °C após 24 horas.



**Figura 10.** Filmes F6 NE Vit obtidos após processo de secagem em estufa a vácuo a 40 °C após 24 horas.

### **5.3. Caracterização das suspensões de nanocápsulas e dos filmes desenvolvidos**

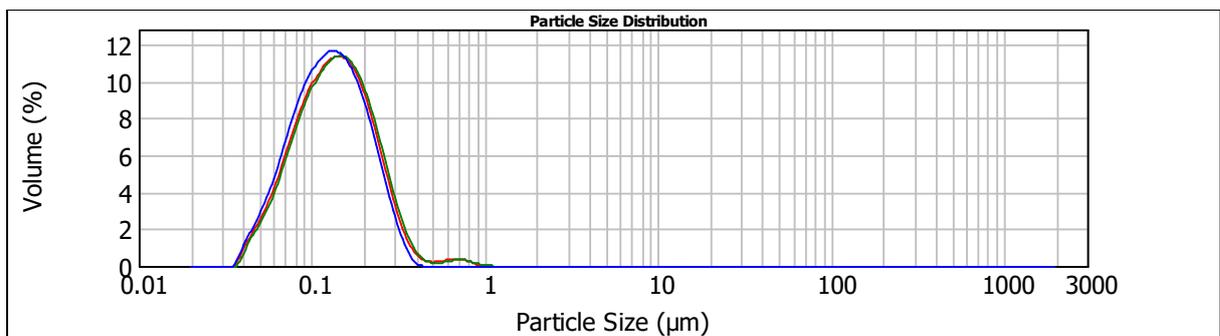
As suspensões de nanocápsulas desenvolvidas obtiveram um aspecto leitoso e uma coloração branca (NC BR) ou coloração amarelada (NC Vit), devido a presença do ácido retinóico, apresentando teor de  $98,8 \pm 4,59$  % para o tetraisopalmitato de ascorbila e  $102,02 \pm 0,02$  % para o ácido retinóico. A eficiência de encapsulação para ambas substâncias ativas foi de 100%.

### 5.3.1. Difração de laser

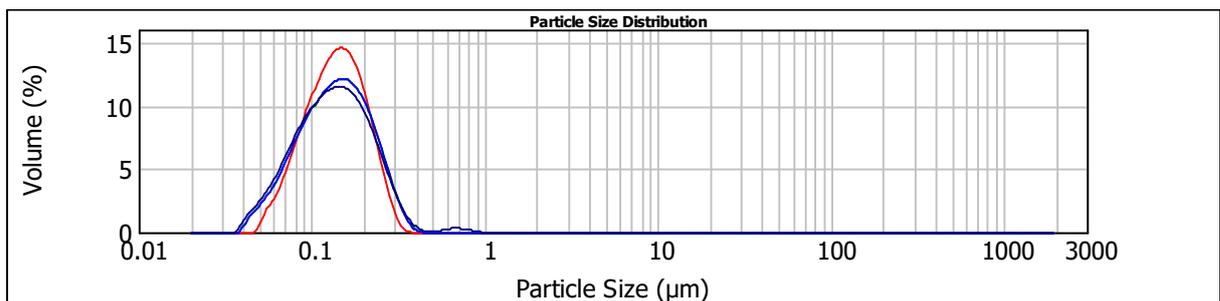
A tabela 15 apresenta os resultados obtidos de tamanho de partícula e *span* por difração de laser para as suspensões de nanocápsulas propostas. Nas figuras 11 e 12 estão representados os gráficos de distribuição do tamanho de partículas para cada formulação. As análises foram realizadas em triplicata.

**Tabela 15.** Diâmetro e valores de *span* das formulações NC Vit e NC BR pela técnica de difração de laser.

Formulação	Span	d(0.1) (nm)	d(0.5) (nm)	d(0.9) (nm)	d(4.3) (nm)
NC BR	1,37±0,04	67±1,53	132±3,78	251±11,3	150±7,57
NC Vit	1,24±0,16	71±6,24	137±2,65	241±13,2	148±2,08



**Figura 11.** Distribuição de diâmetro das formulações NC BR obtida pela técnica de difração de laser.

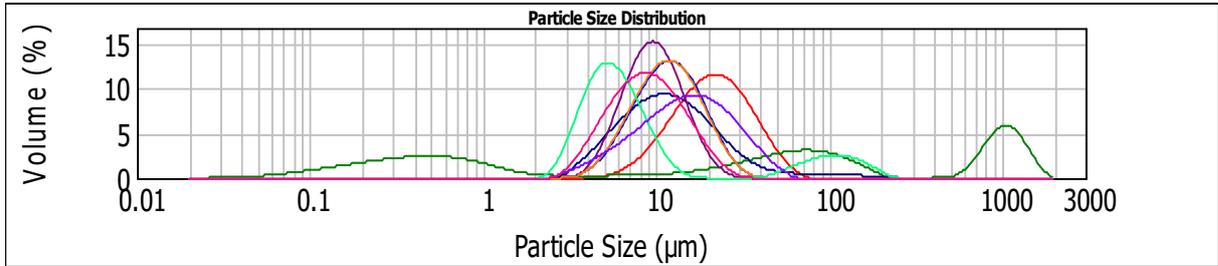


**Figura 12.** Distribuição de diâmetro das formulações NC Vit obtida pela técnica de difração de laser.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que as suspensões de nanocápsulas desenvolvidas apresentaram um perfil nanométrico monomodal com tamanho médio de partículas de  $150 \pm 7,57$  nm para NC BR e  $148 \pm 2,08$  nm para NC Vit, ficando assim dentro dos parâmetros desejados. Os valores de *span* obtidos indicam que as partículas desenvolvidas

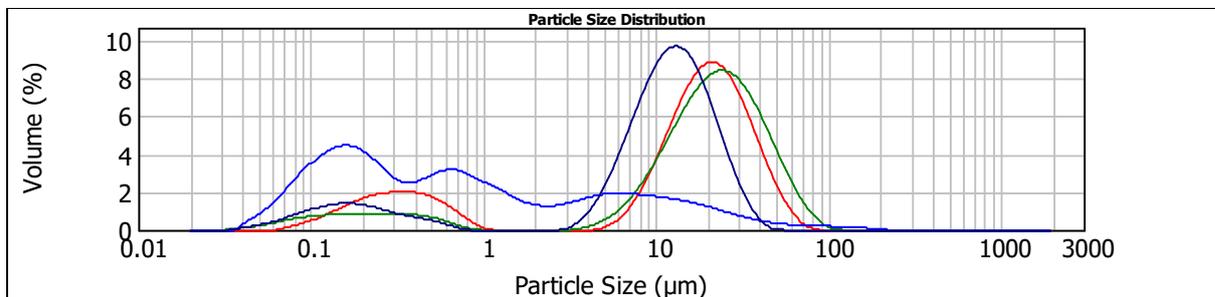
apresentam homogeneidade na distribuição de tamanho, sendo  $1,37 \pm 0,04$  para NC BR e  $1,24 \pm 0,16$  para NC Vit.

Na figura 13 estão representados os perfis de distribuição do tamanho de partículas para o primeiro teste de solubilização dos filmes nas diferentes soluções propostas.



**Figura 13.** Perfil de distribuição do tamanho de partículas por difração de laser, sendo (—) H<sub>2</sub>O UP , (—) MetOH:Isop (25:75), (—) H<sub>2</sub>O UP: (MetOH:Isop (25:75)) (1:1), (—) H<sub>2</sub>O UP:(MetOH:Isop (25:75)) (10:90), (—) H<sub>2</sub>O UP:(MetOH:Isop (25:75)) (20:80), (—) H<sub>2</sub>O UP:(MetOH:Isop (25:75)) (30:70), (—) H<sub>2</sub>O UP:ACN (1:1), (—) H<sub>2</sub>O UP:Isop (1:1), (—) H<sub>2</sub>O UP:MetOH (1:1).

A partir dos resultados, observa-se que apenas a solução 7 indicou a presença de população nanométrica. A ausência dos picos representando as partículas nanométricas nos gráficos pode ser atribuída a pouca quantidade de filme utilizado para o preparo das amostras, não tendo concentração suficiente de partículas para ser detectado no equipamento. Devido a esse resultado, decidiu-se triplicar a quantidade de filme utilizada para ter maiores concentrações de nanocápsulas nas soluções 1, 2, 7 e 9 e ser possível a detecção no equipamento. Sendo assim, a figura 14 indica esses resultados.

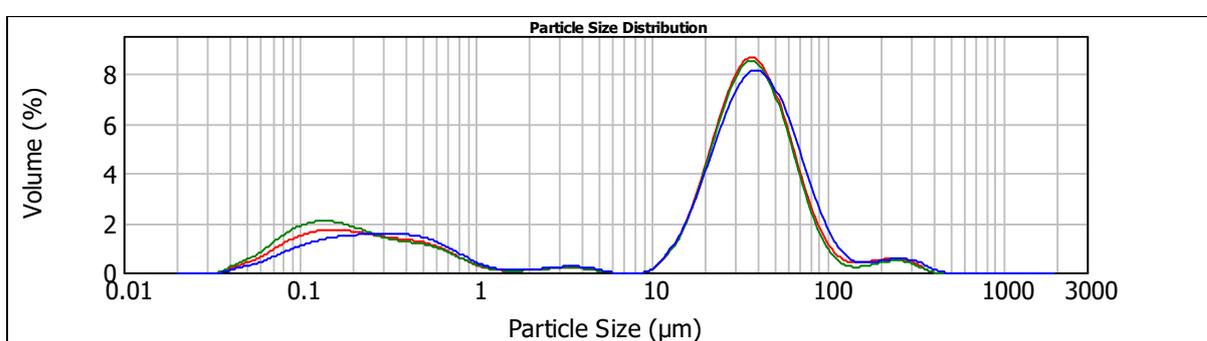


**Figura 14.** Perfil de distribuição do tamanho de partículas por difração de laser, sendo (—) H<sub>2</sub>O UP , (—) MetOH:Isop (25:75), (—) H<sub>2</sub>O UP:ACN (1:1), (—) H<sub>2</sub>O UP:MetOH (1:1).

A adição de maior quantidade de filme propiciou a visualização de população nanométrica nas diferentes soluções testadas. A partir desses resultados, testou-se adicionar novamente uma

maior quantidade de filme na solução, visando aumentar a concentração de nanopartículas na amostra. Escolheu-se utilizar apenas a solução 1, 100% H<sub>2</sub>O UP, pois foi a que apresentou um melhor resultado de solubilização do filme e de perfil de distribuição das partículas.

A figura 15 apresenta o resultado, em triplicata, do perfil de distribuição do tamanho de partículas utilizando 30 fragmentos de 0,5 cm de filme em 5 mL de H<sub>2</sub>O UP. Nesse gráfico, é possível observar o pico na faixa nanométrica indicando a presença de nanocápsulas utilizadas nos filmes, assim como pico na faixa micrométrica, representado os componentes utilizados para o preparo dos filmes.



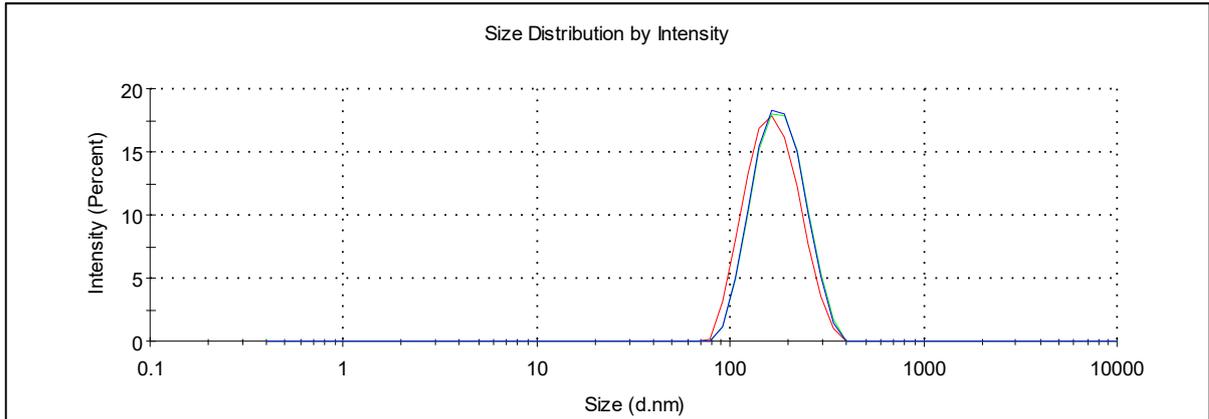
**Figura 15.** Perfil de distribuição de diâmetro de partículas obtido por difração de laser do filme F6 NC Vit.

### 5.3.2. Espectroscopia de correlação de fótons

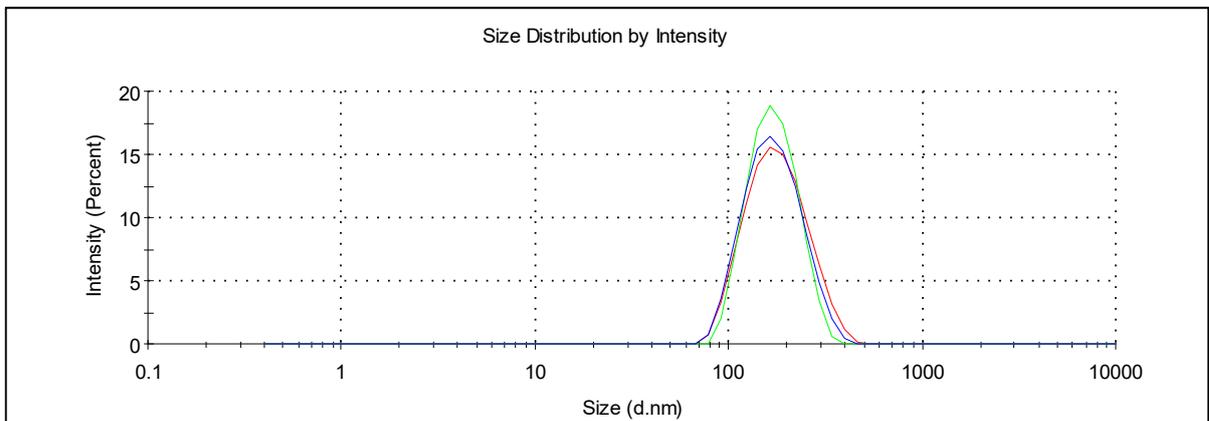
A tabela 16 apresenta os resultados obtidos por espectroscopia de correlação de fótons de distribuição de tamanho de partículas e o índice de polidispersão para as suspensões de nanocápsulas e para o filme desenvolvido. As figuras 16, 17 e 18 apresentam os gráficos de distribuição de tamanho de partículas das formulações. As análises foram realizadas em triplicata.

**Tabela 16.** Diâmetro médio e índice de polidispersão das formulações pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons.

Formulação	PDI	z-average (nm)
NC BR	0,076±0,011	170,1±7,54
NC Vit	0,075±0,020	161,5±4,64
F6 NC Vit	0,503±0,048	167,4±5,17

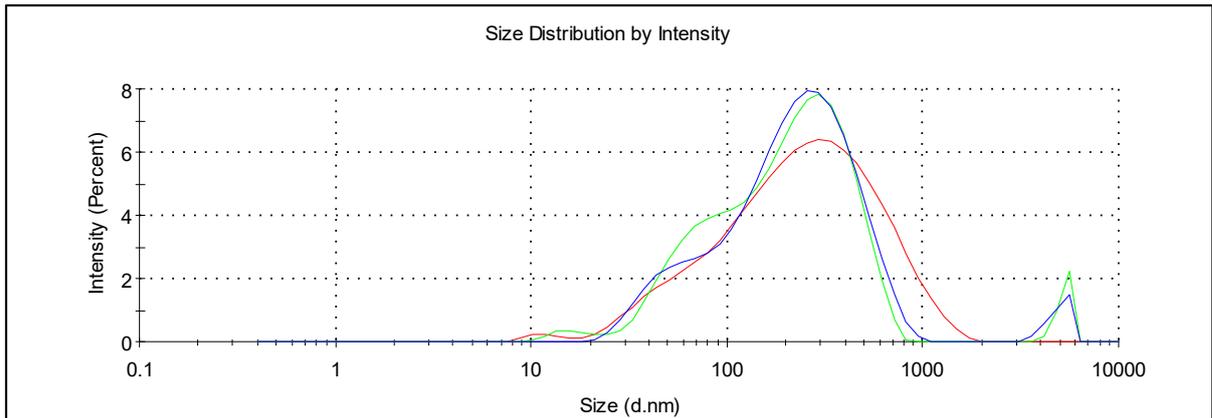


**Figura 16.** Perfil de distribuição de diâmetro das formulações NC BR obtido pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons.



**Figura 17.** Perfil de distribuição de diâmetro das formulações NC Vit pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons.

As análises realizadas confirmam a homogeneidade de distribuição observada anteriormente por difração de laser sobre o perfil nanométrico de distribuição de partículas, uma vez que os gráficos obtidos por espectroscopia de correlação de fótons apresentaram exclusivamente uma população nanométrica, sendo os diâmetros médios de  $170,1 \pm 7,54$  nm para NC BR e  $161,5 \pm 4,64$  para NC Vit. Adicionalmente, os valores de PDI baixos indicam baixa polidispersão das partículas, com valores de  $0,076 \pm 0,011$  para NC BR e  $0,075 \pm 0,020$  para NC Vit.



**Figura 18.** Perfil de distribuição de diâmetro dos filmes F6 NC Vit pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons.

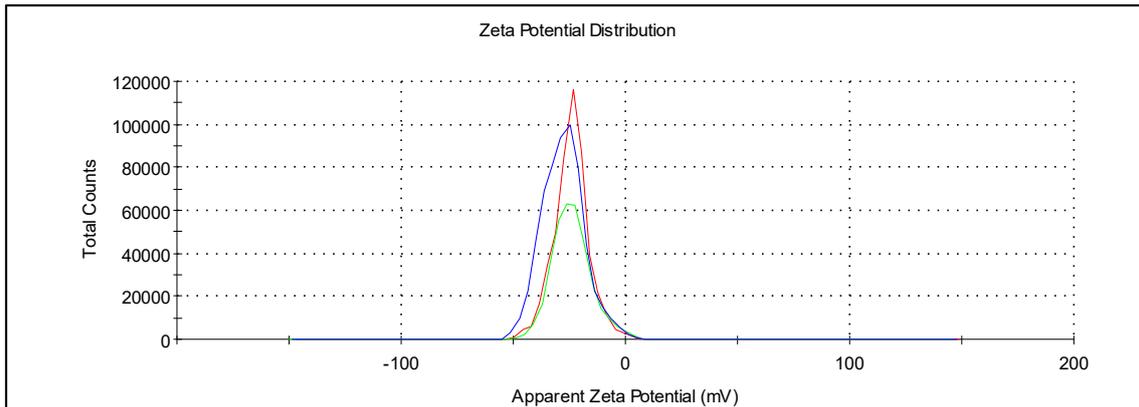
As análises realizadas para os filmes confirmam a presença de duas populações de tamanhos de partículas distintas observada anteriormente por difração de laser, pois os gráficos obtidos por espectroscopia de correlação de fótons apresentaram picos referentes às nanocápsulas e picos referentes aos componentes utilizados para o preparo dos filmes, com diâmetro médio de  $167,4 \pm 5,17$  nm.

### 5.3.3. Mobilidade eletroforética

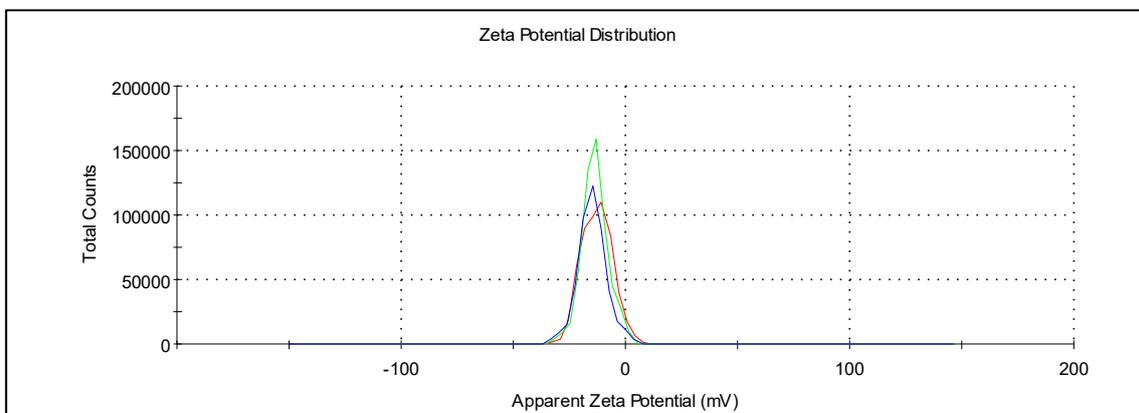
A tabela 17 apresenta os resultados obtidos por mobilidade eletroforética de potencial zeta para as suspensões de nanocápsulas e para o filme desenvolvido. As figuras 19, 20 e 21 apresentam os gráficos de potencial zeta das formulações. As análises foram realizadas em triplicata.

**Tabela 17.** Potencial zeta das formulações pela técnica de mobilidade eletroforética.

Formulação	Zeta (mV)
NC BR	$-24,1 \pm 2,14$
NC Vit	$-13,5 \pm 0,82$
F6 NC Vit	$-7,34 \pm 0,62$

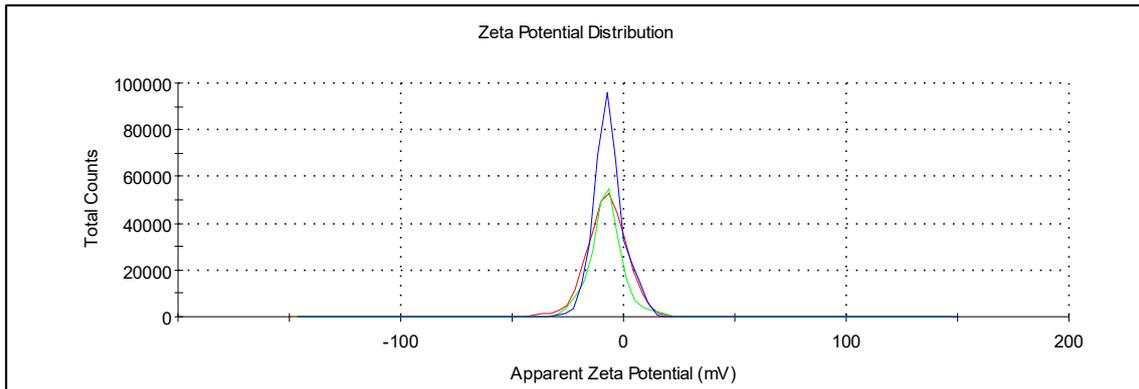


**Figura 19.** Potencial zeta das formulações NC BR pela técnica de mobilidade eletroforética.



**Figura 20.** Potencial zeta das formulações NC Vit pela técnica de mobilidade eletroforética.

O potencial zeta negativo das formulações é devido as características da composição delas, ou seja, são nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) revestidas superficialmente por tensoativo não iônico. Os valores, em módulo, mais altos obtidos na análise, sugerem que a estabilidade físico-química da suspensão é boa, isso devido ao fato de que forças repulsivas grandes causam colisões entre as partículas, evitando assim sua agregação (Schaffazick et al., 2003).



**Figura 21.** Potencial zeta dos filmes F6 NC Vit pela técnica de mobilidade eletroforética.

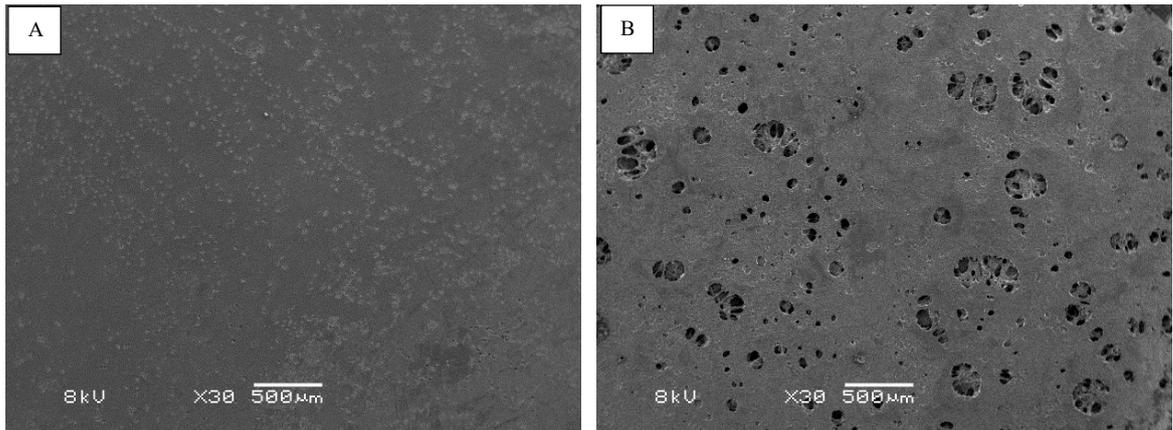
O potencial zeta do filme F6 NC Vit manteve-se negativo,  $-7,34 \pm 0,62$  mV, indicando manutenção das características das suspensões de nanocápsulas mesmo após o processo de secagem.

#### 5.3.4. Potenciometria

O pH das suspensões de nanocápsulas foi determinado inserindo-se o eletrodo diretamente nas formulações, obtendo-se valores de  $6,08 \pm 0,14$  para NC BR e  $5,29 \pm 0,17$  para NC Vit. Essa diferença de valores de pH entre as formulações já era esperada, tendo em vista que uma das substâncias ativas é o ácido retinóico que proporciona uma característica mais ácida para a formulação. Da mesma forma, os valores obtidos apresentaram-se ideais para a aplicação cutânea devido à similaridade ao pH da pele.

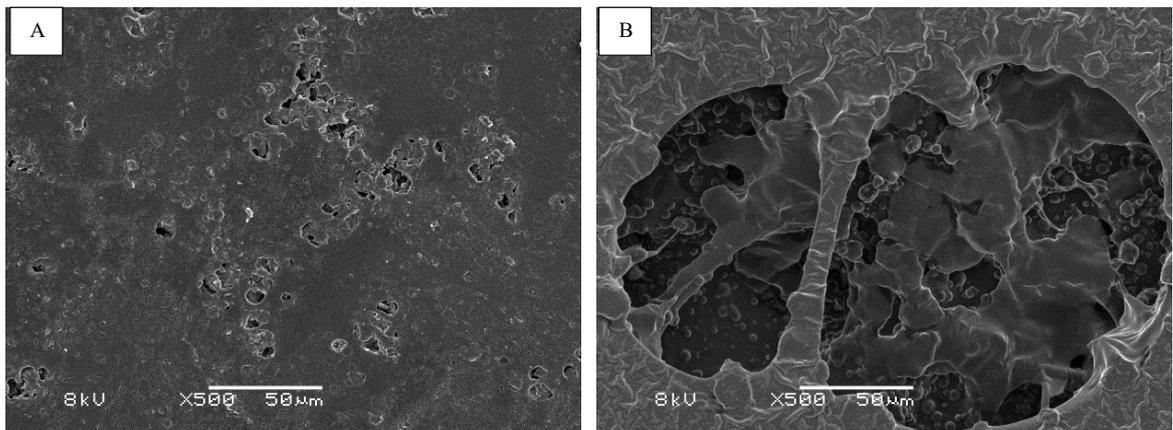
#### 5.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram feitas análises de microscopia eletrônica de varredura dos filmes contendo suspensão de nanocápsulas e dos filmes contendo as nanoemulsões, onde foram observadas superfícies bem distintas entre os dois filmes formulados. Na figura 22B está representado o filme F6 NE Vit, que apresentou poros grandes em sua superfície, quando comparado com a figura 22A referente ao filme F6 NC Vit, que também apresentou poros, porém de tamanhos muito menores.



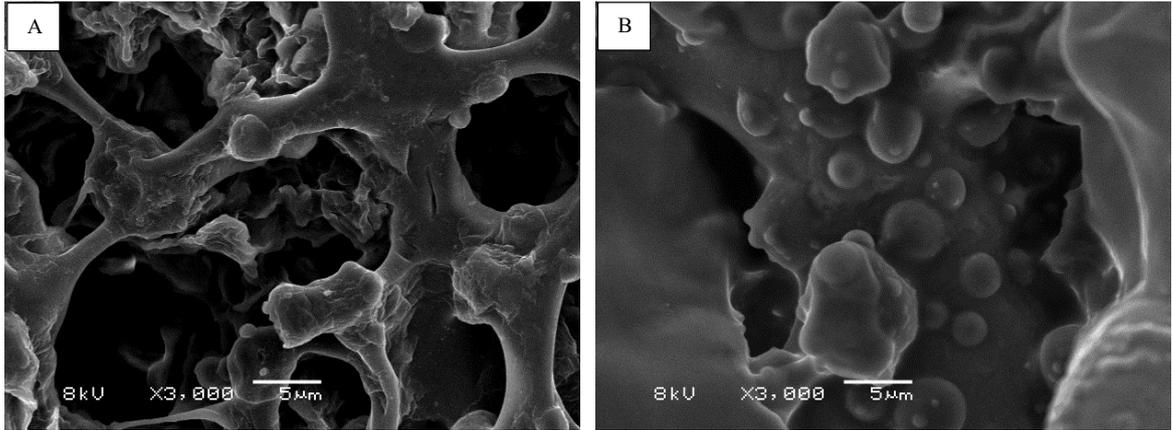
**Figura 22.** Superfície dos filmes, visualizada por microscopia eletrônica de varredura, em aumento de 30 vezes. Em A está demonstrado a superfície do filme F6 NC Vit e em B está demonstrado a superfície do filme F6 NE Vit.

Na figura 23, em um aumento de 500 vezes, é possível observar melhor a superfície e os poros formados em cada filme. A superfície do filme F6 NE Vit em B apresenta-se mais irregular, enquanto que a superfície do filme F6 NC Vit em A apresenta-se mais uniforme.



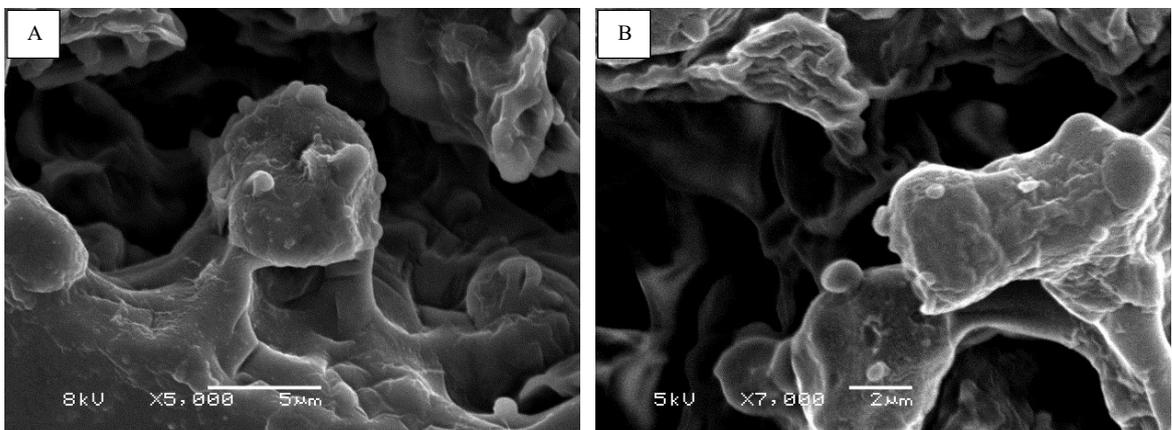
**Figura 23.** Superfície dos filmes, visualizada por microscopia eletrônica de varredura, em aumento de 500 vezes. Em A está demonstrado a superfície do filme F6 NC Vit e em B está demonstrado a superfície do filme F6 NE Vit.

A figura 24 representa os poros de cada filme focados em um aumento de 3000 vezes. Na figura 24A, referente ao filme F6 NC Vit, verifica-se a presença de nanocápsulas no campo inferior da imagem. Já para a figura 24B, referente ao filme F6 NE Vit, percebe-se que as gotículas da nanoemulsão foram mantidas mesmo após todo o processo de secagem e formação do filme que a formulação foi submetida.



**Figura 24.** Representação dos poros dos filmes em aumento de 3000 vezes, visualizados por microscopia eletrônica de varredura. Em A está demonstrado o poro formado no o filme F6 NC Vit e em B está demonstrado o poro formado no filme F6 NE Vit.

Para visualizar de forma mais clara as nanocápsulas presentes no filme F6 NC Vit, foram realizadas análises em aumentos de 5000 e 7000 vezes, representadas na figura 25A e 25B, respectivamente, onde foi evidenciada a presença de nanocápsulas. Nessas figuras, percebe-se a presença de nanocápsulas aderidas à matriz polimérica do filme.



**Figura 25.** Demonstração das nanocápsulas aderidas à matriz polimérica do filme F6 NC Vit em aumento de 5000 vezes em A e aumento de 7000 vezes em B, visualizadas por microscopia eletrônica de varredura.

### 5.5. Avaliação do potencial de irritação cutânea – HET-CAM

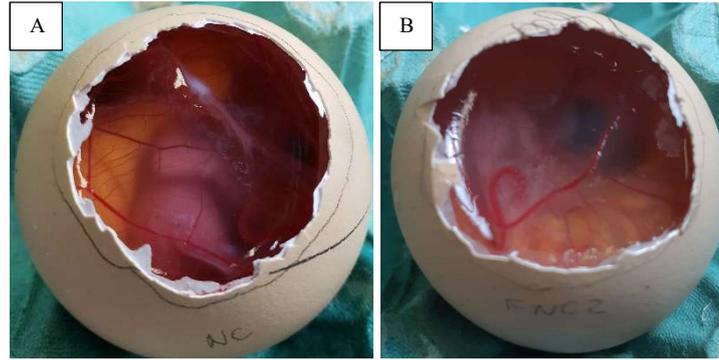
Os ensaios de HET-CAM foram realizados visando obter informações comparativas entre as formulações propostas em relação à potenciais irritações que poderiam ser causadas quando aplicadas na pele. Os controles negativos realizados com soro fisiológico, não apresentaram nenhuma alteração referente à vasoconstrição, hemorragia e coagulação ao longo dos 5 minutos

de análise. Já com os controles de solução de hidróxido de sódio 0,1 M, foi possível observar fenômenos de hemorragia e coagulação em poucos segundos de experimento, assim como com os controles de solução de lauril sulfato de sódio a 1% (m/v) foi possível observar o fenômeno de vasoconstrição em pouco tempo de experimento também (Figura 26).

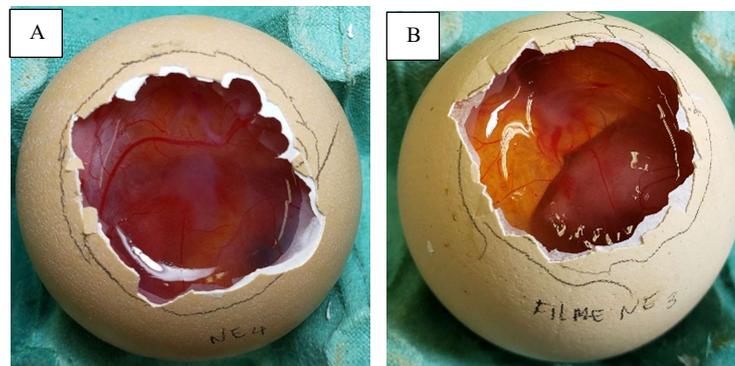


**Figura 26.** Imagens demonstrando os controles utilizados para a realização do HET-CAM. Em A está representado o controle negativo (soro fisiológico); em B e C, os controles positivos solução de lauril sulfato de sódio a 1% (m/v) e solução de hidróxido de sódio 0,1.

As suspensões de nanocápsulas NC Vit e os filmes contendo suspensão de nanocápsulas F6 NC Vit não proporcionaram a aparição dos fenômenos de vasoconstrição, hemorragia ou coagulação ao longo dos 5 minutos de experimento, como é possível observar na figura 27. Isso pode ser atribuído ao fato do polímero presente nas nanocápsulas servir como barreira física entre as substâncias ativas e os vasos sanguíneos da membrana cório-alantóide dos ovos, impedindo seu contato direto. Já as nanoemulsões NE Vit, causaram hemorragia nas 6 amostras analisadas e os filmes contendo nanoemulsão F6 NE Vit, provocaram hemorragia e coagulação ao longo do experimento como demonstrado na figura 28. Como trata-se de formulações com ausência de polímeros, as substâncias ativas ficaram em maior contato com os vasos sanguíneos da membrana cório-alantóide dos ovos, dessa forma, causando maior irritação ao longo do experimento, provocando o surgimento dos fenômenos observados.



**Figura 27.** Imagens demonstrando a membrana cório-alantóide dos ovos após a aplicação das formulações NC Vit em A e F6 NC Vit em B.



**Figura 28.** Imagens demonstrando a membrana cório-alantóide dos ovos após a aplicação das formulações NE Vit em A e F6 NE Vit em B.

Na tabela 18 estão demonstrados os resultados obtidos para as formulações propostas referentes aos escores de irritação calculados, assim como a classificação do grau de irritação obtido através do escore de irritação.

**Tabela 18.** Escores de irritação obtidos por HET-CAM para cada formulação proposta testada.

	NaOH	LSS	Soro fisiológico	NC Vit	NE Vit	F6 NC Vit	F6 NE Vit
<b>Escore de irritação</b>	13,84±0,03	6,54±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	2,78±0,18	0,00±0,00	5,90±2,08
<b>Grau de irritação</b>	Irritação severa	Irritação moderada	Não irritante	Não irritante	Irritação fraca	Não irritante	Irritação moderada

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos infere-se que as formulações contendo suspensão de nanocápsulas, NC Vit e F6 NC Vit podem ser classificadas como “Não irritantes”, uma vez que não foram observados fenômenos de hemorragia, coagulação e vasoconstrição. Em contrapartida, as nanoemulsões foram classificadas como “Irritação fraca” para NE Vit e “Irritação moderada” para F6 NE Vit devido a observação dos fenômenos de hemorragia e coagulação foram perceptíveis.

## 6. CONCLUSÕES

- As nanocápsulas otimizadas produzidas neste trabalho contendo 0,5 mg/mL de ácido retinóico e tetraisopalmitato de ascorbila em associação são inéditas e apresentaram características físico-químicas adequadas para suspensões de nanocápsulas, tendo em vista o perfil de distribuição de diâmetro na faixa nanométrica para as formulações por meio de avaliações realizadas por diferentes técnicas analíticas.
- Os filmes inovadores desenvolvidos contendo  $84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de tetraisopalmitato de ascorbila e ácido retinóico apresentaram características satisfatórias quanto aos parâmetros relacionados à textura, flexibilidade e homogeneidade visual, além de proporcionarem uma recuperação do perfil de distribuição nanométrico nas avaliações por diferentes técnicas analíticas.
- Os dois métodos analíticos desenvolvidos para quantificação do ácido retinóico e do tetraisopalmitato de ascorbila atenderam os requisitos da RDC 166/2017 da ANVISA. Os teores obtidos foram de  $98,8 \pm 4,59 \%$  para o tetraisopalmitato de ascorbila e  $102,02 \pm 0,02 \%$  para o ácido retinóico e a eficiência de encapsulamento foi de 100% para ambas as substâncias ativas de uso cosmético.
- A avaliação por microscopia eletrônica de varredura demonstrou a presença de nanocápsulas nos filmes desenvolvidos F6 NC Vit, com superfície distinta em relação à superfície observada para os filmes F6 NE Vit.
- As formulações de suspensões de nanocápsulas e filmes contendo suspensões de nanocápsulas desenvolvidas neste trabalho apresentaram melhores resultados quando comparadas com as nanoemulsões e filmes contendo nanoemulsões nos experimentos de avaliação da irritação em membrana cório-alantóide de ovo embrionado (HET-CAM). As formulações contendo as substâncias ativas nanoencapsuladas (NC Vit e F6 NC Vit) foram classificadas como “Não irritantes”, já as formulações contendo as substâncias ativas nanoemulsionadas (NE Vit) foram classificadas como “Irritação fraca” e os filmes (F6 NE Vit) como “Irritação moderada”.
- Os filmes desenvolvidos apresentaram características físico-químicas adequadas para a aplicação cutânea porém diferentes experimentos *in vivo* devem ser realizados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARONI, A.; BUOMMINO, E.; DE GREGORIO, V.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V.; WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v.30, n.3, p.257-262, 2012.
2. BENY, M.G. Considerações sobre a pele seca. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, n.3/4, p.42-46, 2003.
3. BHUSHAN, B. Nanotribological and nanomechanical properties of skin with and without cream treatment using atomic force microscopy and nanoindentation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.367, n.1, p.1-33, 2012.
4. BOLZINGER, M.A.; BRIANCON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, n.3, p.156-165, 2012.
5. BONINA, F.P.; PUGLIA, C.; BABUZZI, T.; de CAPRARIIS, P.; PALAGIANO, F.; RIMOLI M.G.; SAIJA, A. In vitro and in vivo evaluation of polyoxyethylene esters as dermal prodrugs of ketoprofen, naproxen and diclofenac. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.14, n.2, p.123-134, 2001.
6. BRASIL. Resolução RDC 166, de 24 de julho de 2017. Estabelece “Critérios para a validação de métodos analíticos”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>. Acesso em 27 de maio de 2019.
7. BROWN, S.K.; SHALITA, A.R. Acne vulgaris. **The Lancet**, v.351, n.9119, p.1871-1876, 1998.
8. BUCHLI, L. Radicais livres e antioxidantes. **Cosmetics & Toiletries**, v.14, n.2, p.54-57, 2002.
9. CARLOTTI, M.E; ROSSATTO, V.; GALLARATE, M. Vitamin A and vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.240, n.1-2, p.85-94, 2002.
10. CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.5, p.675-711, 2004.
11. CONTRI, R.V.; FRANK, L.A.; KAISER, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. **International journal of nanomedicine**, v.9, p.951-962, 2014.
12. CONTRI, R.V.; KULKAMP-GUERREIRO, I.C.; DA SILVA, S.J. FRANK, L.A.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanoencapsulation of rose-hip oil prevents oil

- oxidation and allows obtainment of gel and film topical formulations. **AAPS PharmaSciTech**, v.17, n.4, p.863-871, 2016.
13. DRAGO, H.; MARÍN, G.H.; STURLA, F.; ROQUE, G.; MÁRTIRE, K.; DÍAZ AQUINO, V.; LAMONEGA, R.; GARDINER, C.; ICHIM, T.; RIORDAN, N.; RAIMONDI, J.C.; BOSSI, S.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; VAN LEEUWEN, M.; TAU, J.M.; NÚÑEZ, L.; LARSEN, G.; SPRETZ, R.; MANSILLA, E. The next generation of burns treatment: intelligent films and matrix, controlled enzymatic debridement, and adult stem cells. **Transplantation Proceedings**, v.42, n.1, p.345-349, 2010.
  14. FARRIS, P. K. Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions. *Dermatologic Surgery*, v.31, p.814-7; discussion 818, 2005.
  15. FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutical**, v.55, p.R1-R4, 1989.
  16. FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v.27, n.5, p.796-810, 2010.
  17. FRANK, L.A.; SANDRI, G.; DAUTILIA, F.; CONTRI R.V.; BONFERONI, M. C.; CAMELLA, C.; FRANK, A.G.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, n.1, p.3151-61, 2014.
  18. GARRASTAZU, G.P.; GUTERRES, S.S.; BALDUCCI, A.G.; COLOMBO, P.; SONVICO, F. Polymeric films loaded with vitamin E and *Aloe vera* for topical application in the treatment of burn wounds. *BioMed Research International*, v.2014, article ID 641590, 9 pages, 2014.
  19. GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **International Journal of Pharmaceutics**, v.343, n.1-2, p.181-189, 2007.
  20. GIANETI, M.D.; CORDEIRO, L.R.G.; CAMARGO, F.B. JR; GONÇALVES M.C, P.M.B. Benefits of Combinations of Vitamin A, C and E Derivatives in the Stability of Cosmetic Formulations. **Molecules**, v.17, n.2, p.2219-2230, 2012.
  21. GUÉNIN, E.P.; ZATZ, J.L. Skin permeation of retinyl palmitate from vesicles. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.46, n.5, p.261-270, 1995.

22. GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v.2, p.147-157, 2007.
23. JEPPS, O. G.; DANCİK, Y.; ANISSIMOV, Y. G.; ROBERTS, M. S. Modeling the human skin barrier--towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, n.2, p.152-68, 2013.
24. KATZER, T.; CHAVES, P.; BERNARDI, A.; POHLMANN, A.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Prednisolone-loaded nanocapsules as ocular drug delivery system: development, in vitro drug release and eye toxicity. **Journal of Microencapsulation**, v.31, n.6, p.519-528, 2013.
25. KHAN, T.; PARK, J. K.; KWON, J. H. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.24, n.5, p.816-826, 2007.
26. KLIGMAN, A.M., GROVE, G.L.; HIROSE R.; LEYDEN, J.J. Topical tretinoin for photoaged skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.15, n.4, p.836-859, 1986.
27. LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.
28. LLABOT, J.M; MANZO, R.H.; ALLEMANDI, D.A. Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v.276, n.1-2, p.59-66, 2004.
29. LUEPKE, N.P.; KEMPER, F.H. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v.24, n.6-7, p.495-496, 1986.
30. MACHADO, N.C.F.; DOS SANTOS, L.; CARVALHO, B.G.; SINGH, P.; SOTO, C.A.T.; AZOIA, N.G.; CAVACO-PAULO, A.; MARTIN, A.A.; FAVERO, P.P. Assessment of penetration of Ascorbyl Tetraisopalmitate into biological membranes by molecular dynamics. **Computers in Biology and Medicine**, v. 75, n.1, p. 151-159, 2016.
31. MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; GONÇALVES, G.M.; GASPAR, L.R. In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy of topical formulations containing vitamin C and its derivatives studied by non-invasive methods. **Skin Research and Technology**, v.14, n.3, p.376–380, 2008.

32. NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P.; SOLICHOVÁ, D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.27, n.10, p. 942-958, 2008.
33. OCHIAI, Y.; KABURAGI, S.; OBAYASHI, K.; UJIIE, N.; HASHIMOTO, S.; OKANO, Y.; MASAKI, H.; ICHIHASHI, M.; SAKURAI, H. A new lipophilic pro-vitamin C, tetra-isopalmitoyl ascorbic acid (VC-IP), prevents UV-induced skin pigmentation through its anti-oxidative properties. **Journal of Dermatological Science**, v.44, n.1, p.37-44, 2006.
34. OURIQUE, A.F.; POHLMANN A.R.; GUTERRES, S.S; BECK, R.C.R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.352, n.1-2 p.1-4, 2008.
35. PROW, T.W.; GRICE, J.E.; LYNLEE, L.L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E.M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T.A.; SOYER, P.H.; ROBERTS, M.S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, n.6, p.470-491, 2011.
36. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p.771-780, 2004.
37. RIGOPOULOS, D.; IOANNIDES, D.; KALOGEROMITROS, D.; KATSAMBS, A.D. Comparison of topical retinoids in the treatment of acne. **Clinics in Dermatology**, v.22, n.5, p.408-411, 2004.
38. SANFELICE, A.M.; TRUITI, M.C.T. Produtos em filme – Inovação na tecnologia de cosméticos. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v.32, n.1, p.61-66, 2010.
39. SCHAFFAZICK, S.R.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Guterres. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p. 726-737, 2003.
40. SEITÉ S., BREDOUX C., COMPAN D., ZUCCHI H., LOMBARD D., MEDAISKO C., FORTANIER, A. Histological Evaluation of a Topically Applied Retinol-Vitamin C Combination. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.18, n.2, p.81-87, 2005.
41. SIEVENS-FIGUEROA, L.; BHAKAY, A.; JEREZ-ROZO, J. I.; PANDYA, N.; ROMANACH, R.J.; MICHNIAK-KOHN, B.; IQBAL, Z.; BILGILI, E.; DAVÉ, R.N.

- Preparation and characterization of hydroxypropyl methyl cellulose films containing stable BCS Class II drug nanoparticles for pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v.423, n.2, p.496–508, 2012.
42. VARANI, J.; WARNER, R.L; GHARRAEE-KERMANI, M.; PHAN, S.H.; KANG, S.; CHUNG, J.; WANG, Z.Q.; DATTA, S.C.; FISHER, G.J.; VOORHEES, J.J. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin, **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 3, p. 480-486, 2000.
43. WAGEMAKER, T.A.L; MAIA CAMPOS, P.M.B.G; KENJI S.; DAIKI K.; DAISUKE Y. Antioxidant-based topical formulations influence on the inflammatory response of Japanese skin: A clinical study using non-invasive techniques. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.117, p. 195-202, 2017.
44. WEBSTER, G. H. Topical tretinoin in acne therapy. **Journal of the Academy of Dermatology**, v.39, n.2, p. S38-S44, 1998.
45. YAMAGUCHI, Y.; NAGASAWA, T.; NAKAMURA, N. TAKENAGA, M.; MIZOGUCHI, M.; KAWAI, S.; MIZUSHIMA, Y.; IGARASHI, R. Successful treatment of photo-damaged skin of nano-scale atRA particles using a novel transdermal delivery. **Journal of Controlled Release**, v.104, n.1, p.29-40, 2005.
46. ZHOU, W.; APKARIAN, R.; WANG, Z.L.; JOY, D. Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM)- Techniques and Applications. **Scanning Microscopy for Nanotechnology**, Editora Springer, New York, NY, 2006.