

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE
INTERESSE FARMACÊUTICO E COSMÉTICO A
PARTIR DE ÓLEOS VEGETAIS DERIVADOS DE
PLANTAS CULTIVADAS NO RS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lucas Almeida Rigo

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE INTERESSE
FARMACÊUTICO E COSMÉTICO A PARTIR DE ÓLEOS
VEGETAIS DERIVADOS DE PLANTAS CULTIVADAS NO RS**

Lucas Almeida Rigo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE INTERESSE
FARMACÊUTICO E COSMÉTICO A PARTIR DE ÓLEOS VEGETAIS
DERIVADOS DE PLANTAS CULTIVADAS NO RS**

elaborada por
Lucas Almeida Rigo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ruy Carlos Ruver Beck, Dr.
(Presidente/Orientador)

Renata Platchek Raffin, Dra. (UNIFRA)

Margareth Linde Athayde, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 14 de março de 2011.

À minha família e a Sara, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por ter me proporcionado esta oportunidade ímpar.

Ao Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Muito obrigado pela confiança, orientação, conhecimentos transmitidos e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane de Bona Silva por todo o apoio disponibilizado.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia S. Guterres e Prof^a. Dr^a. Adriana R. Pohlmann da UFRGS pela concessão de equipamentos para a realização de análises nanométricas.

À Prof^a. Dr^a. Tatiana Emanuelli e sua aluna Andreia Quatrin pelas análises de cromatografia gasosa.

Às colegas de laboratório: Aline, Juliana, Karine, Luana, Márcia, Marila e Roberta. Meus agradecimentos também são extensivos a todas as colegas do laboratório de Farmacotécnica da UFSM. Sem vocês seria impossível a realização deste trabalho.

Aos funcionários Renato e Rose do Departamento de Farmácia Industrial pela amizade e apoio.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos. À Secretaria da Ciência e Tecnologia do estado do Rio Grande do sul pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE INTERESSE FARMACÊUTICO E COSMÉTICO A PARTIR DE ÓLEOS VEGETAIS DERIVADOS DE PLANTAS CULTIVADAS NO RS

AUTOR: LUCAS ALMEIDA RIGO

ORIENTADOR: RUY CARLOS RUYER BECK

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 14 de março de 2011.

Este trabalho teve como objetivo utilizar os óleos de arroz, soja e girassol como matérias-primas alternativas para o desenvolvimento de formas farmacêuticas e cosméticas. No primeiro capítulo foram preparadas formulações cosméticas fotoprotetoras do tipo gel-creme contendo os óleos de arroz ou de soja em diferentes concentrações, utilizando um filtro solar orgânico (benzofenona-3). Foi avaliada a influência que estes óleos exercem sobre as seguintes características: pH, espalhabilidade, comportamento reológico e fator de proteção solar *in vitro*. As formulações apresentaram características físico-químicas adequadas, comportamento reológico não-Newtoniano e espalhabilidade dependente da concentração de óleo. O fator de proteção solar ficou em torno de 10, independente do tipo e da concentração de óleo utilizados. No segundo capítulo, foram preparadas formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado contendo os óleos de arroz, soja ou de girassol. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram pH, diâmetro de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, características morfológicas e estabilidade frente ao armazenamento das diferentes formulações. O tipo de óleo vegetal não influenciou nas características físico-químicas das formulações, sendo estas adequadas e estáveis durante o armazenamento por três meses. Além disso, a partir da avaliação da atividade antiproliferativa e genotóxica, pode-se sugerir que nenhuma das formulações apresentou riscos ao meio ambiente. No terceiro capítulo, foram preparadas as formulações de nanocápsulas contendo os três óleos vegetais e um fármaco modelo (0,5 mg/mL) para se avaliar o efeito dos óleos na liberação *in vitro* do fármaco. O fármaco foi encapsulado com sucesso em todas as nanocápsulas com um teor total próximo ao teórico. O estudo de liberação *in vitro* a partir das nanocápsulas demonstrou uma liberação controlada seguindo um modelo biexponencial, independente do tipo de óleo. A formulação de nanocápsulas contendo o óleo de girassol proporcionou um maior controle da liberação, seguido da formulação de nanocápsulas contendo o óleo de soja e arroz, demonstrando que o tipo de óleo influencia no perfil de liberação do fármaco. As interações entre os óleos vegetais e o lipídio sólido presentes no núcleo das nanocápsulas foram as responsáveis por controlar a velocidade da liberação. Através dos trabalhos realizados ficou demonstrada a viabilidade tecnológica da utilização dos óleos de arroz, soja e de girassol como fonte alternativa de matéria-prima viável para a obtenção de formulações farmacêuticas de interesse farmacêutico e cosmético.

Palavras-chave: fotoprotetores; nanocápsulas; óleos vegetais; óleo de arroz; óleo de soja; óleo de girassol.

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria**DEVELOPMENT OF COSMETIC OR PHARMACEUTICAL
FORMULATIONS FROM VEGETABLE OIL DERIVATES OF PLANTS
CULTIVATED IN RS**

AUTHOR: LUCAS ALMEIDA RIGO

ADVISER: RUY CARLOS RUYER BECK

Place and Date of Defense: Santa Maria, March 14, 2011.

This work aimed to use the rice bran, soybean or sunflower seed oil as alternative raw materials for the development of pharmaceutical and cosmetic dosage forms. In the first chapter sunscreen cosmetic formulations were prepared from gel-cream containing rice bran or soybean oil at different concentrations, using an organic sunscreen (benzophenone-3). The influence of these oils on the following characteristics was assessed: pH, spreadability, rheological behavior, and *in vitro* sun protection factor. The formulations showed suitable physical and chemical characteristics, non-Newtonian rheological behavior, and spreadability dependent on the concentration of the oil. The sun protection factor was around 10 regardless of the type and concentration of oil used. In the second chapter, lipid-core nanocapsules were prepared by interfacial deposition of preformed polymer containing rice bran, soybean or sunflower seed oil. The physicochemical parameters analyzed were pH, particle size, polydispersity index, zeta potential, morphological characteristics, and stability. The type of vegetable oil did not have influence on the physicochemical characteristics of the formulations, which remained adequate and stable during the 3 months of storage. Moreover, based on the genotoxicity and proliferative activity studies we can suggest that none of the formulations present risks to the environment. In the third chapter, nanocapsule formulations containing the three vegetable oils and a model drug (0.5 mg/mL) were prepared to evaluate the effect of the oils on the *in vitro* drug release. The drug was successfully encapsulated in all nanocapsule formulations with total drug close to the theoretical value. The *in vitro* drug release study from nanocapsules showed that the controlled release follows a biexponential regardless of the type of vegetable oil. The nanocapsule formulations containing the sunflower seed oil provided higher drug release control, followed by the nanocapsule formulations containing soybean and rice bran oil, showing that the type of the vegetable oil influences the drug release profile. Through these works the technological feasibility to use the rice bran, soybean or sunflower seed oil was demonstrated as an alternative source of viable raw material for obtaining pharmaceutical formulations of pharmaceutical and cosmetic interest.

Key words: sunscreen, nanocapsules, vegetable oils, rice bran oil, soybean oil, sunflower seed oil.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Formulações fotoprotetoras contendo óleo de arroz ou de soja: propriedades reológicas, espalhabilidade e fator de proteção solar *in vitro*

FIGURA 1 - Chemical structure of benzophenone-3.....	41
FIGURA 2 - Graphic representation of spreadability of gel-creams (n = 3): (A) gel-creams containing vegetable oils with BZ-3; (B) gel-creams containing vegetable oils without BZ-3.....	47
FIGURA 3 - Rheological behavior of gel-creams containing vegetable oils with (A) or without (B) BZ-3 (n = 3).....	48
FIGURA 4 - Graphic representation of viscosity (mPa.s) of gel-creams in relation to the shear rate (s ⁻¹) (n = 3): (A) gel-creams containing BZ-3; (B) gel-creams without BZ-3....	49

CAPÍTULO 2: Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleos vegetais alternativos: desenvolvimento e estudo *in vivo* de genotoxicidade

FIGURA 1 - Particle sizes distribution of (A) LC-NC-RB, (B) LC-NC-SB, (C) LC-NC-SF (D) NE-RB, (E) NE-SB and (F) NE-SF.....	66
FIGURA 2 - Transmission electron microscopy images of (A) LC-NC-RB, (B) LC-NC-SB, (C) LC-NC-SF. [bar = 200 nm (150,000x)]......	68
FIGURA 3 - Rheological behavior of LC-NC containing different vegetable oils (n=3)...	68
FIGURA 4 - Backscattering analysis of (A) LC-NC-RB and (B) LC-NC-SB and (C) LC-NC-SF.....	71
FIGURA 5 - Mitotic phases cells of <i>Allium cepa</i> treated with different nanocapsules formulations: (A) cell with chromosomal break (arrow) treated with LC-NC-RB, (B) arrow indicating anaphasic bridge cell treated with LC-NC-RB; (C) arrow indicating chromosomal break of the cell treated with LC-NC-SF; (D) cell treated with LC-NC-SF, arrow indicating anaphasic bridge; (E) cell treated with LC-NC-SB, arrow indicating chromosomal break; (F) arrow indicating anaphasic bride of the cell treated with LC-NC-SB. Scale bar 10 micrometers.....	72

CAPÍTULO 3: Controle do perfil de liberação de fármaco a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico: influência do tipo de óleo vegetal

FIGURA 1 - Transmission electron microscopy images of (A) LC-RB-CP, (B) LC-SB-CP and (C) LC-SF-CP [bar = 200 nm (150,000x)]......	87
---	----

- FIGURA 2 - *In vitro* CP release profiles from ethanolic solution (CP-ES) and from lipid-core nanocapsules prepared with rice bran (LC-RB-CP), soybean (LC-SB-CP) and sunflower seed (LC-SF-CP) oils. The lines correspond to the fitting to the biexponential equation..... 88
- FIGURA 3- Graphic representation of viscosity (mPa.s) of the dispersions composed by rice bran (RB), soybean (SB) or sunflower seed (SF) oil with the sorbitan monostearate (SM) (RB-SM, SB-SM or SF-SM) in relation to the shear rate (s^{-1}), at 50°C..... 91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Formulações fotoprotetoras contendo óleo de arroz ou de soja: propriedades reológicas, espalhabilidade e fator de proteção solar *in vitro*

TABELA 1 - Quali-quantitative composition of semisolids.....	43
TABELA 2 - pH values and spreadability factors of formulations containing the vegetable oils and BZ-3 (mean \pm standard deviation).....	46
TABELA 3 - Regression coefficient (r^2) for various flow models in shear rate-shear stress curve (mean \pm standard deviation).....	50
TABELA 4 - Consistency (k) and flow indices (n) for all formulations (mean \pm standard deviation).....	51
TABELA 5 - <i>In vitro</i> SPF values of gel-creams and hydrogels containing benzophenone-3 (mean \pm standard deviation).....	52

CAPÍTULO 2: Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleos vegetais alternativos: desenvolvimento e estudo *in vivo* de genotoxicidade

TABELA 1 - Percentages of weight of polymeric films after contact with the vegetable oils during 5, 10, 15 and 30 days. Values represent the mean of three independent experiments.....	66
TABELA 2 - Physicochemical characteristics of lipid-core nanocapsules containing rice bran (LC-NC-RB), soybean (LC-NC-SB) or sunflower (LC-NC-SF) oils after preparation. ($n=3$).....	67
TABELA 3 - Physicochemical characteristics of lipid-core nanocapsules containing rice bran (LC-NC-RB), soybean (LC-NC-SB) or sunflower (LC-NC-SF) oils after storage time (3 months) ($n=3$).....	70
TABELA 4 - Number of cells in different cell cycle (interphase, prophase, metaphase, anaphase, and telophase) and the mitotic index (MI) of <i>Allium cepa</i> root-tips treated with distilled water (negative control), glyphosate 20% (positive control), acetone and the LC-NC containing rice bran (LC-NC-RB), soybean (LC-NC-SB) or sunflower (LC-NC-SF) oil. The total number of cells analyzed for each treatment was 4000.....	71
TABELA 5 - Mitotic aberrations in the <i>Allium cepa</i> root-tips treated with LC-NC containing rice bran (LC-NC-RB), soybean (LC-NC-SB) or sunflower oil (LC-NC-SF)....	72

CAPÍTULO 3: Controle do perfil de liberação de fármaco a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico: influência do tipo de óleo vegetal

TABELA 1 - Fatty acid composition of rice bran, soybean or sunflower seed oils, expressed in percentage.....	86
TABELA 2 - Physicochemical characteristics of lipid-core clobetasol propionate-loaded nanocapsules containing rice bran (LC-RB-CP), soybean (LC-SB-CP) or sunflower seed (LC-SF-CP) oils after preparation ($n=3$).....	87
TABELA 3 - Rate constants, correlation coefficients, and MSC obtained by fitting the release profiles of clobetasol propionate-loaded from lipid-core nanocapsules formulations containing rice bran (LC-RB-CP), soybean (LC-SB-CP) or sunflower seed (LC-SF-CP) oils according to the biexponential equation.....	89

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	19
1.1 Objetivo geral	20
1.2 Objetivos específicos	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1 Fotoproteção e formulações fotoprotetoras contendo produtos de origem vegetal	22
1.2 A nanociência e sistemas nanocarreadores de fármacos	28
1.3 Preparações de nanocápsulas poliméricas	32
1.4 Sistemas nanoestruturados e o impacto ambiental	34
CAPÍTULO 1: Formulações fotoprotetoras contendo óleo de arroz ou de soja: propriedades reológicas, espalhabilidade e fator de proteção solar <i>in vitro</i>	36
1.1 Introdução	37
PUBLICAÇÃO 1: Sunscreen formulations containing rice bran or soybean oil: rheological properties, spreadability and <i>in vitro</i> sun protection factor	38
CAPÍTULO 2: Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleos vegetais alternativos: desenvolvimento e estudo <i>in vivo</i> de genotoxicidade	55
2.1 Introdução	56
PUBLICAÇÃO 2: Lipid-core nanocapsules containing alternative vegetable oils: development and <i>in vivo</i> genotoxicity study	57
CAPÍTULO 3: Controle do perfil de liberação de fármaco a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico: influência do tipo de óleo vegetal	79
3.1 Introdução	80
PUBLICAÇÃO 3: Controlling the drug release profile from lipid-core nanocapsules: influence of the type of vegetal oil	81

DISCUSSÃO GERAL.....	96
CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais são produtos naturais compostos essencialmente por substâncias lipídicas, obtidos geralmente por métodos de extração a partir de sementes, frutos ou amêndoas de diversos tipos de plantas. Os óleos vegetais são provedores indispensáveis de ácidos graxos essenciais da dieta básica de nutrientes, pois desempenham funções fundamentais para o bom funcionamento e manutenção do organismo como, por exemplo, constituição de membranas celulares, biossíntese hormonal e reserva de energia (NELSON & COX, 2002). Além dos ácidos graxos, os óleos vegetais apresentam frações lipídicas com funções vitamínicas e antioxidantes (ISMAIL *et al.*, 2004; SIGER *et al.*, 2007).

Compostos com atividade antioxidante são de grande interesse para a indústria farmacêutica, pois os radicais livres estão envolvidos na progressão de doenças hepáticas, cardiovasculares e câncer (LOGUERCIO & FEDERICO, 2003; LOGT *et al.*, 2005; BRUCKDORFER, 2006). Existem diversos estudos na literatura que demonstram o uso de óleos vegetais para a redução dos níveis sanguíneos de lipoproteínas de baixa densidade, que previnem o surgimento de arteriosclerose (AUSMAN *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2007), devido às suas propriedades antioxidante.

Atualmente, há uma tendência mundial da indústria cosmética em desenvolver formulações fotoprotetoras contendo menor concentração de filtros solares de origem sintética e de solventes utilizados para solubilizar essas substâncias, por motivos de segurança para a saúde (VELASCO *et al.*, 2008a; VELASCO *et al.*, 2008b). Além disso, moléculas de origem natural como acetato de tocoferol (vitamina E) e carotenóides auxiliam na proteção da pele contra os efeitos deletérios da radiação solar uma vez que os radicais livres também estão envolvidos no envelhecimento cutâneo e contribuem para o surgimento de doenças e complicações na pele (GHALLAGER & LEE, 2006). Algumas substâncias polifenólicas presentes em óleos vegetais apresentam ação fotoprotetora por possuírem estrutura química similar aos filtros solares sintéticos (VELASCO *et al.*, 2008a; NICHOLS & KATIYAR, 2010). Desta forma, a presença de compostos de origem vegetal em formulações fotoprotetoras pode proporcionar maior segurança quanto ao uso destes produtos por evitar a ocorrência dos possíveis efeitos adversos ocasionados por solventes e/ou filtros solares químicos de origem sintética. Adicionalmente, produtos cosméticos fotoprotetores devem apresentar características físico-química, organolépticas e sensoriais apropriadas para o uso,

de modo que tais fatores são decisivos para a aceitação destes produtos por parte dos usuários (TANNER, 2006).

Os óleos vegetais também podem ser empregados na preparação de sistemas coloidais nanoestruturados, conforme já demonstrado por alguns autores (MOSQUEIRA *et al.*, 2000; SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000; FRIEDRICH *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2010). O tipo de óleo utilizado no preparo desses nanosistemas é geralmente de origem sintética, cujas funções são importantes no seu desenvolvimento (SCHAFAZZICK *et al.*, 2003; CRUZ *et al.*, 2006; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Dentre os sistemas nanoestruturados para uso farmacêutico e cosméticos, destacam-se as nanopartículas poliméricas, que são sistemas coloidais de tamanho submicrométrico amplamente estudados como nanocarreadores de fármacos (KUMARI *et al.*, 2010) e ativos cosméticos (ALMEIDA *et al.*, 2010; PARDEIKE *et al.*, 2009), além de proporcionar vantagens tecnológicas como o aumento da estabilidade de formulações e o controle da liberação de substâncias ativas (CRUZ *et al.*, 2006; OURIQUE *et al.*, 2008). O termo nanopartículas poliméricas abrange nanocápsulas e nanoesferas, sendo que as nanocápsulas apresentam em sua estrutura um núcleo oleoso envolto por uma membrana polimérica ao passo que as nanoesferas caracterizam-se pela ausência de óleo, configurando-se como uma matriz polimérica (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFAZZICK *et al.*, 2003). As nanocápsulas de núcleo lipídico foram desenvolvidas na última década como um novo tipo de nanopartícula polimérica (MÜLLER *et al.*, 2001; JÄGER *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2010). Este tipo de nanocápsula difere das nanocápsulas poliméricas por apresentarem no núcleo uma dispersão de um lipídio sólido em óleo (lipídio líquido). Já as nanoemulsões, que também são sistemas nanocarreadores de fármacos e ativos cosméticos, não apresentam polímero em sua estrutura, constituindo-se em gotículas de óleo estabilizadas por uma combinação de tensoativos (SCHAFAZZICK *et al.*, 2003).

Com o crescente interesse no desenvolvimento de produtos farmacêuticos de base nanotecnológica, cresce também a necessidade de se conhecer os possíveis riscos que os sistemas nanoestruturados podem oferecer para a saúde e o meio ambiente (BARRENA *et al.*, 2009). Para tanto, a avaliação da toxicidade dos nanosistemas através de métodos *in vitro* e *in vivo* é de fundamental importância para garantir a sua segurança. Alguns testes utilizam plantas como modelo de organismos vivos indicadores de toxicidade devido à sua sensibilidade ao entrarem em contato com produtos potencialmente tóxicos (NIEMI & McDONALD, 2004). Um protocolo *in vivo* que utiliza a cebola (*Allium cepa*) como vegetal indicador de efeitos tóxicos é um método bastante empregado para avaliar os riscos à saúde e

ao meio ambiente através da análise cromossômica das células deste vegetal (BARRENA *et al.*, 2009).

A partir do exposto, o presente trabalho foi delineado com o intuito de estudar a viabilidade tecnológica de se utilizar os óleos de arroz, soja e girassol oriundos de produtos agrícolas amplamente cultivados no estado do Rio Grande do Sul (RS), como fonte alternativa de matéria-prima lipídica para a preparação de formulações cosméticas fotoprotetoras e sistemas coloidais nanoestruturados.

A escolha dos óleos vegetais a serem estudados foi realizada levando-se em consideração os índices de produção agrícola disponíveis do RS, em especial da Região Central do estado. De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), a região sul do Brasil é a maior produtora de produtos agrícolas, sendo responsável por mais de 148 milhões de toneladas. O RS é o terceiro maior produtor nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas destacando-se na produção de arroz, soja e de girassol. Segundo o Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA, 2010), a safra de 2010 ficou em torno de 7 milhões de toneladas. A região da Depressão Central foi responsável por 11,3% da safra total de arroz do RS, totalizando 769.497 toneladas. A safra nacional de soja em 2010 foi de 68,5 milhões de toneladas, sendo o RS responsável por cerca de 15% da produção, configurando-se o terceiro maior produtor nacional do grão (IBGE, 2010). Com relação à produção de girassol, a safra rio-grandense é a maior da região sul, estimada para o ano de 2010 em mais de 16 mil toneladas. Ainda de acordo com o IBGE, a produção nacional de girassol ainda é pouco expressiva; contudo, o cultivo de girassol no RS apresenta vantagens como o baixo custo de produção e a eficiente ciclagem de nutrientes do solo.

A obtenção dos óleos de arroz, soja e girassol se dá através de diferentes processos industriais. O óleo de arroz é extraído a partir do farelo de arroz, considerado um subproduto do processo de beneficiamento do grão, que possui teor lipídico em torno de 15-20% (PAUCAR-MENACHO *et al.*, 2007). Entre os ácidos graxos do óleo de arroz destacam-se o palmítico, linoléico e oléico. O óleo de arroz apresenta também em sua composição o γ -orizanol que possui grande poder antioxidante, cuja molécula é inexistente em qualquer outro óleo vegetal (JULIANO *et al.*, 2005; PAUCAR-MENACHO *et al.*, 2007). Já a extração dos óleos de soja e girassol se dá através da prensagem mecânica direta dos grãos, seguida de extração com solvente orgânico (ROSENTHAL *et al.*, 1996). Os óleos de soja e de girassol apresentam quantidade e qualidade semelhantes de ácidos graxos; porém, estes óleos diferem nos componentes responsáveis pela atividade antioxidante: o óleo de soja possui o γ -tocoferol e o óleo de girassol o α -tocoferol (GUPTA, 2002).

Com relação ao ineditismo deste trabalho, até o momento não existem relatos na literatura sobre o preparo de formulações cosméticas fotoprotetoras do tipo gel-creme contendo os óleos de arroz ou de soja e a avaliação da influência que estes produtos de origem vegetal exercem sobre as características físico-químicas e fotoprotetoras da formulação. Também, até o presente não há estudos disponíveis na literatura com relação ao desenvolvimento, caracterização, estudo de liberação de fármaco *in vitro* e avaliação do impacto ambiental de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo os óleos de arroz, soja ou girassol.

OBJETIVO

1.1 Objetivo geral

Estudar a viabilidade tecnológica da utilização de óleos vegetais (óleos de arroz, soja e girassol) oriundos de plantas cultivadas no Rio Grande do Sul como fonte alternativa para obtenção de formulações cosméticas fotoprotetoras e de sistemas coloidais nanoestruturados, visando explorar o potencial de aplicação e agregar valor a estes produtos agrícolas.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do óleo de arroz ou de soja em duas concentrações distintas (3 e 5%) sobre as características físico-químicas (pH, comportamento reológico e espalhabilidade) e o fator de proteção solar *in vitro* em formulações fotoprotetoras do tipo gel-creme contendo benzofenona-3;
- Estudar a viabilidade de obtenção de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo os óleos de arroz, soja e girassol bem como avaliar suas características físico-químicas, estabilidade frente ao armazenamento e segurança ambiental através de um teste *in vivo*;
- Avaliar o controle de liberação *in vitro* de um fármaco modelo (propionato de clobetasol) a partir das nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas a partir dos óleos de arroz, soja e girassol, estudando a sua influência sobre esse parâmetro, bem como quanto as propriedades físico-químicas e estabilidade frente ao armazenamento.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Fotoproteção e formulações fotoprotetoras contendo produtos de origem vegetal

A pele é o maior órgão do corpo humano, responsável por 15-20% do peso total corporal podendo representar em adultos de 1,5-2 m² da superfície externa. A camada cutânea é composta pela epiderme e derme, sendo essa situada mais externamente e, por isso, tem contato direto com o meio ambiente e fatores externos, incluindo a radiação solar (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A radiação solar ultravioleta (UV) divide-se em UVA, que compreende os comprimentos de onda na faixa entre 320-400 nanômetros (nm), UVB (290-320 nm) e UVC (270-290 nm). A radiação UVC é filtrada pela camada de ozônio enquanto que a UVA e UVB ultrapassam essa barreira e, portanto, atingem a superfície terrestre. Além disso, a radiação compreendida na faixa UVA não é filtrada pelo vidro e penetra na pele mais profundamente do que a radiação UVB (KULLAVANNIJAYA & LIM, 2005). A radiação solar é indispensável para a síntese de vitamina D, cujo benefício está associado com a redução da incidência de câncer colorretal especialmente em países situados próximos à linha do equador (GARLAND *et al.*, 2009). Por outro lado, a exposição em excesso à radiação solar UV contribui para o surgimento de doenças de pele e para a progressão do envelhecimento cutâneo (GHALLAGER & LEE, 2006). As radiações UVA e UVB são absorvidas por diversos grupos cromóforos presentes na melanina, moléculas de DNA e RNA, proteínas e lipídios, que resulta em diferentes reações fotoquímicas e interações secundárias que, além de causar danos a estas moléculas, induz a produção de radicais livres (GONZÁLES *et al.*, 2009). Os efeitos da produção de radicais livres estão fortemente relacionados com o envelhecimento precoce cutâneo e com a ocorrência de diversas doenças de pele, incluindo o câncer de pele como a manifestação mais drástica (DREHER & JUNOD, 1996; GHALLAGER & LEE, 2006). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de pele é o de maior incidência no Brasil, sendo que um dos principais fatores atribuídos a este fato é a insuficiente instrução que a população recebe sobre os danos provocados pela radiação bem como a importância da proteção contra a radiação solar (INCA, 2010).

Formulações cosméticas contendo substâncias fotoprotetoras, também reconhecidos como filtros solares, são consideradas uma das melhores formas de prevenir eficazmente os efeitos deletérios ocasionados pela radiação UV. Para serem eficazes na prevenção contra a radiação solar e proteger a pele contra seus efeitos, tais formulações devem impedir que a radiação UV seja transmitida para as células do tecido cutâneo (BENSON, 2008). Estes produtos contêm substâncias que são capazes absorver ou refletir a radiação solar e que se dividem basicamente em duas classes de filtros solares: orgânicos (químicos) e inorgânicos (físicos). Os filtros orgânicos são compostos por moléculas químicas capazes de absorver a radiação UV (geralmente anéis aromáticos) e transformá-la em radiações menores e inofensivas à pele. Esta classe de filtro é amplamente utilizada em formulações fotoprotetoras e subdivide-se de acordo com o espectro de absorção da radiação UV (filtros UVA e UVB). Portanto, para se obter uma proteção eficaz que contemple a todos os comprimentos de onda dentro da radiação UV, é comum que produtos fotoprotetores apresentem em suas formulações combinações de filtros orgânicos (FLOR *et al.*, 2007; LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2007).

Entre os filtros químicos, a benzofenona-3 (BZ3) destaca-se por ser uma das substâncias amplamente utilizadas em formulações cosméticas fotoprotetoras. A BZ3, também conhecida como oxibenzona, Eusolex 4360[®] ou metanona, é aprovada para o uso em formulações cosméticas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo órgão regulador equivalente dos Estados Unidos (Food and Drug Administration - FDA), na concentração máxima de 10% (ANVISA, 2000; FDA, 2010). A BZ3 apresenta boa estabilidade química e absorve eficientemente ambas as radiações UVA e UVB. Entretanto, a BZ3 não possui adequada solubilidade em água (0.004 mg.ml^{-1}), o que exige muitas vezes o emprego de solventes para que seja solubilizada e então associada em formulações fotoprotetoras principalmente para a preparação de formas não-emulsionadas (TANNER, 2006).

Os filtros solares inorgânicos são compostos formados por metais como o dióxido de titânio ou óxido de zinco. Ao contrário dos filtros orgânicos, estes compostos refletem e/ou espalham a radiação UV por serem partículas metálicas extremamente pequenas e finamente distribuídas na pele. O tamanho de partícula dos filtros inorgânicos é de extrema importância visto que este tipo de filtro solar estando em dimensões microscópicas forma uma película de aparência opaca sobre a pele, o que pode ser esteticamente desagradável e indesejável (FLOR *et al.*, 2007; LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2007). Esse aspecto desagradável tem sido

revertido pela sua cominuição destas partículas até a escala nanométrica (WANG & MUHAMMED, 1999).

O fator de proteção solar (FPS) é o valor universal que mede a eficácia de um produto fotoprotetor contra a radiação solar, o qual indica quantas vezes o tempo de exposição ao sol, sem risco de eritema, pode ser aumentado com o uso do protetor. Como a radiação UVB é responsável por causar eritema na pele, um filtro eficaz é aquele capaz de proteger a pele exposta contra a queimadura solar. Por esse motivo, é importante ressaltar que o FPS é definido em função da radiação UVB (FLOR *et al.*, 2007). Conforme o Ministério da Saúde, o valor de FPS varia entre 6 a 100 e classifica os produtos fotoprotetores nas categorias de baixa proteção (6,0 – 14,9), média proteção (15,0 – 29,9), alta proteção (30,0 – 49,9) e muito alta proteção (maior ou igual a 50 e menor que 100) (BRASIL, 2010). A determinação do FPS é realizada através de estudos *in vivo* que são de longa duração e que envolvem no mínimo 20 indivíduos. Um método *in vitro* proposto por Mansur e colaboradores (1986) correlaciona a determinação do FPS em humanos com os resultados obtidos *in vitro* através de espectrofotometria no UV. Neste método mede-se a capacidade de absorbância do(s) filtro(s) solar(es) contidos em uma solução diluída em álcool a partir da formulação fotoprotetora em vários comprimentos de onda. A espectrofotometria utilizada neste teste faz com que o método seja rápido, eficaz e evita o envolvimento de voluntários, podendo ser uma ótima ferramenta para o *screening* inicial das formulações. Ferrari e colaboradores (2007) determinaram o FPS de uma formulação fotoprotetora utilizando o método *in vitro* proposto por Mansur e um método *in vivo*. Os resultados de FPS encontrados entre os métodos utilizados não apresentaram diferença estatística significativa, demonstrando que esta técnica *in vitro* pode ser correlacionada com um método *in vivo*. A determinação do FPS para a radiação UVA não é frequentemente avaliado para fins comerciais por uma questão de legislação, cujo teste exigido para comercialização é unicamente determinação *in vivo* da proteção contra o surgimento de eritema, que é uma resposta biológica provocado pela radiação UVB. Comparando-se com as radiações UVB e UVA, a capacidade de causar eritema desta é mínima, porém penetra mais profundamente na pele sendo responsável por possíveis reações imunes e também por produzir radicais livres (KULLAVANNIJAYA & LIM, 2005; FLOR *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008). Por esses motivos atualmente há a necessidade de também determinar o FPS na região UVA.

Além de eficácia comprovada através do FPS, a formulação de um fotoprotetor exige a observação de outros fatores responsáveis pelo sucesso na obtenção do produto. A segurança das formulações fotoprotetoras é um tema que vem sendo bastante discutido devido à grande

ocorrência de reações adversas ocasionadas por filtros solares (NASH, 2006). Conforme citado anteriormente, é absolutamente comum formulações fotoprotetoras conterem combinações de filtros solares, uma vez que dificilmente é possível alcançar um bom FPS que abranja todo o espectro de radiação UV dispondo-se somente de um filtro solar (NOHYNEK & SCHAEFER, 2001). Entretanto, essa prática pode resultar em um produto com baixa segurança, uma vez que somente uma única substância fotoprotetora pode ocasionar reações indesejáveis de pele (GASPAR & CAMPOS, 2006; KARLSSON *et al.*, 2009). Outros componentes também utilizados no preparo de produtos fotoprotetores como solventes, conservantes e emolientes também podem ser responsáveis por reações adversas como alergias e dermatites (CASTANEDO-TARDAN & ZUG, 2009; LAGUNA *et al.*, 2009).

Nesse contexto, existe atualmente uma tendência mundial no desenvolvimento de formulações cosméticas fotoprotetoras que contenham uma concentração reduzida de filtros solares sintéticos e solventes, sendo estes substituídos por produtos de origem vegetal (VELASCO *et al.*, 2008a; VELASCO *et al.*, 2008b). Além disso, alguns destes produtos apresentam em sua composição moléculas bioativas que conferem atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e de proteção ao DNA das células cutâneas, o que agrega valor ao produto e justifica ainda mais o seu uso em formulações de fotoprotetoras (AFAQ, 2010; NICHOLS & KATYAR, 2010).

Alguns estudos disponíveis na literatura sobre o potencial uso de produtos de origem vegetal em formulações fotoprotetoras têm demonstrado bons resultados, confirmando essa tendência. Turkoglu e Cigirgil em 2007 estudaram o perfil de absorção UV *in vitro* de extratos aquoso e alcoólico a partir do chá preto (*Camellia sinensis*). Ambos os extratos apresentaram alta absorção da radiação. Porém, o extrato aquoso apresentou uma melhor absorção em comparação com o extrato alcoólico sendo por esse motivo utilizado como solvente para preparação de géis de Carbopol. Os géis foram então testados quanto ao potencial de proteção frente a radiação UV produzida artificialmente em seis indivíduos, onde não foi observado eritema em nenhuma das pessoas submetidas ao teste. Os autores atribuíram este efeito protetor a presença de polifenóis no extrato aquoso do chá preto e ainda sugerem que o gel contendo o extrato aquoso de chá preto pode ser uma alternativa eficiente e econômica para evitar os efeitos da radiação UV.

Perugini e colaboradores em 2008 avaliaram a eficácia de um composto fenólico presente nas folhas e no óleo da oliveira (oleopreína) frente a radiação UVB. Neste caso, foram desenvolvidas formulações (emulsões e géis-creme) contendo oleopreína e testadas em voluntários submetidos à radiação UVB artificial, onde o potencial de proteção foi avaliado

através da observação de formação do eritema. As formulações contendo o composto fenólico apresentaram proteção ao surgimento de eritema independente da forma farmacêutica, cujo mecanismo de ação foi relacionado à capacidade da oleopreína em combater espécies reativas de nitrogênio, incluindo o óxido nítrico, que estão envolvidos em processos inflamatórios. Ainda no mesmo trabalho foi comprovada a atividade antioxidante da oleopreína através de um teste *in vitro*.

Velasco e colaboradores (2008a) desenvolveram e avaliaram o potencial de fotoproteção de emulsões contendo rutina, extratos de maracujá (*Passiflora incarnata* L.) e de “transagem” (*Plantago lanceolata*) associados ou não com filtros orgânicos (BZ3 e etilhexil metoxinamato- EHMC) e inorgânico (dióxido de titânio), que compreendem os espectros de radiação UVA e UVB. As formulações foram aplicadas em uma membrana que mimetiza a superfície da pele humana, conforme proposto por Diffey e colaboradores (2000) e o FPS foi avaliado por um método *in vitro*. Para fins comparativos, formulações controle contendo somente os filtros sintéticos em alta e baixa concentração também foram preparadas. Os valores de FPS variaram aproximadamente entre 0,9 e 28, sendo que as formulações contendo os três filtros sintéticos associados com a rutina ou com o extrato de *Plantago lanceolata* apresentaram FPS de 27 e 28, respectivamente. Estes resultados demonstram que houve um efeito sinérgico entre os produtos de origem vegetal com os filtros solares sintéticos visto que as formulações controle de alta e baixa concentração apresentaram valores de FPS de 24 e 17, respectivamente. A similaridade entre a estrutura química das moléculas bioativas utilizadas neste estudo e os filtros sintéticos podem explicar o efeito sinérgico encontrado. Porém os autores admitem que o mecanismo dessa interação seja complexo e envolve interações químicas ainda não totalmente elucidadas.

Em outro estudo semelhante realizado pelo mesmo grupo de pesquisa foi avaliada a obtenção e avaliação da eficácia *in vitro* de formulações fotoprotetoras (emulsões óleo em água) contendo extrato de rutina na concentração de 0,1%, associada ou não a filtros solares orgânicos de espectro UVA e UVB (*p* - metoxinamato de octila - MCO e BZ3). Formulações sem o composto bioativo também foram preparadas para fins comparativos, contendo ambos os filtros sintéticos na mesma formulação em alta (MCO e BZ3 a 7 e 2%) e baixa (MCO e BZ3 a 3,5 e 1%) concentrações. A formulação contendo somente rutina teve um FPS em torno de 1 e as formulações de baixa e alta concentração de filtros solares sintéticos, apresentaram FPS médio de 7 e 14. Por outro lado, as formulações de baixa e alta concentração de filtros solares sintéticos contendo rutina, tiveram FPS de 9 e 14. O estudo demonstrou que a rutina reagiu sinérgicamente com os filtros solares químicos nas concentrações mínimas. As

formulações de concentração máxima contendo ou não o composto bioativo não apresentaram diferença significativa, demonstrando que o efeito protetor da associação do flavonóide depende da concentração dos filtros orgânicos. Os autores também atribuíram ao efeito sinérgico o fato de que a rutina apresenta estrutura química semelhante aos filtros químicos (VELASCO *et al.*, 2008b).

Outros fatores importantes no desenvolvimento de um produto fotoprotetor incluem as propriedades físico-químicas e o comportamento reológico da formulação. Embora o ato de aplicar um produto fotoprotetor pareça simples, isto representa um ponto crítico na eficiência da formulação. A topografia da superfície da pele é bastante irregular, o que pode resultar no acúmulo ou a não cobertura pelo produto fotoprotetor em regiões dérmicas pouco uniformes (TANNER, 2006). Para tanto, formulações fotoprotetoras devem apresentar características reológicas e de espalhabilidade adequadas de maneira que ao serem aplicadas forme uma camada de natureza filmógena e proporcione a cobertura uniforme sobre a pele. Além disso, o estudo dessas características é uma importante ferramenta que permite conhecer quais são os componentes mais adequados para a formulação e a influência que cada um deles exerce sobre esta (LEE *et al.*, 2009).

Como qualquer outro produto cosmético, o aspecto e as características sensoriais de uma formulação fotoprotetora também são muito importantes e que fazem diferença no momento da escolha e aceitação de um protetor solar pelos usuários. De uma forma geral, as formulações que apresentam homogeneidade e que proporcionam um sensorial menos untuoso possível são preferidos pela população (TANNER, 2006). As formulações fotoprotetoras preparadas com base em géis hidrofílicos apresentam vantagens sobre as outras formas como emulsões e loções, por possuírem baixo teor de lipídios e maior conteúdo aquoso. Por outro lado, para manter a transparência característica deste tipo de formulação é necessário que os filtros solares sejam hidrofílicos. Como a grande maioria dos filtros solares é lipofílica, existe a necessidade de se utilizar solventes para solubilizar os mesmos. Ressalta-se também que não é aconselhável incluir filtros físicos neste tipo de forma farmacêutica, pois além do aspecto opaco, as partículas desta classe de filtro solar podem formar aglomerados e, assim, comprometer a eficácia da formulação (FLOR *et al.*, 2007).

A partir do exposto, justifica-se o emergente desenvolvimento de formulações cosméticas fotoprotetoras contendo produtos de origem vegetal. Até o momento não existem estudos na literatura sobre o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras contendo os óleos de arroz ou de soja que demonstrem a influência destes produtos de origem vegetal sobre as características físico-químicas, comportamento reológico, espalhabilidade e FPS *in*

vitro. Adicionalmente, os estudos disponíveis na literatura que demonstram a atividade antioxidante de moléculas presentes nos óleos de arroz ou de soja, também justificam o uso destes óleos no preparo de formulações cosméticas fotoprotetoras (JULIANO *et al.*, 2005; SIGER *et al.*, 2007).

1.2 A nanociência e sistemas nanocarreadores de fármacos

A nanociência é considerada uma ciência emergente devido aos avanços significativos que tem apresentado em diversas áreas do conhecimento. Com a possibilidade de manipular átomos e materiais na escala nanométrica, esta ciência revelou uma nova dimensão para a pesquisa e o desenvolvimento de produtos inovadores. No âmbito das ciências farmacêuticas, a nanociência e a nanotecnologia têm sido principalmente utilizadas para o desenvolvimento de sistemas coloidais nanoestruturados capazes de controlar a liberação de fármacos ou de substâncias ativas de uso cosmético (MIYAZAKI & ISLAM, 2007). Além disso, esses nanocarreadores possuem a capacidade de carrear fármacos do local de administração até o alvo específico de ação sem comprometer sua integridade, uma vez que os protegem dentro de vesículas, nanocápsulas ou nanoesferas, dependendo do método de preparação. O processo de carrear fármacos requer que esses nanosistemas transponham barreiras fisiológicas e que resistam a fluidos biológicos, o que representa um grande desafio no desenvolvimento destes produtos. Para tanto, existem mecanismos que permitem aumentar a especificidade entre a nanopartícula e o sítio de ação, como por exemplo, a associação de moléculas capazes de ligarem-se especificamente a um receptor no tecido alvo de ação, para que ocorra um aumento no índice terapêutico (ALONSO, 2004; COVREUR & VAUTHIER, 2006).

A aplicação da nanotecnologia no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada tem sido amplamente estudada para administração de diversas substâncias ativas através de diferentes vias como a intravenosa, ocular ou dérmica, indicando a versatilidade de aplicação dos nanosistemas (ALONSO, 2004). Essa característica traduz-se nos estudos sobre sistemas nanoparticulados desenvolvidos para o tratamento de doenças com etiologias completamente diferentes, porém utilizando-se a mesma tecnologia (KAWASAKI & PLAYER, 2005; LINASAZORO, 2008; SANTOS-MAGALHÃES & MOSQUEIRA, 2010). Além disso, a veiculação de fármacos em sistemas nanoestruturados proporciona outras

vantagens como o aumento da estabilidade e biodisponibilidade e a redução de reações adversas (OURIQUE *et al.*, 2008; BERNARDI *et al.*, 2009).

Entre os sistemas nanoestruturados estudados para a liberação de fármacos incluem-se os lipossomas, as nanopartículas de lipídio sólido, as nanopartículas poliméricas e as nanoemulsões, cada um com suas particularidades. Os lipossomas representam a primeira geração de carreadores coloidais, sendo estruturas formadas a partir de membranas fosfolipídicas organizadas em uma ou mais bicamadas concêntricas em torno de um núcleo aquoso. Devido ao caráter anfifílico dos fosfolipídios e sua organização em estruturas fechadas, os lipossomas podem encapsular moléculas hidrofóbicas na membrana da bicamada e/ou compostos hidrofílicos na cavidade aquosa interna. Entretanto, dificuldades de transposição de escala, limitada estabilidade físico-química e o alto custo de formulação são as maiores barreiras para a produção de lipossomas (GABRIELLE-MADELMONT *et al.*, 2003; JOSHI & MÜLLER, 2008).

As nanopartículas poliméricas abrangem dois tipos de partículas, nanocápsulas e nanoesferas, que consistem em sistemas reservatórios contendo um núcleo oleoso envolto por uma membrana polimérica ou unicamente uma matriz polimérica, respectivamente (KUMARI *et al.*, 2010). Recentemente, um novo tipo de nanopartícula polimérica foi descrita na literatura, chamada de nanocápsulas de núcleo lipídico. Estas se caracterizam por apresentar um núcleo composto pela dispersão de um lipídio sólido em um lipídio líquido também envolto por uma membrana polimérica (JÄGER *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2010). Além disso, nanopartículas poliméricas podem ser compatíveis com tecidos e células se preparadas a partir de materiais poliméricos que sejam biocompatíveis ou biodegradáveis (ZHANG *et al.*, 2008). Outras vantagens das nanocápsulas poliméricas incluem a alta eficiência de encapsulação especialmente de fármacos hidrofóbicos devido a natureza lipofílica do núcleo, menor conteúdo de material polimérico em relação a outros sistemas poliméricos nanoparticulados (nanoesferas) e a proteção de substâncias ativas contra agentes de degradação extrínsecos, como a luz (OURIQUE *et al.*, 2008; FONTANA *et al.*, 2009; FONTANA *et al.*, 2010).

As nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas como nanocarreadores alternativos aos lipossomas e as nanopartículas poliméricas, cuja matriz é formada por lipídios. A estrutura das nanopartículas lipídicas caracteriza-se pelo núcleo formado por um lipídio sólido, líquido ou a mistura destes recoberto por fosfolipídios. Este tipo de nanopartícula é amplamente estudado na área dermatológica e cosmética e apresenta a vantagem de transposição de escala através da homogeneização à alta pressão (JOSHI & MÜLLER, 2008;

PARDEIKE *et al.*, 2009). As nanoemulsões, por sua vez, são formadas por gotículas de óleo estabilizadas por tensoativos e sua principal característica é a relativa estabilidade física das gotículas na dispersão, devido ao seu tamanho submicrométrico (SNITOWSKA *et al.*, 2001).

As suspensões coloidais de nanopartículas poliméricas, um dos focos deste estudo, são sistemas dispersos complexos devido ao seu tamanho de partícula extremamente pequeno, sendo altamente sensíveis a fenômenos de instabilidade. Os fenômenos de instabilidade que ocorrem frequentemente nos sistemas nanoparticulados são a migração de partículas (cremagem, sedimentação), variação do tamanho particular devido à agregação, formação de aglomerados ou fusão de uma ou mais partículas (floculação, coalescência). Para evitar esses fenômenos e outros efeitos indesejáveis, a determinação dos parâmetros físico-químicos e de estabilidade das suspensões coloidais é de fundamental importância para o entendimento da estrutura na forma molecular. Além disso, o conjunto de informações obtidas através destes estudos proporciona a compreensão do comportamento e a influência de cada componente sobre diferentes características e propriedades da formulação. As técnicas de análise que permitem o conhecimento dos principais parâmetros físico-químicos das suspensões nanoestruturada incluem análise morfológica, distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta e pH. A determinação de fármaco associado às nanoestruturas e os estudos de cinética de liberação de fármacos também são parâmetros a serem determinados nas formulações que apresentam fármaco em sua constituição (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

De maneira geral, as nanopartículas poliméricas obtidas através dos diferentes métodos apresentam distribuição de tamanho de partícula unimodal com baixo índice de polidispersão. O método usual para a determinação do tamanho de partícula é o da espectroscopia de correlação de fótons. A microscopia eletrônica (transmissão ou varredura) também pode ser utilizada para determinar o tamanho particular, o que também pode fornecer uma imagem da nanoestrutura (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Uma partícula quando entra em contato com outro meio atrai cargas elétricas de polaridade inversa às que possui na sua superfície, formando, portanto, duas camadas eletricamente carregadas. O potencial zeta reflete a diferença de potencial elétrico resultante do contrabalanceamento destas camadas elétricas, cujo valor está diretamente relacionado com a estabilidade física das suspensões coloidais. Um alto valor de potencial zeta (em módulo) indica maior repulsão entre as partículas, o que previne a suspensão coloidal da ocorrência de fenômenos físicos de instabilidade como aglomeração, floculação e coalescência. Por outro lado, outros mecanismos também podem ser responsáveis pela estabilização das partículas em

suspensão, como a estabilização estérica, pelo emprego de tensoativos e polímeros hidrofílicos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

A determinação do pH das suspensões coloidais pode ser realizada através da imersão de um eletrodo potenciométrico diretamente nas suspensões. O pH é bastante importante no acompanhamento das suspensões em função do tempo, sendo informação relevante nos estudos de estabilidade. Alterações no valor de pH podem indicar a degradação do material polimérico de nanopartículas ou ionização de grupos carboxílicos, cujo efeito ocorre por conta da dinâmica interação entre o meio (comumente a água) e o polímero da superfície da partícula (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Para a determinação da concentração de fármaco associado às nanopartículas é necessário o uso de técnicas que promovam a separação da fração livre de fármaco do conteúdo encapsulado. Uma técnica usual consiste na separação destas partes por um procedimento de ultrafiltração/centrifugação, que utiliza uma membrana com porosidade da ordem de 10 kDa para separar o meio da suspensão coloidal. A quantidade do fármaco livre é determinada no ultrafiltrado e a fração associado às nanopartículas é resultante da diferença entre as quantidades de fármaco livre e total (FONTANA *et al.*, 2009; FONTANA *et al.*, 2010).

Para os sistemas nanoestruturados contendo fármaco são adicionalmente conduzidos estudos de cinética de liberação *in vitro* a partir das nanopartículas. Duas técnicas são majoritariamente utilizadas: a difusão em sacos de diálises e a ultracentrifugação ou ultrafiltração-centrifugação (SOPPIMATH *et al.*, 2000). O perfil de liberação do fármaco a partir das suspensões é dependente do tipo de partícula visto que o fármaco pode estar retido ou adsorvido na superfície da partícula ou dissolvido ou disperso dentro da cavidade oleosa, dependendo da estrutura supramolecular da partícula. Adicionalmente, o perfil de liberação também é influenciado pela forma com que o fármaco é liberado da nanopartícula, podendo ser através da dessorção do fármaco adsorvido na superfície da partícula, da difusão do fármaco através da matriz/parede polimérica, da erosão do material polimérico ou ainda uma combinação destes eventos (SOPPIMATH *et al.*, 2000; CRUZ *et al.*, 2006, FONTANA *et al.*, 2009, FONTANA *et al.*, 2010). Ainda, a presença e a viscosidade do óleo no interior da cavidade das nanocápsulas podem também controlar a liberação do fármaco (CRUZ *et al.*, 2006; ABDEL-MOTTALEB *et al.*, 2010). Com a finalidade de conhecer melhor a influência de cada componente da formulação e da nanoestrutura, os resultados obtidos nos estudos de cinética podem ser tratados com modelos matemáticos a fim de estabelecer o perfil de liberação (CRUZ *et al.*, 2006; FONTANA *et al.*, 2009, FONTANA *et al.*, 2010).

1.3 Preparações de nanocápsulas poliméricas

Um dos métodos de preparação de nanocápsulas poliméricas é o da deposição interfacial do polímero pré-formado, proposto por Fessi e colaboradores em 1988. Através deste método as nanocápsulas poliméricas são obtidas como uma suspensão coloidal formada a partir de uma fase orgânica e uma fase aquosa. A fase orgânica composta por um tensoativo de baixo valor de EHL (equilíbrio hidrófilo/lipófilo), óleo, solvente, polímero e eventualmente um fármaco de característica hidrofóbica é injetada sob agitação na fase aquosa contendo um tensoativo de alto EHL. Quando a fase orgânica é injetada adequadamente na fase aquosa, o solvente orgânico difunde para a água gerando uma turbulência interfacial (óleo/água) e o polímero precipita em torno das gotículas de óleo, formando assim as nanocápsulas poliméricas (FESSI *et al.*, 1988).

As nanocápsulas de núcleo lipídico foram desenvolvidas na última década como um novo tipo de partícula. Esse tipo de nanoestrutura difere das nanocápsulas poliméricas anteriormente descritas por apresentarem em seu núcleo uma dispersão de um lipídio sólido em óleo (lipídio líquido) envolto por uma membrana polimérica. O método de preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico é semelhante àquele utilizado para preparar nanocápsulas poliméricas, porém com a substituição do tensoativo da fase orgânica por um tensoativo sólido (monoestearato de sorbitano), que fica disperso no óleo (triglicerídeos de cadeia média) situado interior da cavidade polimérica. Desta forma são obtidas partículas com características distintas, principalmente quanto ao seu núcleo (MÜLLER *et al.*, 2001; JÄGER *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2010).

Os óleos utilizados na preparação de nanocápsulas poliméricas são em geral de origem sintética que possuem funções importantes como solubilizar substâncias ativas, melhorar a estabilidade das formulações, aumentar a eficiência de encapsulação bem como controlar a liberação do fármaco a partir dos nanosistemas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O óleo também deve ser atóxico e, no caso das nanopartículas poliméricas, não reagir com o polímero a fim de manter a integridade da nanoestrutura. Os óleos sintéticos obtidos a partir da mistura de triglicerídeos de cadeia média (TCM) são amplamente utilizados no preparo de nanocápsulas poliméricas devido a sua capacidade de solubilizar uma grande variedade de fármacos e substâncias ativas (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010) e por apresentar boa compatibilidade com os materiais poliméricos usualmente empregados. Embora os óleos de origem vegetal não sejam frequentemente utilizados no preparo desses nanosistemas, isto não

é indicativo de que formulações preparadas com óleos vegetais não apresentem bons resultados. Alguns estudos disponíveis na literatura demonstram o uso de óleos vegetais no preparo de nanopartículas poliméricas.

Os óleos de soja e de girassol foram utilizados para preparar nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas a partir do copolímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo penicilina, conforme relatado por Santos-Magalhães e colaboradores em 2000. As formulações apresentaram características físico-químicas dentro da faixa nanométrica e estabilidade de até quatro meses. Mosqueira e colaboradores (2000) avaliaram a influência do tipo de óleo no preparo de nanocápsulas poliméricas, incluindo o óleo de soja, a partir do polímero poli(ácido láctico) (PLA).

Em outro estudo, Friedrich e colaboradores (2008) utilizaram o óleo de girassol com o objetivo de melhorar a eficiência de encapsulação do fármaco dexametasona em nanocápsulas utilizando a poli(ϵ -caprolactona) como polímero. O óleo de girassol não alterou o índice de encapsulação do fármaco, porém ficou demonstrada a viabilidade de utilizar este óleo vegetal no preparo de nanocápsulas poliméricas. Ourique e colaboradores em 2008 também utilizaram óleo de girassol para preparar nanocápsulas poliméricas contendo tretinoína, a fim de aumentar a fotoestabilidade do fármaco. A tretinoína é um dos compostos mais utilizados na atualidade contra os efeitos do envelhecimento precoce da pele e para o tratamento de diversas doenças de pele como acne, ictiose e psoríase; porém, a molécula da tretinoína é muito instável frente aos efeitos da luz. O estudo demonstrou que as nanocápsulas poliméricas preparadas contendo o óleo de girassol protegeram eficientemente o fármaco contra os efeitos de degradação da luz e, além disso, os autores sugerem a formulação pode ser incorporada em formas farmacêuticas semissólidas para uso tópico.

Os óleos de semente de uva e de amêndoas doce foram utilizados no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados visando uso cosmético por Almeida e colaboradores em 2009. Foram preparadas nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões utilizando estes dois óleos como núcleo e empregando BZ3 como substância ativa modelo. A BZ3 foi eficientemente associada em ambos os sistemas nanoestruturados independente do tipo de óleo vegetal utilizado. A associação da BZ3 aos sistemas nanoestruturados não alteraram significativamente as propriedades físico-químicas, cujos resultados permaneceram adequados por até seis meses após o preparo. Ainda neste estudo, as nanocápsulas e nanoemulsões foram submetidas a um estudo de fotoestabilidade onde foi demonstrado que os dois tipos de nanoestruturas auxiliam a retardar a degradação da BZ3 provocada pela radiação UV.

Em outro estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa em 2010 foi também avaliada a fotoestabilidade e a atividade antioxidante *in vitro* de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo rutina, preparadas utilizando o óleo de sementes de uva, como componente da fase oleosa destas formulações. Os resultados demonstraram que a rutina associada a ambos os tipos de nanopartículas apresentou menores taxas de fotodegradação em relação a uma solução etanólica de rutina. Os autores sugeriram que tais formulações podem ser aproveitadas para desenvolver produtos farmacêuticos de uso cosmético para o tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, incluindo o envelhecimento cutâneo ocasionado por radicais livres.

Os estudos até então relatados demonstram as potencialidades de alguns óleos vegetais no preparo de formulações de base nanotecnológica como carreadores de diversas substâncias ativas. Tendo estes estudos como base, os óleos de arroz, soja e girassol foram utilizados no estudo de fontes alternativas no preparo de nanocápsulas de núcleo lipídico. Até o momento não existem estudos disponíveis na literatura sobre nanocápsulas de núcleo lipídico contendo estes óleos vegetais, tampouco sobre a caracterização físico-química e estudos de liberação de fármaco *in vitro* a partir desses nanosistemas.

1.4 Sistemas nanoestruturados e o impacto ambiental

O desenvolvimento de produtos de uso farmacêutico e cosmético com base em nanotecnologia vem crescendo em um ritmo acelerado, com resultados bastante promissores, conforme comentado anteriormente. Atualmente, um tema que vem sendo bastante discutido são os riscos que nanopartículas podem oferecer ao meio ambiente. Por isso, o conhecimento dos mecanismos subjacentes da interação entre nanopartículas e sistemas biológicos através de estudos *in vivo* é de fundamental importância para garantir que o uso de nanopartículas seja realizado de forma segura, sem causar qualquer impacto ambiental significativo (BARRENA *et al.*, 2009; BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA *et al.*, 2009).

A nanotecnologia pode ser conceituada como a ciência envolvida no desenvolvimento, síntese, caracterização e aplicação funcional de sistemas com tamanho de partícula dimensionado na escala nanométrica (SAHOO *et al.*, 2007). Os principais motivos que levam a condução de estudos sobre riscos ambientais e para a saúde são o tamanho extremamente pequeno de partícula e a diversidade de matérias-primas que podem ser utilizadas na síntese

destes sistemas, uma vez que pode ocorrer o acúmulo e alterações em sistemas biológicos por estes sistemas, conforme já demonstrado em alguns estudos (NOWACK & BUCHALI, 2007).

O uso de plantas como indicadores biológicos para avaliar a toxicidade de produtos é bastante eficiente devido a sensibilidade destes organismos ao entrarem em contato com algum produto tóxico (NIEMI & McDONALD, 2004). A cebola (*Allium cepa*) é um vegetal utilizado para estudos de toxicidade através da análise das alterações genéticas das células das raízes deste vegetal, após entrarem em contato com algum produto que potencialmente ofereça riscos à saúde e ao meio ambiente. Esse é um teste padronizado rotineiramente indicado como um eficiente organismo-teste para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de produtos por possuir crescimento rápido da raiz, reduzido número de cromossomos, fácil visualização e por apresentar um grande número de células em divisão (FISKEJÖ, 1985; KNOLL *et al.*, 2006; FACHINETTO *et al.*, 2007).

Kumari e colaboradores (2009) estudaram os efeitos citotóxicos e genotóxicos de nanopartículas de prata através do teste que utiliza *Allium cepa* como indicador de genotoxicidade. A atividade antimicrobiana deste tipo de nanopartícula está sendo investigada para o uso em produtos cosméticos como desodorantes e em soluções de limpeza. Os autores concluíram que as nanopartículas de prata podem interagir com componentes intracelulares, causando danos à divisão celular, incluindo aberrações celulares. Além disso, esse teste também foi utilizado para avaliar a atividade antiproliferativa de fármacos encapsulados em comparação com o fármaco na forma livre, por Fachinetto e colaboradores em 2008. As formulações contendo fármaco associado às nanoestruturas apresentaram uma diminuição significativa do índice mitótico em comparação com os fármacos não encapsulados, demonstrando, portanto, que a encapsulação dos fármacos em nanopartículas poliméricas apresenta um aumento na atividade antiproliferativa *in vivo*, empregando modelo vegetal.

Os estudos sobre nanotoxicologia ainda são escassos e existem muitas dúvidas com relação à segurança de nanosistemas pela sociedade em geral, sendo que toda a contribuição científica sobre este assunto deve ajudar a regulamentar o uso e o desenvolvimento de produtos farmacêuticos com base em nanotecnologia. Levando em contas estas considerações, este trabalho também avaliou os possíveis riscos ambientais dos nanosistemas desenvolvidos neste trabalho através de um estudo *in vivo* de genotoxicidade. O protocolo *in vivo* escolhido como indicador biológico de genotoxicidade utiliza a cebola como organismo vivo e apresenta além das vantagens já mencionadas a facilidade de utilizar as suspensões de nanocápsulas preparadas sem a necessidade de diluição prévia.

CAPÍTULO 1: Formulações fotoprotetoras contendo óleo de arroz ou de soja: propriedades reológicas, espalhabilidade e fator de proteção solar *in vitro*

CAPÍTULO 1: Formulações fotoprotetoras contendo óleo de arroz ou de soja: propriedades reológicas, espalhabilidade e fator de proteção solar *in vitro*

1.1 Introdução

O uso de formulações cosméticas fotoprotetoras proporciona proteção contra os efeitos deletérios provocados pela radiação solar incluindo eritema e câncer de pele. Além disso, a exposição excessiva a radiação solar induz a produção de radicais livres, cujos efeitos estão relacionados com o envelhecimento cutâneo (GALLAGHER & LEE, 2006). Entre os diversos tipos de filtros solares químicos, a BZ3 é a mais utilizada no preparo de formulações fotoprotetoras, aprovada pela ANVISA na concentração de 10% (ANVISA, 2000). Produtos de origem vegetal que apresentam atividade antioxidante são de grande interesse no desenvolvimento de formulações fotoprotetoras. Adicionalmente, compostos naturais bioativos que possuem estrutura química similar aos filtros solares sintéticos são capazes de absorver a radiação solar sendo um agente fotoprotetor natural (VELASCO *et al.*, 2008a; VELASCO *et al.*, 2008b). Os óleos de arroz e de soja apresentam em sua composição compostos com funções antioxidantes, justificando o uso destes produtos em formulações fotoprotetoras (JULIANO *et al.*, 2005; SIGER *et al.*, 2007). Além disso, estes óleos podem auxiliar no preparo destas formulações ao solubilizar substâncias sintéticas, o que permite reduzir a concentração de solventes orgânicos e ao mesmo tempo melhorar as características físico-químicas do produto. A escolha da forma farmacêutica e a avaliação das características físico-químicas também são de fundamental importância uma vez que estes fatores são fundamentais no momento da escolha de um produto fotoprotetor pelos usuários. Geralmente, géis hidrofílicos e géis-creme são muitas vezes as formas farmacêuticas preferidas por apresentarem menor teor de lipídios e aspecto menos untuoso (TANNER, 2006).

Até o momento não existem trabalhos que demonstrem a associação dos óleos de arroz ou de soja em formulações fotoprotetoras. Portanto, este capítulo descreve o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras do tipo gel-creme contendo os óleos de arroz ou de soja e a avaliação das características físico-químicas, comportamento reológico e espalhabilidade da formulação fotoprotetoras utilizando a BZ3 como filtro solar sintético. Neste capítulo também é abordado o estudo *in vitro* da influência destes óleos no FPS da formulação.

PUBLICAÇÃO 1: Sunscreen formulations containing rice bran or soybean oil:
rheological properties, spreadability and *in vitro* sun protection factor

Artigo aceito para publicação no periódico Latin American Journal of Pharmaceutics

Sunscreen formulations containing rice bran or soybean oil: rheological properties, spreadability and *in vitro* sun protection factor

Lucas A. Rigo¹; Roberta H. Rascovetzki²; Ruy C. R. Beck^{3*}

¹ *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

² *Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

³ *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 91600-000, Porto Alegre, RS, Brazil*

* Corresponding author:

Ruy C. R. Beck

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3308-5951 Fax: +55 51 3308-5090. e-mail: ruy.beck@ufrgs.br

Abstract

The presence of rice bran or soybean oil at different concentrations (3 and 5 %) in gel-creams containing benzophenone-3 (BZ-3) was evaluated. Gel-creams were prepared with Carbopol Ultrez[®] (polymer) at 0.5 % (w/w). The influence of rice bran or soybean oil was evaluated on the pH values, rheological behavior, spreadability and *in vitro* sun protection factor (SPF). All formulations showed a cream-like aspect and pH between 6.5 and 7.0. Rheological analysis showed pseudoplastic Non-Newtonian behavior for all formulations according to the Herschel-Bulkley model, regardless of the presence of the oil. However, formulations containing BZ-3 showed higher shear rates and smaller spreadability factors than blank formulations. On the other hand, formulations with higher concentration of vegetable oil showed higher spreadability factors and smaller shear rates than formulations without it. The presence of oil showed no influence on the SPF values of gel-creams.

Key-words: Benzofenone-3, Gel-cream, Rice bran oil, Soybean oil, Vegetable oils.

1. INTRODUCTION

Skin exposure to sun radiation (ultraviolet radiation) can generate several complications such as erythema (sunburn), immunosuppression, or skin cancer^{1,2}. UV exposition is largely responsible for producing reactive oxygen species (ROS) damaging the antioxidant system of the skin tissue and therefore promoting photoaging³. Such complications depend on the time of exposure, age, skin type, and genetic predisposition. On the other hand, it is known that the moderate skin exposure to UV radiation is essential in the synthesis of vitamin D⁴.

In this context, cosmetic sunscreen formulations have been developed to protect the skin from the deleterious effects of UV exposure^{5,6}. Several studies have shown a decrease in the number of skin diseases caused by sun radiation in frequent users of sunscreens⁷. Moreover, the World Health Organization (WHO) advises about the importance of using sunscreens daily⁸. Consequently, the consume and the number of dosage forms containing sunscreen ingredients (lotions, emulsions, or gels) in the market have been increasing recently⁶.

There are basically two categories of sunscreen ingredients: organic and inorganic filters. The organic filters (usually composed of aromatic rings) protect the skin by the absorption of radiation and the inorganic filters (basically metallic oxides) by its reflection^{6,9}. Benzophenone-3 (BZ-3) (2 - hydroxy - 4 - methoxyphenone) (Fig. 1), known as oxybenzone, Eusolex 4360[®], methanone, or diphenylketone, is one of the most used organic filters in sunscreen formulations. Food and Drug Administration (FDA) has approved its use as a safe and effective over-the-counter (OTC) sunscreen ingredient¹⁰. BZ-3 presents good chemical stability and absorbs efficiently both UVA and UVB radiation. However, BZ-3 does not show an adequate solubility in water to allow its incorporation in hydrogels without using organic cosolvents^{5,11}. On the other hand, hydrogels and gel-creams are many times preferred compared to creams due to their lower greasy aspect and lower concentration of fatty components.

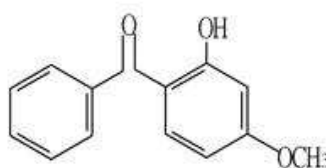


Figure 1. Chemical structure of benzophenone-3 (M_w : 182.22).

Nowadays, the development of sunscreens containing other bioactive compounds is of great interest, since this allows the use of lower concentrations of organic filters reducing the adverse effects of these compounds. This way, sunscreen formulations containing agents with known antioxidant activities have been developed to obtain a better protection to the skin, especially against the ROS production originated from sun exposure¹²⁻¹⁴. Rice bran and soybean oil contain substances as polyphenols and tocopherols with recognized powerful antioxidant activity¹⁵⁻¹⁸. Furthermore, the presence of vegetable oils in cosmetics can alter the sun protection factor of such formulations due to the presence of various substances in their composition^{19,20}.

In this context, the aim of this study was to evaluate the influence of the presence of rice bran or soybean oil at two different concentrations (3 or 5 %) on the physicochemical characteristics, rheological behavior, spreadability, and *in vitro* UVB sun protection factor (SPF) of gel-creams containing BZ-3. To the best of our knowledge, until now there is no report in the scientific literature which shows the impact of using these oils in the development of gel-creams to the obtaining of alternatives to sunscreen formulations.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Benzophenone-3 and imidazolidinyl urea were purchased from Pharmaspecial and Alpha Química (Porto Alegre, Brazil), respectively. Polysorbate 80 and soybean oil were purchased from Henrifarma and Bunge SA (São Paulo, Brazil), respectively. Rice bran was supplied by Irgovel (Pelotas, Brazil). Triethanolamine and Carbopol Ultrez 10 NF[®] were purchased from DEG (São Paulo, Brazil). Butylhydroxytoluene (BHT) and ethanol PA were supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil) and Impex (Novo Hamburgo, Brazil), respectively. All other reagents were of analytical grade and used as received.

2.2 Preparation of gel-creams

An aqueous phase was prepared dispersing Carbopol Ultrez 10 NF[®] (acrylic acid polymer) and solubilizing imidazolidinyl urea (preservative) in part of water in order to swell the polymer chains. After, an oily phase [BZ-3, Tween 80[®], BHT and the oil (rice bran or soybean oil)] was prepared at 40 °C. This phase was slowly added to the aqueous phase under constant stirring. Additional water was added to obtain 100 g. This dispersion was neutralized with triethanolamine to obtain an adequate semisolid formulation for skin application.

Formulations were prepared with rice bran oil (R) at 3 or 5% (GC-BZ3-R3, or GC-BZ3-R5, respectively) or soybean oil (S) at the same concentration (GC-BZ3-S3, GC-BZ-S5). Table 1 shows the quali-quantitative composition of the formulations.

Table 1. Quali-quantitative composition of semisolids.

Component	GC-BZ3-R3	GC-BZ3-R5	GC-BZ3-S3	GC-BZ3-S5	H-BZ3
Carbopol Ultrez 10 NF [®] (g)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Imidazolidinyl urea (g)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Triethanolamine (%)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
BZ-3 (%)	10	10	10	10	10
Rice Bran Oil (%)	3	5	-	-	-
Soybean Oil (%)	-	-	3	5	-
BHT (%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Tween 80 [®] (%)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Distillated water	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g

Gel-creams without BZ-3 were prepared at the same concentrations of components as listed in Table 1 and were called as GC-R3, GC-R5, GC-S3, and GC-S5 for gel-creams containing rice bran oil at 3 and 5 % and soybean oil at 3 and 5 %, respectively. For comparison purposes, formulations (hydrogels) without vegetable oils but containing BZ-3, polysorbate 80 and BHT were also prepared (H-BZ3). All formulations were prepared in triplicate (n = 3).

2.3 Characterization of gel-creams

2.3.1 Determination of pH

pH values of gel-creams (n = 3) were determined in the dispersion of an aliquot of the formulation in ultrapure water (10 %, w/v) using a calibrated potentiometer (MPA-210 Model, MS-Tecnopon, São Paulo, Brazil).

2.3.2. Evaluation of rheological behavior

Rheological analyses were carried out at 25 ± 1 °C using a rotational viscosimeter (LVDV II+ Pro model, Brookfield, USA) with a SC4-25 spindle and a small sample adapter. The data obtained were analyzed with the Rheocalc software (V3.1-1 version, Brookfield, USA). The shear stress ramp was applied for 1200 s. Twenty different points were recorded using a shear rate interval of 0.05 s^{-1} . In order to establish the rheological behavior, rheograms were analyzed using different flow models: Casson model (Eq. 1), Ostwald model (Eq. 2), and Herschel-Bulkley model (Eq. 3).

$$\tau = \tau_o^{0.5} + \eta^{0.5} \gamma^{0.5} \quad (1)$$

$$\tau = \kappa \gamma^{0.5} \quad (2)$$

$$\tau = \tau_o + \kappa \gamma^{0.5} \quad (3)$$

where τ is the shear stress, τ_o is the yield stress, η is the viscosity, n is the index of flow, κ is the index of consistency, and γ is the shear rate²¹.

2.3.3 Determination of the spreadability

The spreadability of formulations was evaluated according to the methodology previously described by Borghetti and Knorst (2006)²². The sample was introduced in a central hole (1 cm) of a mold glass plate. The mold plate was carefully removed and the sample was pressed subsequently with glass plates of known weights with intervals of 1 min between each plate. Spreading areas reached by samples between each addition of a glass plate were measured in millimeters in the vertical and horizontal axes. Results represent the mean of three determinations and were expressed in terms of the spreading area as a function of the applied mass. The spreading area was calculated according to the following equation (Eq. 1):

$$S_i = d^2 \cdot \pi / 4 \quad (1)$$

in which S_i is the spreading area ($\text{mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) after the application of a determined mass i (g) and d is the mean diameter (mm) reached by each sample. The spreading area was plotted against the plate weights to obtain the spreading profiles. The spreadability factor (S_f) was also calculated and represents the spread a formulation is able to expand on a smooth horizontal

surface when a gram of weight is added on it under the conditions described in the methodology above. The following equation (Eq. 2) was used to calculate the spreadability factor²³:

$$S_f = A/W \quad (2)$$

in which S_f (mm².g) is the spreadability factor resulting from the ratio between (A) the maximum spread area (mm²) after the addition of the sequence of weights used in the experiment and (W) the total weight added (g).

2.3.4 Determination of the *in vitro* UVB sun protection factor (SPF)

The *in vitro* UVB SPF was determined according to the spectrophotometric method developed by Mansur and co-workers (1986)²⁴, since the main photoprotective activity of BZ-3 is against UVB radiation. The amount of 0.25 grams of each formulation was dissolved in 50 mL of ethanol. An aliquot of 1 mL was transferred to a 25 mL volumetric flask and the volume was completed with ethanol. Absorbances were measured at 290 to 320 nm (Shimadzu UV-1201 UV-VIS Spectrophotometer), using ethanol as blank.

2.4. Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SD (standard deviation). Two-way or one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the experimental data. Post-hoc multiple comparisons were done by Tukey's test for significance at p -values ≤ 0.05 . All analyses were run using the SigmaStat Statistical Program (Version 3.0, Jandel Scientific, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Several factors are decisive for the use of sunscreens by population such as fragrance, packaging, and price. More specifically, if the sunscreen shows greasy or sticky aspects, these factors supplant all the others²⁵. Gel-creams are oil-in water formulations presenting a thickener in the external aqueous phase. They can be prepared from a gel preparation in which an emulsifying agent is incorporated in conjunction with an oily phase (mineral or vegetable oil). Carbopol was chosen in our study due to its common use as a thickener in these types of formulations. Its structure contains a small lipophilic in addition to a large hydrophilic portion, such as oil in water emulsifiers. This way, it is possible to obtain stable formulations

that do not require a large quantity of oily phase to achieve a good level of viscosity²⁶. Regarding our study, all formulations showed homogeneous aspect, glossy, slightly greenish color, and satisfactory organoleptic characteristics. Despite the poor aqueous solubility of BZ-3 ($0.004 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)²⁷, the use of both vegetable oils at 3 or 5 % was enough to promote its adequate incorporation in the gel-creams. pH values of all formulations containing rice bran or soybean oil were compatible with the cutaneous application (Table 2), regardless of the presence of BZ-3.

Table 2. pH values and spreadability factors of formulations containing the vegetable oils and BZ-3 (mean \pm standard deviation).

Formulation	pH	Spreadability factor ($\text{mm}^2\cdot\text{g}^{-1}$)
GC-BZ3-R3	6.99 ± 0.10	1.49 ± 0.47
GC-BZ3-R5	7.02 ± 0.20	1.56 ± 0.37
GC-BZ3-S3	6.76 ± 0.10	1.39 ± 0.46
GC-BZ3-S5	7.02 ± 0.00	1.60 ± 0.34
GC-R3	6.53 ± 0.80	2.15 ± 0.86
GC-R5	6.85 ± 0.10	1.88 ± 0.24
GC-S3	6.82 ± 0.10	1.90 ± 1.09
GC-S5	6.74 ± 0.20	2.48 ± 1.14

For comparison, a formulation prepared without BZ-3 and the vegetable oils presented similar pH values (6.57 ± 0.20) than those containing the compounds. According to a two-way analysis of variance, neither the presence of BZ-3 nor the concentration of the oil showed influence on the pH values of gel-creams ($p > 0.05$). On the other hand, the presence of BZ-3 showed a significant influence on the spreadability factor (Table 1). Formulations containing BZ-3 showed lower spreadability factors compared to those prepared without it ($p \leq 0.05$). This result can be better observed comparing the spreadability profile of the different formulations (Figure 2). Regarding the presence of vegetable oils, formulations containing the higher concentration of oil showed better spreadability profile.

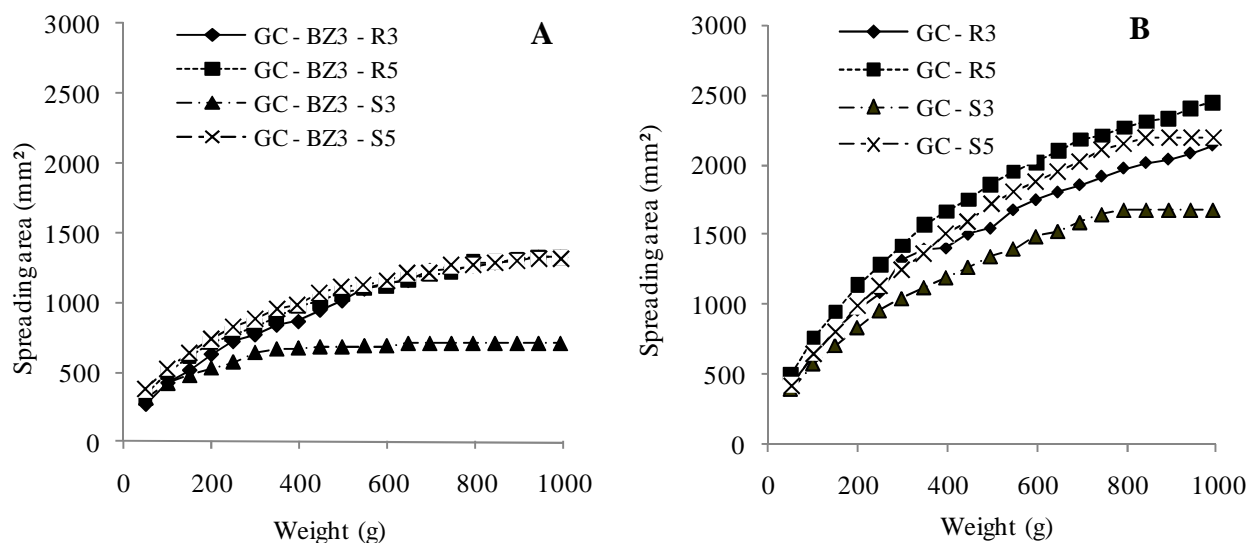


Figure 2. Graphic representation of spreadability of gel-creams ($n = 3$): (A) gel-creams containing vegetable oils with BZ-3; (B) gel-creams containing vegetable oils without BZ-3.

To be highly effective, the sunscreen formulation must coat the skin surface uniformly. The spreadability is an essential characteristic of semisolid pharmaceutical dosage forms for dermal application, since it is related to the application of these formulations in the action site. Furthermore, products containing sunscreens must promote easy spreadability to ensure the nominal SPF²².

The viscosity of semisolids is highly related to their spreadability behavior. In addition, their flow properties influence each stage of the pharmaceutical development process, such as filling, mixing, packing, and removal from the container before the application²⁸. This way, rheological characteristics of semisolid dosage forms have a fundamental importance, since they serve as a support in predicting their quality and stability, as well as in evaluating the influence of some components in their formulations²². In order to evaluate the influence of the BZ-3 and the vegetable oils on the flow properties of the gel-creams, rheological studies were carried out. The study of the rheological behavior of semisolid formulations is an important tool for the good application and efficiency of such formulations, mainly sunscreens^{29,30}. Figure 3 shows the rheogram (applied shear rate as a function of the shear stress) of gel-creams containing rice bran or soybean oils in different concentrations in the presence of BZ-3.

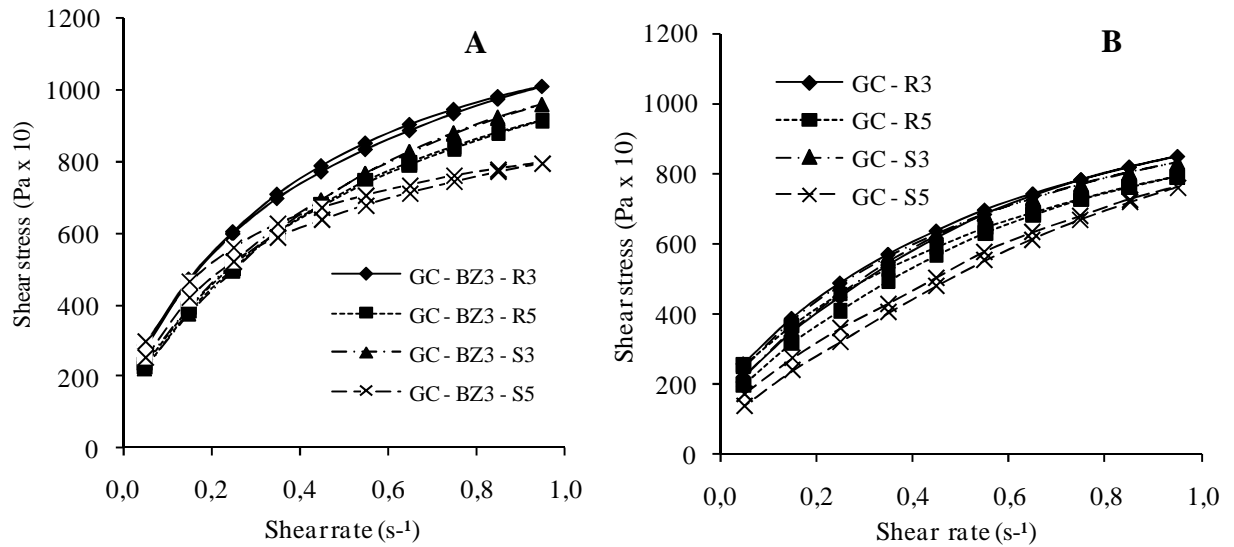


Figure 3. Rheological behavior of gel-creams containing vegetable oils with (A) or without (B) BZ-3 (n = 3).

As can be observed, all formulations showed non-Newtonian pseudoplastic behavior, where the flow curves (shear stress versus shear rate) are non-linear²⁵, regardless of the presence of BZ-3 or the vegetable oils at different concentrations (3 or 5 %). However, formulations without BZ-3 exhibited lower values of shear stress at higher shear rate than the formulations containing BZ-3. An increase in the shear stress with the increasing of the shear rate means a decrease in the apparent viscosity²⁸, suggesting lower apparent viscosity for formulations without BZ-3 compared to formulations containing BZ-3, as can be better seen in Figure 4A and 4B.

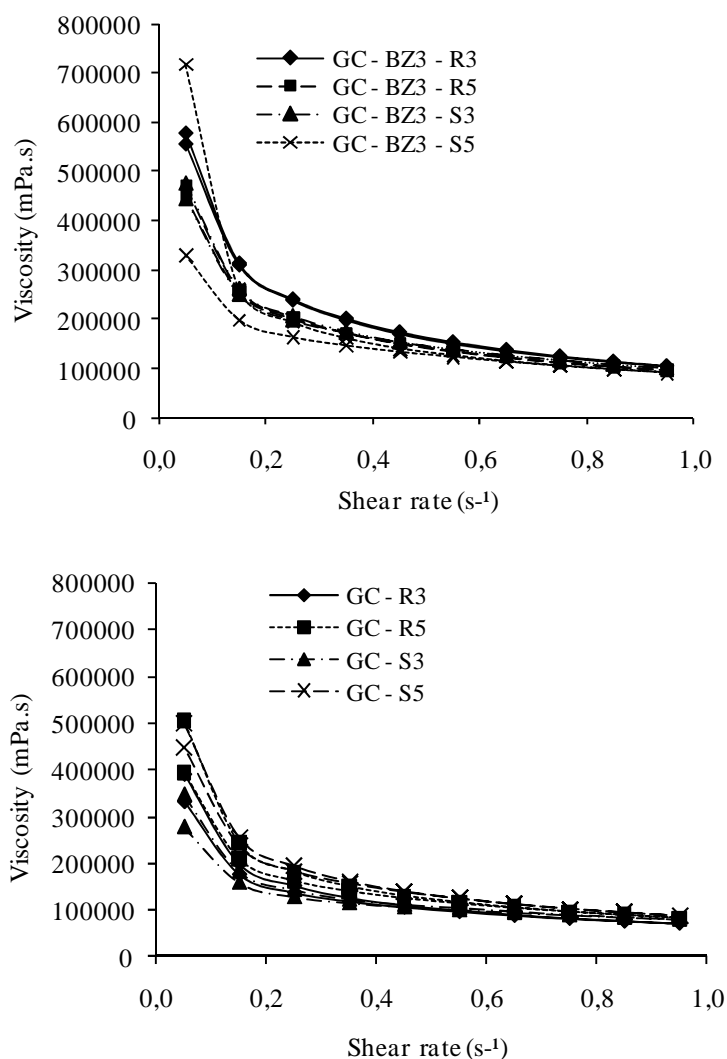


Figure 4. Graphic representation of viscosity (mPa.s) of gel-creams in relation to the shear rate (s^{-1}) ($n = 3$): (A) gel-creams containing BZ-3; (B) gel-creams without BZ-3.

Formulations containing lower concentration of vegetable oils showed higher shear stress values. The viscosity of the sunscreen should decrease during the high shear process of spreading (application on skin), so the product could cover the skin evenly²⁵. Thixotropic phenomenon can be observed by the enclosed areas between ascendant and descendent curves. Thixotropy consists in the decrease of viscosity with time when flow (shear rate) is applied to a semisolid and the subsequent recovery of viscosity when the flow is discontinued. This occurs basically due to the breakdown of the three-dimensional internal structure of the system and further to the rebuilding of the structure because of the Brownian motion^{28,31}.

Sunscreen formulations should exhibit non-Newtonian behavior with preferable pseudoplastic profile. Formulations presenting these characteristics reduce the viscosity when subjected to flow (shear rate), so the formulation provides the formation of a protective film

on the skin surface²⁵. On the other hand, most Newtonian systems fail to form a protective film on the skin, since they spread on the skin very rapidly and compromise the effectiveness of the product. Film thickness and uniformity of the sunscreens are the required properties to be optimally regulated during the formulation process²⁸.

Several mathematical models are available in the literature to analyze the rheological behavior of semisolid formulations, which can be used to establish the flow index (n) of different non-Newtonian systems, such as Casson, Ostwald (Power Law), and Herschel-Bulkley models. In order to establish the best model for our formulations and to calculate and compare the consistency indices of the different formulations, these models were used to analyze their rheograms. Table 3 shows the regression coefficients obtained for the different formulations, regardless of the presence of BZ-3 and the concentration of the vegetable oil.

Table 3. Regression coefficient (r^2) for various flow models in shear rate-shear stress curve (mean \pm standard deviation).

Formulation	Casson	Ostwald	Herschel-Bulkley
GC-BZ3-R3	0.9710 \pm 0.0026	0.9777 \pm 0.0047	0.9977 \pm 0.0006
GC- BZ3-R5	0.9737 \pm 0.0110	0.9753 \pm 0.0070	0.9980 \pm 0.0020
GC-BZ3-S3	0.9757 \pm 0.0029	0.9820 \pm 0.0010	0.9973 \pm 0.0006
GC-BZ3-S5	0.9747 \pm 0.0046	0.9750 \pm 0.0050	0.9967 \pm 0.0012
G-R3	0.9923 \pm 0.0023	0.9797 \pm 0.0070	0.9980 \pm 0.0020
G-R5	0.9810 \pm 0.0045	0.9787 \pm 0.0055	0.9970 \pm 0.0000
G-S3	0.9870 \pm 0.0006	0.9663 \pm 0.0086	0.9963 \pm 0.0015
G-S5	0.9760 \pm 0.0004	0.9817 \pm 0.0057	0.9977 \pm 0.0021

The regression coefficient was higher than 0.99 for all formulations according to the Herschel-Bulkley's model. This way, the consistency indices and the n values were calculated according to its equation (Table 4). Flow indices below 1.0 confirm the pseudoplastic behavior of such gel-creams³².

Table 4. Consistency (k) and flow indices (n) for all formulations (mean \pm standard deviation).

Formulation	n	k (mPa.s)
GC-BZ3-R3	0.27 ± 0.10	147520 ± 34968
GC-BZ3-R5	0.37 ± 0.20	121926 ± 28839
GC-BZ3-S3	0.43 ± 0.06	112589 ± 8922
GC-BZ3-S5	0.49 ± 0.14	100207 ± 14406
GC-R3	0.63 ± 0.09	73974 ± 33370
GC-R5	0.53 ± 0.16	86403 ± 11572
GC-S3	0.56 ± 0.71	76063 ± 14366
GC-S5	0.39 ± 0.02	95199 ± 804

A two-way analysis of variance with formulations containing BZ-3 showed no influence of the concentration of the vegetable oil on the consistency indices of the formulations ($p > 0.05$). On the other hand, a significant influence could be observed according to the type of oil in the formulation ($p \leq 0.05$). This influence did not depend on the concentration of the oil (3 or 5 %) in the gel-creams ($p > 0.05$). In fact, gel-creams containing rice bran oil showed higher consistency indices than those prepared with soybean seed oil ($p \leq 0.05$). This result can be explained by the higher viscosity of the rice bran oil (67.87 ± 3.40 mPa.s) compared to the soybean seed oil (53.37 ± 0.17 mPa.s). Moreover, the presence of BZ-3 led to an increase in the consistency indices of the gel-creams, regardless of the type of vegetable oil or its concentration ($p \leq 0.05$). These results corroborate the results obtained for spreadability as previously discussed.

Finally, we evaluated the influence of the presence of the vegetable oils on the *in vitro* UVB sun protection factor (UVB SPF) values of such formulations containing BZ-3 (Table 5).

Table 5. *In vitro* SPF values of gel-creams and hydrogels containing benzophenone-3 (mean \pm standard deviation).

Formulation	SPF
GC-BZ3-R3	7.69 \pm 0.41
GC-BZ3-R5	7.33 \pm 1.08
GC-BZ3-S3	7.83 \pm 0.84
GC-BZ3-S5	8.25 \pm 0.50
H-BZ3	8.23 \pm 0.38

A formulation prepared without vegetable oil was used as a control (H-BZ-3). These results showed that no statistical differences were observed among the values achieved for all formulations ($p > 0.05$) regardless of the oil or its concentration. This way, the presence of the vegetable oils studied (rice bran oil or soybean oil) does not change the UVB SPF values of the semisolids, confirming their potential use to prepare cosmetic sunscreen formulations with adequate physicochemical and rheological characteristics.

4. CONCLUSION

In this study we demonstrated the feasibility to prepare new sunscreen gel-cream formulations containing two vegetable oils with known antioxidant activities: rice bran and soybean oil. The presence of the oils at two different concentrations changed neither the pH values nor the rheological behaviors of the gel-creams (pseudoplastic and tixotropic profile). The rheograms of all formulations fit better to the Herschel-Bulkley model. However, the presence of the oils at 3 or 5 % in the gel-creams led to lower consistency indices and better spreadability profiles compared to the formulation without hydrogels, which are favorable for sunscreen formulations. Furthermore, the presence of both vegetable oils at 3 and 5% did not change the *in vitro* UVB SPF. Taking all these considerations together, we can conclude that the use of rice bran and soybean oils to prepare gel-creams is a promising alternative to obtain aqueous-based formulations containing BZ-3 and to associate this sunscreen with natural antioxidant components in a skincare cosmetic, without changing its *in vitro* SPF value.

Acknowledgements

The authors thank the financial support of Rede Nanocosméticos/CNPq, CAPES/Brazil and CNPq/Brazil. R. Rascovetzki thanks Programa FIPE Jr/UFSM for her young scientist fellowship. L. A. Rigo thanks CAPES/Brazil for his master fellowship.

REFERENCES

1. Urbach, F (1997) *J. Photoch. Photobio. B* **40**: 3-7.
2. Wulf, H.C., J. Sandby-Møller, T. Kobayasi & R. Gniadecki (2004) *Micron* **35**: 185-91.
3. He, G., V. K. Kutala, P. Kuppusamy & J.L. Zweier (2004) *Free Radical Bio.Med.* **36**: 665-72.
4. Gallagher, R.P. & T. K. Lee (2006) *Prog. Biophys. Mol. Bio.* **92**: 119-31.
5. Kullavanijaya, P. & H. W. Lim (2005) *J. Am. Acad. Dermatol* **52**: 937-58.
6. Flor, J., M. R. Davolos & M. A. Correa (2007) *Quim. Nova* **30**: 153-58.
7. Roberts, L.K. & D. G. Beasley (1997) *J. Photoch. Photobio. B.* **39**: 121-29.
8. World Health Organization. Available at:
<<http://www.who.int/uv/publications/solaradgbd/en/index.html>>. Accessed in 5 apr. 2010.
9. Velasco, M.V.R., T.S. Balogh, C.A.Pedriali, F.D. Sarruf, C.A.S.O. Pinto, T.M. Kaneko & A. Baby (2007) *Lat. Am. J. Pharm.* **27**: 23-7.
10. Food and Drug Administration. Available at:
<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=352&showFR=1>>. Accessed in 5 apr. 2010.
11. Yesudian, P. D. & C.M. King (2002) *Contact Dermatitis* **46**: 55-6.
12. Velasco, M.V.R., F. D. Sarruf, F.D., I.M.N. Salgado-Santos, C. A. Haroutiounian-Filho, T. M. Kaneko & A.R Baby (2008) *Int. J. Pharm.* **363**: 50-7.
13. Aquino, R.,S. Morelli,A. Tomaino, M. Pellegrino,A. Saija, L. Grumetto, P. Puglia, D. Ventura & F. Bonina (2002) *J. Ethnopharmacol.* **79**: 183-91.
14. Lin, J. Y., A. Selim, C.R. Shea, J.M. Grichnik, M.M. Omar, N.A. Monteiro-Rivieri & S.R. Pinnel (2003) *J. Am. Acad. Dermatol.* **48**: 866-74.
15. Siger, A., M. Nogala-Kalucka & E. Lampart-Szczapa (2008) *J. Food Lipids* **15**: 137-49.
16. Amadou, I., S. Young-Hui, J. Sun & L. Guo-Wei (2009) *Asian J. Biochem.* **4**: 68-76.

17. Juliano, C., C. Massimo, M.C. Alamanni & L. Piu (2005) *Int. J. Pharm.* **299**: 146-54.
18. Devi, R.R., A. Jayalekshmy, C. Arumughan (2007) *Food Chem.* **104**: 658-64.
19. Ferrari, M., M. S. C. Oliveira, A. K. Nakano & P. A. Rocha-Filho (2007) *Rev. Bras. Farmacog.* **17(4)**: 626-30.
20. Zanatta, C.F., M. Mitjans, V. Urgatondo, P.A. Rocha-Filho & M.P. Vinardell (2010) *Food Chem. Toxicol.* **48**: 70-5.
21. Kim, J.Y., Y.J. Song, E.J. Lee & S.K. Park (2003) *Colloid. Polym. Sci.* **281**: 614-23.
22. Borghetti, G.S. & M.T. Knorst (2006) *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **42**: 531-37.
23. Marchiori, M. L., G. Lubini, G. Dalla Nora, R.B. Friedrich, M.C. Fontana, A.F. Ourique, M.O. Bastos, L.A. Rigo, C.B. Silva, S.B.Tedesco & R.C.R. Beck (2010). *Drug Dev. Ind. Pharm. in press.*
24. Mansur, J.S., M.N.R. Breder, M.C.Mansur & R.D. Azulay (1986) *An. Bras. Dermatol.*, **61**: 121-4.
25. Tanner, P. R (2006) *Dermatol. Clin.* **24**: 53-62.
26. Lira, A.M., Araujo, A.A.S., Basilio, I.D.J., Santos B.L.L., Santana, D.P. & R. O. Macedo (2007) *Termochim. Acta* **457**: 1-6.
27. Jiang, R., Benzon, H.A.E., Cross, S.E. & M. S. Roberts (1998) *Pharm. Res.* **15**: 1863-8.
28. Lee, C.H., Moturi, V. & Lee, Y.(2009) *J. Control. Release.* **136**: 88-98.
29. Gaspar, L.R. & P.M.G.B.M. Campos (2003) *Int. J. Pharm.* **250**: 35-44.
30. Santoro, M.I.R.N., D.A.G.C.E. Oliveira, E.R.M. Kedor-Hackmann & A.K. Singh (2005) *Int. J. Pharm.* **297**: 197-203.
31. Mewis, J. & N.J. Wagner (2008) *Adv. Colloid. Interfac.* **147-148**: 214-27.
32. Chhabra R. P. & J. F. Richardson (2008) "Non-Newtonian fluid behavior" in Non-newtonian flow and applied rheology: engineering applications. Butterworth Heinemann, Oxford, pp. 5-12.

CAPÍTULO 2: Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleos vegetais
alternativos: desenvolvimento e estudo *in vivo* de genotoxicidade

CAPÍTULO 2: Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo óleos vegetais alternativos: desenvolvimento e estudo *in vivo* de genotoxicidade

2.1 Introdução

Sistemas coloidais nanoestruturados estão sendo amplamente estudados no campo farmacêutico para melhorar o preparo de formas farmacêuticas devido seu tamanho submicrométrico e por proporcionar vantagens como o aumento da biodisponibilidade, da estabilidade bem como o controle da liberação de substâncias ativas (ZILI *et al.*, 2005; OURIQUE *et al.*, 2008; FONTANA *et al.*, 2009; FONTANA *et al.*, 2010). Recentemente, um novo tipo de nanopartícula foi descrito na literatura, chamada de nanocápsulas de núcleo lipídico (MÜLLER *et al.*, 2001; JÄGER *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2010). A estrutura das nanocápsulas de núcleo lipídico difere das nanocápsulas poliméricas, pois apresenta em seu núcleo a dispersão de um lipídio sólido em óleo. Ainda não existem trabalhos na literatura sobre a utilização dos óleos de arroz, soja ou girassol no preparo de nanocápsulas de núcleo lipídico, apenas alguns trabalhos com a preparação de nanocápsulas poliméricas convencionais contendo estes óleos (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000; MOSQUEIRA *et al.*, 2000; FRIEDRICH *et al.*, 2008). Além disso, considerando o crescente interesse no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados como nanocarreadores de fármacos e nanocosméticos, o impacto ambiental que esses nanosistemas possam causar deve ser avaliado a fim de garantir a segurança destes produtos para a saúde e para o meio ambiente (BARRENA *et al.*, 2009).

Portanto, o capítulo a seguir descreve pela primeira vez o desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo os óleos de arroz, soja e girassol como nanocarreadores e o impacto ambiental através de um estudo de genotoxicidade que utiliza a cebola como modelo de vegetal de teste *in vivo*.

PUBLICAÇÃO 2: Lipid-core nanocapsules containing alternative vegetable oils: development and *in vivo* genotoxicity study

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Science of the Total Environment

Lipid-core nanocapsules containing alternative vegetable oils: development and *in vivo* genotoxicity study

L. A. Rigo¹, V. Frescura², L. A. Fiel³, A. F. Ourique⁴, S. B. Tedesco², C. B. Silva¹, S.S.Guterres^{3,4}, A. R. Pohlmann^{4,5}, R. C. R. Beck^{3,4*}

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

²*Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

³*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.*

⁴*Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil..*

⁵*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul CP 15003, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil*

* Corresponding author:

Tel +55 51 3308-5951 Fax: +55 51 3308-5090

E-mail address: ruy.beck@ufrgs.br (R. C. R. Beck)

Abstract

The aim of this study was to evaluate the feasibility of using rice bran (RB), soybean (SB) or sunflower seed (SF) oils as alternative oily components to prepare lipid-core nanocapsules (LC-NC). Firstly, the compatibility of such oils with the polymeric material was checked by a swelling test. LC-NC containing RB, SB or SF oils were prepared by interfacial deposition of the preformed polymer method. Physicochemical characteristics of the formulations were monitored up to 3 months of storage by particle size, polydispersity index, pH, and zeta potential. The relative physical instability phenomenon was evaluated by multiple light scattering analyses. The environmental safety of the formulations was carried out by an *in vivo* protocol, the *Allium cepa* test. After preparation, all LC-NC showed negative zeta potential (around -7.0 mV) and adequate nanotechnological characteristics as mean size (between 220 and 230 nm) and polydispersity (< 0.20), which remained adequate until 3 months after preparation. The presence of the polymer around the nanodroplets was fundamental to avoid the formation of micrometric particle population. All formulations showed a Newtonian rheological behavior and did not present instability phenomenon typical for colloidal systems. The *in vivo* environmental safety evaluation showed that LC-NC containing RB, SB or SF oils did not present genotoxic potential; although a slight antiproliferative activity was found depending on the type of the oily phase. In conclusion, we can suggest that these nanoparticles do not offer environmental damage or risk.

Key-words: *Allium cepa*, Environmental safety, Nanocapsules, Nanoparticles, Vegetable Oils.

1. INTRODUCTION

Nanosystems have been studied in the pharmaceutical field to improve the preparation of pharmaceutical dosage forms due to their submicrometric size (less than 1 μm) and advantages such as making the preparation of pharmaceutical dosage forms containing poor water soluble drugs easier (Zili et al., 2005; Blouza et al., 2006; Ourique et al., 2010; Zhang et al., 2010). These nanosystems cover different particle types, such as nanocapsules, nanoemulsions, liposomes, and dendrimers, among others. Polymeric nanocapsules have been widely employed in the preparation of drug delivery systems due to the possibility to sustain the drug release (Fontana et al., 2009; Fontana et al., 2010; Friedrich et al., 2008), to improve the stability of drugs (Ourique et al., 2008; Almeida et al., 2009; Almeida et al., 2010), and to protect active substances against biological fluids (Cui et al., 2006).

Innovative polymeric nanocapsules, called lipid-core nanocapsules, were proposed in the last decade (Müller et al., 2001; Jäger et al., 2009). They present a different core compared with the original nanocapsules proposed by Fessi and co-workers (1988). Lipid-core nanocapsules are characterized by a lipid core composed of a mixture of oil and a solid lipid, as sorbitan monostearate (Jäger et al., 2009; Ourique et al., 2010).

Some studies have been reported in the literature approaching polymeric nanoparticles prepared with alternative vegetable oils. The use of soybean and sunflower seed oils to prepare penicillin-loaded poly (D,L-lactic-acid-co-glycolic acid) nanocapsules was reported in 2000 by Santos-Magalhães and co-workers. The influence of different oily phases, including soybean oil, on the physicochemical properties of nanocapsules was studied by Mosqueira and co-workers (2000). Some years later, Friedrich and co-workers (2008) used sunflower oil aiming to improve the encapsulation efficiency of dexamethasone into polymeric nanocapsules. The feasibility of preparing nanocapsules and nanoemulsion using oil with a high cosmetic appeal (grape seed and almond kernel oil) was demonstrated by Almeida and co-workers (2009). Such formulations were suitable to delay benzophenone-3 photodegradation.

Rice bran oil is rich in natural antioxidant such as tocopherols, tocotrienols, and, especially, γ -orizanol (Chen and Bergman, 2005). γ -orizanol is a great antioxidant compound (Juliano et al., 2005) responsible for hypocholesterolemic effects (Ha et al., 2005; Wilson et al., 2007). It is not present in other vegetable oils. The soybean oil presents phytosterols (sitosterol and stigmasterol) and tocopherols (Verleyen et al., 2001; Careri et al., 2001; Benites et al., 2009), which also has antioxidant activity (Amadou et al., 2009). Sunflower seed oil is composed of polyunsaturated fatty acid (PUFA) such as Omega-6 (linoleic acid) and

Omega-9 (oleic acid). The unsaponifiable portion of sunflower seed oil contains α -tocopherol and β -sitosterol, which present antioxidant activity (Perreti et al., 2004). In a recent study, Odabasoglu and co-workers (2008) have reported that the sunflower oil has anti-inflammatory and gastroprotective properties.

Considering that vegetable oils show high concentration of phytochemical compounds, which present known antioxidant activities, such oils could be very interesting for pharmaceutical and cosmetic purposes. Free radicals are involved in several diseases such as cardiovascular complications, neurodegenerative diseases, and the acceleration of aging skin (Bruckdofer, 2008; Herrling et al., 2003).

Furthermore, concerning the growing interest in using nanomaterials as nanomedicines and nanocosmetics as well as in consumer products, the presence and safety of such nanoparticles in the environment should be considered. Critical interest in the impact of this emerging technology has grown lately therefore a key issue in this field is to evaluate its potential toxicity (Barrena et al., 2009). Some researchers have reported that limited studies have been conducted on the toxicity of nanoparticles (Hussain et al., 2005) being the nanotoxicology in its infancy. Furthermore, few reports on genotoxic and cytotoxic behavior of nanoparticles in plant cells are found in the literature.

The utilization of biologic assays for the monitoring of the extract bioactivity, fractions and isolated chemical compounds has been frequently added in the phytochemical research in the identification of some potential toxic substances (Noldin et al., 2003). Plant system tests, mainly the *Allium cepa*, have been used to study the effects of plant extracts for genotoxic detection (Teixeira et al., 2003; Knoll et al., 2006; Fachinnetto et al., 2007; Lubini et al., 2008). Moreover, the *Allium cepa* test has already been used as an *in vivo* model to test the antiproliferative activity of nanoencapsulated and non-encapsulated drugs, such as tretinoin and dexamethasone (Fachinnetto et al., 2008; Marchiori, et al., 2010). In addition, Kumari and co-workers (2009) described recently a study on the cytotoxic and genotoxic impacts of silver nanoparticles using root-tip cells of *Allium cepa* as an indicator organism. The authors concluded that silver nanoparticles may interfere with intracellular components, causing damage to cell division, including chromosomal aberrations. In this way, they suggested that plants, as an important component of the environmental and ecological systems, need to be included in the evaluation of the overall fate, transport, and exposure pathways of nanoparticles in the environment.

In this context, the aim of this study was to evaluate the feasibility of using three alternative vegetable oils (rice bran, soybean and sunflower oils) to prepare lipid-core

nanocapsules as potential nanocarriers and to study their environmental impact by genotoxicity, using an *in vivo* vegetal model, the *Allium cepa* test. The advantage of using this test is the use of formulations without dilution, allowing the maintaining of the original properties during the experiment. Nanoparticles were prepared by the method of deposition of preformed polymer, using poly (ϵ -caprolactone) as biodegradable polymer. Formulations were characterized in terms of mean particle diameter, polydispersity, zeta potential, pH, relative physical stability, and morphological analysis by transmission electron microscopy. The compatibility of the different oils with the polymer was evaluated by a swelling test. To the best of our knowledge, there is no study in the literature reporting the use of such oils to prepare lipid-core polymeric nanocapsules or their environmental impact using an *in vivo* protocol.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (MW: 80,000) and sorbitan monostearate (Span 60[®]) were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Rice bran, soybean and sunflower seed oils were purchased from Irgovel (Pelotas, Brazil), Bunge (São Paulo, Brazil) and Henrifarma (São Paulo, Brazil), respectively. Polysorbate 80 was supplied by Henrifarma (São Paulo, Brazil). All other chemicals and solvents used in this study presented pharmaceutical grade and were used as received.

2.2 Swelling polymer experiments

Films of poly(ϵ -caprolactone) were obtained by squeezing in a hydraulic press for 5 min at 5 Tons (Hydraulic Press P30000, Bovenau, Brazil). For each experiment the films were exactly weighed and placed in glass amber flasks. An amount of RB, SB or SF oil enough to cover the film was added. The flasks were closed and stored at room temperature. After 5, 10, 15 and 30 days, the films were sieved and the oil at the surface was carefully removed with absorbing paper. Thereafter, the films were weighed.

2.3 Preparation of nanoparticles

Lipid-core nanocapsules (LC-NC) were prepared by interfacial deposition of preformed polymer (Müller et al., 2001; Jägger et al., 2009). Two solutions were prepared (organic and non-organic phases). The organic phase consisted of a solution containing the solvent (acetone) with a film-forming component [poly(ϵ -caprolactone), the oil (rice bran,

soybean or sunflower seed oil) at 3 % (v/v) and a solid lipid at room temperature (sorbitan monostearate) at 0.77 % (w/v). The non-organic phase (aqueous phase) contained water supplemented (0.77 % w/v) by a hydrophilic surfactant (polysorbate 80). The organic phase was added slowly with moderate magnetic stirring into the aqueous phase. The magnetic stirring was maintained for 10 min and then acetone was removed and the aqueous phase concentrated by evaporation (bath at 40°C) under reduced pressure. The final formulation was adjusted to 25 ml. LC-NC containing rice bran, soybean or sunflower seed oil were called as LC-NC-RB, LC-NC-SB or LC-NC-SF, respectively. In order to evaluate the influence of the polymeric coating on the oily droplets, nanoemulsions (NE) composed only of oil-in-water droplets surrounded by an hydrophilic surfactant (polysorbate 80) were prepared, omitting the addition of the film-forming component in the organic phase (NE-RB, NE-SB or NE-SF). All formulations were prepared in triplicate, stored at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) and protected from light (amber glass flasks).

2.4. Nanoparticle characterization

2.4.1. Particle size, polydispersity index and zeta potential analysis

Particle size and polydispersity index were determined by light diffraction (Mastersizer, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) considering the volume of the particles as well as by photon correlation spectroscopy (3 measures/batch; 2 runs of 30 s/measure, 25 °C) after adequate dilution of an aliquot of the suspensions in purified water (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Zeta potentials were measured using the same instrument at 25 °C, after the dilution of the samples in 10 mM NaCl aqueous solution (3 measures/batch; 10 runs/measure, 25 °C).

2.4.2. pH measurements

pH values of formulations were determined directly in the dispersions using a calibrated potentiometer (MPA-210 Model, MS-Tecnopon, São Paulo, Brazil).

2.4.3. Morphological analysis

Morphological analyses were carried out at Centro de Microscopia of the Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil). Analyses of LC-NC were conducted by transmission electron microscopy (TEM; Jeol, JEM 1200 ExII, Japan) operating at 80 kV. Diluted suspensions were deposited on specimen grid (Formvar-Carbon support films,

Electron Microscopy Sciences), negatively stained with uranyl acetate solution (2 % w/v) and observed at different magnifications.

2.5. Rheological analysis

Rheological analyses were performed using a rotational viscosimeter (LV DV II+ PRO Digital Viscosimeter, Brookfield Instruments, UK) equipped with ultra low viscosity apparatus. The analyses were carried out at 25 ± 1 °C.

2.6 Backscattering analysis

In order to predict phenomena of physical instability, LC-NC containing RB, SB or SF oils were analyzed by multiple light scattering using Turbiscan LabExpert equipment (Formulation Co., L'Union, France). The detection system consists of a light beam in the near infrared ($\lambda = 880\text{nm}$) and two detectors (one for transmission T and another of backscattering BS), which receive light at different angles of the incident light beam. The system detector performs a scanning from the bottom to the top of the cuvette (55 mm), which contains the sample, acquiring data T and BS . The profiles are expressed in the absolute (total values of T or BS) and reference mode (delta values from the first scan). To run the analyses, approximately 44 mm height of the cuvette was filled with the formulation. The samples were analyzed at room temperature (25 °C) within a period of 1 h using the multiple scanning mode (one scan every five minutes).

2.7 Stability studies

The effect of storage time of the LC-NC-RB, LC-NC-SB and LC-NC-SF formulations was monitored up to 3 months of storage by particle size, polydispersity index, zeta potential and pH. Formulations were stored at room temperature (25 ± 2 °C) and protected from light (amber glass flasks).

2.8. In vivo genotoxicity study

For the onion root-tip cell test, thirty *Allium cepa* bulbs were used, divided into five groups of six onion bulbs for each treatment (distilled water, as negative control; glyphosate 20%, as positive control; acetone, LC-NC-RB; LC-NC-SB; LC-NC-SF). For each treatment, all bulbs were rooted in distilled water for three days and after they were placed in their respective treatment for 24 h. The negative control group remained in distilled water. After 24 hours of treatment, control and experimental bulbs were collected and fixed in 3:1 (v/v)

ethanol:acetic acid for 24h before being placed in 70 % (v/v) aqueous ethanol and refrigerated (4 ± 2 °C) until analysis. For each bulb, two slides were made using two root-tips hydrolyzed in 1N hydrochloric acid for 5 min and washed in distilled water (Guerra & Souza, 2002). Slides were stained with 2 % (w/v) acetic orcein. Four fields of each slide were assessed by bright-field optical microscopy at 400X magnification and the number of interphase, prophase, metaphase, anaphase and telophase cells was recorded. At least 4000 cells for each treatment and controls were scored. Mean values for the different cell cycle phases, mitotic index (MI) and the percentage of division inhibition (%) in relation to the control (distilled water) were calculated (Patra et al., 2005; Marchiori et al., 2010). Chromosome aberrations were observed during cell division and counted as breaks (all mitotic phases), bridges and laggards (telophase and anaphase).

2.9. Statistical analysis

All formulations and experiments were prepared and analyzed in triplicate. Results are expressed as mean \pm SD (standard deviation). One-way analysis of variance (ANOVA) was employed for comparison of the experimental data. Post-hoc multiple comparisons were executed by Tukey's test at p -value ≤ 0.05 (SigmaStat Statistical Program, Version 3.5, Jandel Scientific, USA). Cell chromosomal irregularities like anaphasic bridges, breaks and laggard chromosomes were registered when occurred. Statistical data analyses were carried out using the χ^2 test at p - values = 0.05 (BioEstat 5.0)

3. Results and discussion

3.1. Swelling polymer experiment

In order to evaluate the feasibility of using the three different oil components as suitable excipients for preparing lipid-core nanocapsules, firstly we evaluated the compatibility of the polymeric material in contact with the different vegetable oils by means of a swelling polymer experiment, as a preformulation test. As observed in Table 1, the weight of the polymeric films did not show any significantly difference (ANOVA, $p > 0.05$) after 30 days in contact with the vegetable oils.

Table 1. Percentages of weight of polymeric films after contact with the vegetable oils during 5, 10, 15 and 30 days. Values represent the mean of three independent experiments.

Vegetable oil	% of weight			
	5 days	10 days	15 days	30 days
Rice bran oil	98.75	97.21	96.59	97.71
Soybean oil	97.69	97.91	97.77	98.10
Sunflower seed oil	96.73	97.27	98.25	98.93

This means that RB, SB and SF neither solubilize nor swell the polymer. This result shows the potential use of such vegetable oils in the investigation of alternative oil components to prepare LC-NC for the development of nanomedicines and nanocosmetics.

3.2. Nanoparticle characterization

At first we evaluated the size range of particles by laser diffraction analysis after the preparation of LC-NC. All LC-NC formulations showed a unimodal particle size distribution at the nanoscale range (Figures 1A, 1B and 1C), regardless of the oily component.

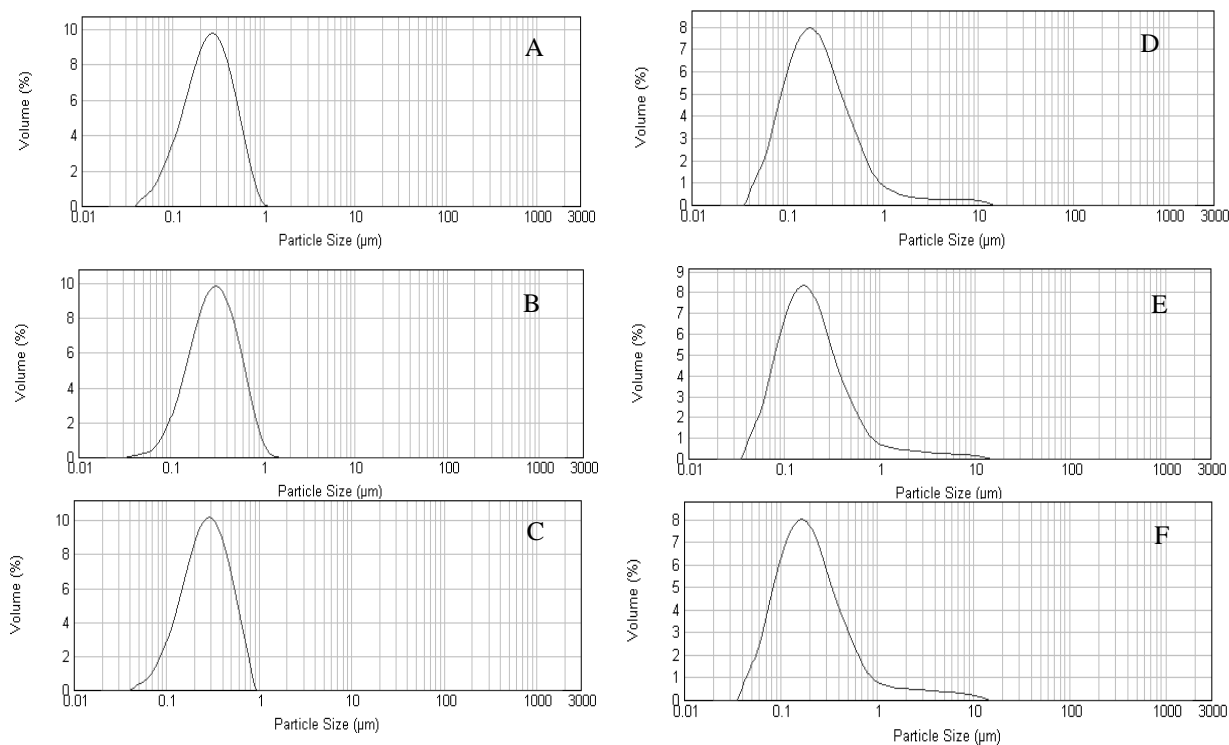


Fig. 1. Particle sizes distribution of (A) LC-NC-RB, (B) LC-NC-SB, (C) LC-NC-SF (D) NE-RB, (E) NE-SB and (F) NE-SF.

This result showed that the quali-quantitative composition of such formulations did not form micrometric particles concomitantly, and thus they are suitable to be further studied. In order to evaluate the effect of the presence of the polymer in these colloidal dispersions, oil-in-water nanoemulsions (NE) were also prepared and characterized by laser diffraction. Although the formation of nanodroplets could be observed, the absence of the polymeric layer led to the concomitant formation of particles at the micrometric range (Figures 1D, 1E and 1F). The control of the mean size at a nanoscale is fundamental to the development of adequate drug nanocarriers. In this way, our result showed that the presence of the polymer was fundamental to obtain adequate colloidal dispersions, considering the quali-quantitative composition selected in this study. Thus, further analyses were carried out only with LC-NC suspensions.

Table 2 shows the physicochemical characteristics of LC-NC prepared with the three different oily components (LC-NC-RB, LC-NC-SB and LC-NC-SF).

Table 2. Physicochemical characteristics of lipid-core nanocapsules containing rice bran (LC-NC-RB), soybean (LC-NC-SB) or sunflower (LC-NC-SF) oils after preparation. ($n=3$).

Formulation	pH	Particle size (nm)	PDI*	Zeta potential (mV)
LC-NC-RB	5.20 ± 0.04	229 ± 8	0.15 ± 0.02	-7.01 ± 0.20
LC-NC-SB	5.28 ± 0.07	226 ± 10	0.17 ± 0.02	-7.17 ± 0.43
LC-NC-SF	5.22 ± 0.10	226 ± 14	0.15 ± 0.02	-8.81 ± 3.11

*PDI: Polydispersity index.

Particle size and polydispersity have been investigated by photon correlation spectroscopy, which is more sensible for materials at the nanoscale. All formulations showed similar particle size between 220 nm, with low polydispersity index (below 0.20). No influence of the type of oil was observed on the mean particle size and polydispersity index of formulations (ANOVA, $p > 0.05$). pH values between 5.0 and 5.5 and negative zeta potentials around -7 mV were observed for all formulations. These values of zeta potential are a consequence of the particle/emulsion coating with polysorbate 80, acting as a physical stabilizer at the interface particle/water and the negative surface density of charge due to the presence of oxygen atoms in the molecules (Jäger et al., 2007). Mean particle sizes in the range of 200 to 300 nm and negative zeta potential around -8 mV are characteristics of

nanocapsules and LC-NC prepared by interfacial deposition method with polyester polymers using non-ionic stabilizing agents (Reis et al., 2006; Ourique et al., 2008; Fontana et al., 2009; Ourique et al., 2010). Considering the statistical analysis, the vegetable oils employed in the preparation of LC-NC did not show any influence on their physicochemical properties (ANOVA, $p \leq 0.05$). Furthermore, morphological analysis by transmission electron microscopy showed homogeneous spherical-shaped particles, whose diameters were in agreement with those obtained by photon correlation spectroscopy (Figure 2).

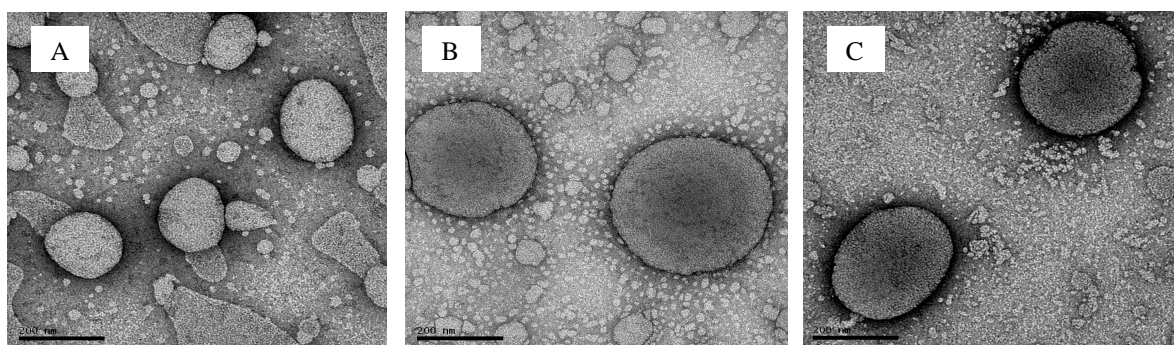


Fig. 2. Transmission electron microscopy images of (A) LC-NC-RB, (B) LC-NC-SB, (C) LC-NC-SF. [bar = 200 nm (150,000x)].

3.3 Rheological analysis

Regarding the rheological profile, all formulations showed a Newtonian behavior. The viscosity value did not change with the increasing of the shear rate value (Fig. 3).

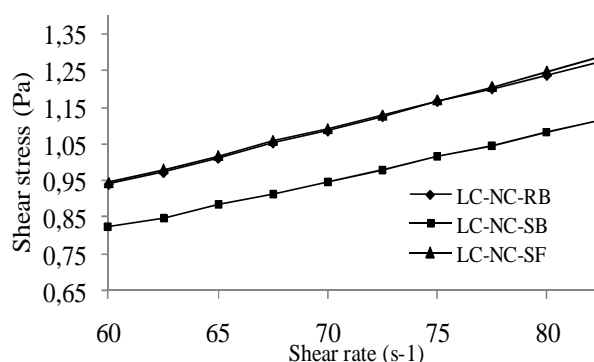


Fig. 3. Rheological behavior of LC-NC containing different vegetable oils ($n=3$).

However, LC-NC prepared with RB or SF oils showed higher viscosity (1.58 ± 0.02 and 1.56 ± 0.06 mPa.s, respectively) than that prepared with SB oil (1.36 ± 0.01 mPa.s). Considering that polymeric nanoparticles are potential carriers to improve the parenteral drug delivery (Joshi & Müller, 2008), the Newtonian behavior presented by the formulations under

development in this study are interesting for the development of parenteral nanomedicines (Allahham et al., 2004; Ourique et al., 2010).

3.4 Backscattering analysis

In order to predict the type of physical instability phenomenon [particle migration (sedimentation, creaming) and/or size variation (coalescence, flocculation)] that may occur in the colloidal suspensions, LC-NC prepared with the three oil components (RB, SB or SF) were analyzed by multiple light scattering. These analyses were carried out without dilution of samples. All transmission profiles showed T below 0.2% for nanocapsules indicating that only backscattering profiles (BS) could be considered for their characterization. No changes at the center of the cuvettes were observed for all formulations suggesting that no size variations occurred within the period of analysis. In addition, the analyzed formulations did not show any instability phenomenon evidence since no variation higher than 5 % of BS at the top or at the bottom of the cuvette was observed. Backscattering profiles for all formulations are presented in Figure 4 as a function of time, from right to left of the profiles representing from bottom (0 mm) to top of the cell (40 mm).

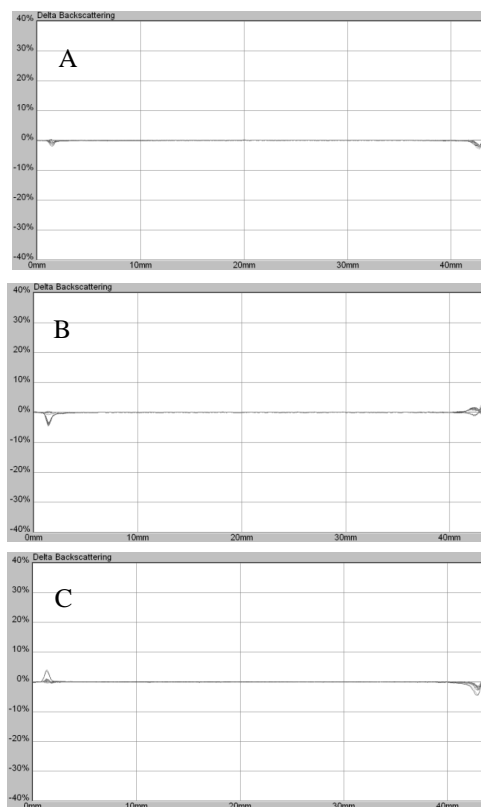


Fig. 4. Backscattering analysis of (A) LC-NC-RB and (B) LC-NC-SB and (C) LC-NC-SF.

3.5 Stability studies

Taking into account the potential use of these formulations as nanocarriers for drugs or cosmetic substances, they were stored at room temperature (25° C) and protected from light in order to evaluate their stability under storage. The results of mean size, polydispersity index, zeta potential, and pH were monitored for 3 months.

As can be observed in Table 3, after 3 months of storage the three formulations (LC-NC-RB, LN-NC-SB and LC-NC-SF) showed similar pH, mean particle size as well as polydispersity index compared to the initial values, regardless of the type of vegetable oil.

Table 3. Physicochemical characteristics of lipid-core nanocapsules containing rice bran (LC-NC-RB), soybean (LC-NC-SB) or sunflower (LC-NC-SF) oils after storage time (3 months). ($n=3$).

Formulation	pH	Mean size (nm)	PDI*	Zeta potential (mV)
LC-NC-RB	5.12 ± 0.12	239 ± 5	0.17 ± 0.06	-13.53 ± 1.79
LC-NC-SB	5.13 ± 0.20	237 ± 10	0.18 ± 0.03	-11.85 ± 0.24
LC-NC-SF	4.95 ± 0.10	227 ± 8	0.14 ± 0.01	-9.59 ± 3.49

* PDI: Polydispersity index.

For all formulations the zeta potential remained negative and presented a slight increase (in module) during storage time. These results are in agreement with other studies that have described the stability of LC-NC prepared with capric/caprylic triglycerides mixture as oil (Fontana et al., 2009; Ourique et al., 2010), as well as with the backscattering analysis previously discussed.

3.6. In vivo genotoxicity study

The use of vegetable oils such as RB, SB or SF oils in the preparation of LC-NC is innovative. As we are looking for alternatives to prepare nanocarriers for the development of nanomedicines and nanocosmetics, it is imperative to evaluate their environmental safety. Thus, we carried out a genotoxicity study using the *Allium cepa* vegetal test. Table 4 presents the number of cells observed in the different phases of the cell division during the *Allium cepa* cell cycle and the respective mitotic index (MI) for each treatment.

Table 4. Number of cells in different cell cycle (interphase, prophase, metaphase, anaphase, and telophase) and the mitotic index (MI) of *Allium cepa* root-tips treated with distilled water (negative control), glyphosate 20% (positive control), acetone and the LC-NC containing rice bran (LC-NC-RB), soybean (LC-NC-SB) or sunflower (LC-NC-SF) oil. The total number of cells analyzed for each treatment was 4000.

Treatment	Interphase	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	MI (%)*
Negative control	3713	127	42	20	44	5.8 ^a
Positive control	3892	115	127	13	32	7.1 ^b
LC-NC-SF	3767	100	32	15	36	4.5 ^c
LC-NC-RB	3809	81	33	18	52	4.6 ^c
LC-NC-SB	3816	65	12	10	21	2.7 ^d

* Means, in column, with the same letter are not significantly different by χ^2 test.

The positive control (glyphosate 20%) differed significantly from the negative control ($\chi^2 = 5.998$) and the other treatments, showing an increase of the cell division with the highest value of mitotic index (7.1 %). All lipid-core formulation showed a significant inhibition of the cell division compared with the negative control. LC-NC-SB formulation presented higher inhibition of cell division ($\chi^2 = 47.861$) compared with LC-NC-SF and LC-NC-RB ($\chi^2 = 6.339$ and $\chi^2 = 6.074$, respectively). Moreover, the number of cells in the interphase in the treatment with LC-NC-SB was higher than LC-NC-RB and LC-NC-SF. LC-NC-SF and LC-NC-RB did not differ significantly in their antiproliferative effect ($\chi^2 = 0.003$). The proliferative capacity of a substance, as the positive control, is generally associated with environmental harmful consequences. The development of organisms may happen at an accelerated rate or inappropriate way, damaging the balance. On the contrary, LC-NC showed a trend of a decrease in the cell division, highlighting their anti-proliferative capacity as observed by their mitotic index values. In this way, it is imperative to evaluate if this difference in the mitotic index could lead to genotoxic alterations.

Table 5 shows the mitotic aberrations, the number of cells with abnormal chromosomes as well as the type of changes.

Table 5. Mitotic aberrations in the *Allium cepa* root-tips treated with LC-NC containing rice bran (LC-NC-RB), soybean (LC-NC-SB) or sunflower oil (LC-NC-SF).

Treatment	Alteration type		Total cell number with alterations*
	Anaphasic bridge	Chromosomal break	
Glyphosate	17	135	152 ^a
LC-NC-RB	1	4	5 ^b
LC-NC-SF	2	1	3 ^b
LC-NC-SB	1	2	3 ^b

* Means, in column, with the same letter are not significantly different by χ^2 test.

The positive control showed 152 cells with alterations (70 cells with bridges in anaphase or telophase and 135 with chromosome breaks). This result was statistically different from the negative control ($\chi^2=149.218$). LC-NC-RB showed a single cell displaying an anaphasic-bridge (Figure 5A) and four cells with aberrations of type chromosome breakage (Figure 5B), which means 2.7% of alteration considering the dividing cells in this treatment.

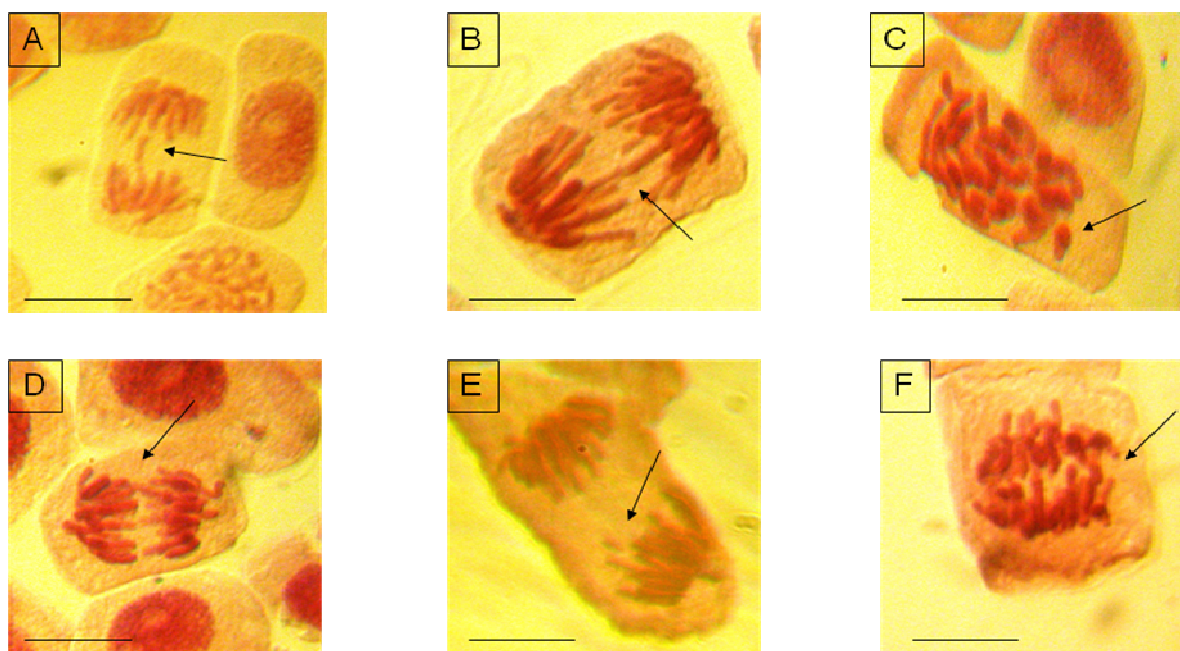


Fig. 5. Mitotic phases cells of *Allium cepa* treated with different nanocapsules formulations: (A) cell with chromosomal break (arrow) treated with LC-NC-RB, (B) arrow indicating anaphasic bridge cell treated with LC-NC-RB; (C) arrow indicating chromosomal break of the cell treated with LC-NC-SF; (D) cell treated with LC-NC-SF, arrow indicating anaphasic bridge; (E) cell treated with LC-NC-SB, arrow indicating chromosomal break; (F) arrow indicating anaphasic bride of the cell treated with LC-NC-SB. Scale bar 10 micrometers.

If we consider all cells (dividing and non-dividing) analyzed in this treatment (4000 cells) this value drops to 0.125%. The treatment with LC-NC-SF showed cells with two anaphasic-bridges (Figure 5C) and one cell with chromosome breaks (Figure 5D).

Similar results were found for the treatment with LC-NC-SB: one cell with anaphasic-bridge (Figure 5E) and two cells with chromosome breaks (Figure 5F). It is important to highlight that considering the number of dividing cells when compared with the positive control, the LC-NC containing RB, SB or SF oils offer no environmental risk because chromosomal abnormalities are not significant (Table 5). All LC-NC formulations showed a similar behavior compared with the negative control ($\chi^2=2.999$, 2.999 and 4.997 for LC-NC-SF, LC-NC-SB and LC-NC-RB, respectively), regardless of the oil type. These results are in agreement with those obtained for conventional nanocapsules containing only liquid oil in their core (Fachinetto et al., 2008; Marchiori et al., 2010).

4. Conclusion

Lipid-core nanocapsules prepared with rice bran, sunflower or soybean oil showed adequate physicochemical properties regarding their nanometric characteristics. These formulations did not show any instability phenomenon such as aggregation or sedimentation. Their physicochemical properties remained unchangeable until 3 months of storage. The *in vivo* study showed that LC-NC containing RB, SB or SF oils do not present genotoxic potential. This result suggests that these nanoparticles do not offer environmental damage or risk, being alternatives, as nanocarriers, for the development of nanomedicines and nanocosmetics.

Acknowledgements

The authors thank the financial support of Rede Nanocosméticos/CNPq, PRONEX/FAPERGS/CNPq, CAPES/Brazil, SCT-RS, CNPq/Brazil and INCT_if. L. A. Rigo thanks CAPES/Brazil for his master fellowship.

References

Allahham A, Stewart P, Marriott J, Mainwaring DE. Flow and injection characteristics of pharmaceutical parenteral formulations using a micro-capillary rheometer. *Int J Pharm* 2004; 270: 139-48.

Almeida JS, Lima F, Da Ros S, Bulhões LOS, Carvalho LM, Beck RCR. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale Res Lett* 2010; 5: 1603-10.

Almeida JS, Jezur L, Fontana MC, Paese K, Silva CB, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. *Lat Am J Pharm* 2009; 28: 165-72.

Amadou L, Yong-Hui S, Sun L, Guo-Wei L. Fermented soybean products: some methods, antioxidant compound extraction and their scavenging activity. *Asian J Biochem* 2009; 3:68-76.

Barrena R, Casals E, Colón J, Font X, Sanchez A, Puentes V. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere* 2009; 75: 850-57.

Benites CI, Cárdenas VO, Reis SMPM, Oliveira AC. Physicochemical characterization of Soybean Oil deodorizer distillate. *Chem Eng Trans* 2009; 17: 903-08.

Blouza IL, Charcosset C, Sfar S, Fessi, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for pediatric use. *Int J Pharm* 2006; 325: 124-31.

Bruckdofer KR, Antioxidants and CVD. *Proc Nutr Soc* 2008; 67: 214-22.

Careri M, Elviri L, Mangia A. Liquid chromatography–UV determination and liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. *J Chromatogr A* 2001; 249-257.

Chen MH, Bergman CJ. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol contents. *J Food Compos Anal* 2005; 18:139-51.

Cui F, Shi K, Zhang L, Tao A, Kawashima Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *J. Control Release* 2006; 114: 242-50.

Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF, Tedesco SB. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Rev Bras Farmacognosia* 2007; 17: 49-54.

Fachinetto JM, Ourique AF, Lubini G, Tedesco SB, Beck RCR. Tretinoin-loaded polymeric nanocapsules: Evaluation of the potential to improve the antiproliferative activities on *Allium cepa* root-tip compared to the free drug. *Latin Am J Pharm* 2008; 27:668–73.

Fessi H, Puisieux F, De Vissaguet JP. Procédé de préparation dès systèmes colloïdaux d'une substance, sous forme de nanocapsules. European Patent 1988;0274961 A1

Fontana MC, Coradini K, Guterres SS, Pohlmann AR, Beck RCR. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. *J Biomed Nanotech* 2009; 5: 1-10.

Fontana MC, Coradini K, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the physicochemical characteristics, drug release, and photostability. *J Biomed Nanotech* 2010; 10: 1-9.

Friedrich RB, Fontana MC, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Development and characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. *Quim. Nova* 2008; 5: 1131-36.

Guerra M, Souza MJ. Como observar cromossomos – Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. 1st ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.

Ha T-Y, Han S, Kim S-R, Kim I-H, Lee HY, Kim H-K. Bioactive components in rice bran oil improve lipid profiles in rats fed a high-cholesterol diet. *Nutr Res* 2005; 25: 597-606.

Herrling T, Fuchs J, Rehberg J, Groth N. U-V induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. *Free Radical Bio Med* 2003; 35: 53-67.

Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol in Vitro* 2005; 19:975–983.

Jäger A, Stefani V, Guterres SS, Pohlmann AR. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *Int J Pharm* 2007, 338: 297-305.

Jäger E, Venturini CG, Poletto FS, Colomé LM, Pohlmann JPU, Bernardi A, Battastini AMO, Guterres SS, Pohlmann AR. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *J Biomed Nanotech* 2009; 5:130-40.

Joshi MD, Müller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. 2009; 71:161-72.

Juliano C, Cossu M, Alamanni MC, Piu L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils *Int J Pharm* 2005; 299: 146-54.

Knoll MF, Silva ACF, CantoDorow TS, Tedesco SB. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. *Genet Mol Biol* 2006; 29: 539-42.

Kumari M, Mukherjee N, Chandrasekaran N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci Total Environ* 2009; 407: 5243-46.

Lubini G, Fachineto JM, Laughinghouse HD, Paranhos JT, Silva ACF, Tedesco SB. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. *Biologia* 2008; 63: 647-65.

Marchiori ML, Lubini G, Dalla Nora G, Friedrich RB, Fontana MC, Ourique AF, Bastos MO, Rigo, LA, Silva CB, Tedesco SB, Beck RCR. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization and in vitro drug release study. *Drug Dev Ind Pharm* 2010; 36:962-971.

Mosqueira VCF, Legrand P, Alphandary HP, Puisieux F, Barratt G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J Pharm Sci* 2000; 89: 614-26.

Müller CR, Schaffazick SR, Pohlmann AR, Costa TD, Silveira NP, Freitas LDL, Guterres SS. Spray-dried diclofenac-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres characterization. *Pharmazie* 2001; 56:864-7.

Noldin VF, Monache FD, Yunes RA. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. *Quím Nova* 2003; 3:331-3

Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Halici M, Aygun H, Suleyman H, Cadirci E, Atalay F. Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and α -tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 591: 300-06.

Ourique AF, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int J Pharm* 2008; 352: 1-4.

Ourique AF, Azoubel S, Ferreira VC, Silva CB, Marchiori MCL, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. *J Biomed Nanotech* 2010; 6: 1-10.

Patra J, Sahoo MK, Panda BB. Salicylic acid triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in root meristem cells of *Allium cepa* L. *Mutat Res-Gen Tox En* 2005; 581:173–80.

Perreti G, Finotti E, Adamuccio S, Della Sera R, Montanari L. Composition of organic and conventionally produced sunflower seed oil. *J Am Oil Chem Soc* 2004; 81:1119-23.

Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine* 2006; 2: 8-21.

Santos-Magalhães NS, Pontes A, Pereira VMW, Caetano MNP. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *Int J Pharm* 2000; 208: 71-80.

Teixeira RO, Camparoto ML, Mantovani MS, Vicentini VEP. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. *in vivo* assays. *Genet Mol Biol* 2003; 26: 551-5.

Verleyen T, Verhe R, Garcia L, Dewetinck K, Huyghebaert A, Greyt W. Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate. *J Chromatogr A* 2001; 921:277-85.

Vicentini VEP, Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. *Acta Scientiarum* 2001; 23:593-598.

Wilson TA, Nicolosi RJ, Woolfrey B, Kritchevsky D. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 105-12.

Zhang Z, Bu H, Gao Z, Huang Y, Gao F, Li Y. The characteristics and mechanism of simvastatin loaded lipid nanoparticles to increase oral bioavailability in rats. *Int J Pharm* 2010; 394:147-53.

Zili Z, Sfar S, Fessi H. Preparation and characterization of poly- ϵ - caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Int J Pharm* 2005; 294: 261-67.

CAPÍTULO 3: Controle do perfil de liberação de fármaco a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico: influência do tipo de óleo vegetal

CAPÍTULO 3: Controle do perfil de liberação de fármaco a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico: influência do tipo de óleo vegetal

3.1 Introdução

No capítulo anterior foi apresentada a viabilidade de obtenção de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo os óleos de arroz, soja e girassol como fontes alternativas para o seu preparo. As formulações apresentaram características físico-químicas adequadas durante o tempo de armazenamento e não demonstraram efeitos de instabilidade características de suspensões coloidais durante o tempo de acompanhamento. O estudo de genotoxicidade demonstrou que as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo esses óleos vegetais não oferecem danos ou riscos ambientais, demonstrando a segurança destes nanosistemas.

O presente capítulo apresenta um estudo de viabilidade de associação e controle de liberação *in vitro* de uma substância ativa modelo a partir das nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas com os óleos de arroz, soja e girassol. O propionato de clobetasol (CP), um anti-inflamatório não-esteróide, foi escolhido como fármaco modelo devido as suas características promissoras de encapsulação em nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões e seu comportamento prolongado de liberação *in vitro* a partir de sistemas nanoestruturados, conforme observado em estudos anteriores do grupo (FONTANA *et al.*, 2009; FONTANA *et al.*, 2010).

PUBLICAÇÃO 3: Controlling the drug release profile from lipid-core nanocapsules: influence of the type of vegetal oil

Short communication a ser submetido ao periódico Journal of Biomedical Nanotechnology

CONTROLLING DRUG RELEASE PROFILE FROM LIPID-CORE NANOCAPSULES: INFLUENCE OF THE TYPE OF VEGETAL OIL

L. A. Rigo¹, K. Coradini², A. Ourique³, Tatiana Emanuelli⁴, Andréia Quatrin⁴, C. B. Silva¹, S.S.Guterres^{2,3}, A. R. Pohlmann⁵, R. C. R. Beck^{2,3*}

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

²*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.*

³*Programa de Doutorado em Nanotecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS*

⁴*Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, RS, Brazil.*

⁵*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.*

* Corresponding author:

Tel +55 51 3308-5951 Fax: +55 51 3308-5090

E-mail address: ruy.beck@ufrgs.br (R. C. R. Beck)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of the type of liquid lipid (vegetable oils) of lipid-core nanocapsules on the control of the drug release profile. Clobetasol propionate was selected as a model drug. Lipid-core nanocapsules were prepared by interfacial deposition of preformed polymer [poly (ϵ -caprolactone)] method using three different vegetable oils (rice bran, soybean or sunflower seed oil) as the main component of their hydrophobic core. The physicochemical characteristics (pH, mean size, polydispersity index and zeta potential) were monitored up to 3 months of storage. *In vitro* drug release profile from formulations was evaluated by the dialysis bag method. All formulations presented nanometric mean size (between 228 and 235 nm), polydispersity index below 0.20 and negative zeta potential, which remained adequate during three months of storage time, regardless the type of the vegetable oil. A biphasic drug release profile was observed for all formulations. After 168 hours, the concentration of drug released from the formulation containing sunflower seed oil was lower (0.36 mg/mL) than formulations containing soybean (0.40 mg/mL) or rice bran oil (0.45 mg/mL). The influence of the type of vegetable oil on the drug release profile could be demonstrated by the good correlation between consistency indices of the solid lipid dispersion of the core of nanocapsules prepared with different vegetable oils and their burst and sustained rate constants of drug release ($r > 0.94$). The type of vegetable oil influences the consistency index of the solid lipid core of nanocapsules and modulates the drug release from these nanosystems.

Key-words: Drug release, Lipid-core, Nanoparticles, Vegetable oils.

Polymeric nanoparticles are a viable and promising strategy for the development of medicines based on the new properties given by nanomaterials. They have the ability to overcome some drawbacks of conventional pharmaceutical dosage forms such as the poor bioavailability¹ and photostability²⁻⁶. These nanosystems have been prepared from different methods and raw materials, according to the needs of their application⁷.

According to the literature, some polymeric nanoparticles are being prepared using alternative vegetable oils as oily phase^{6,8-11}. In this context, rice bran (RB), soybean (SB) or sunflower seed (SF) oils could be very interesting for pharmaceutical and cosmetic purposes because they present high concentration of phytochemical compounds with known antioxidant activity¹²⁻¹⁴. Drug release control from polymeric nanocapsules depends on several events such as desorption, diffusion, particle erosion or the combination of these factors⁷. Moreover, the presence of the oily core in the polymeric nanocapsules and its viscosity characteristics may influence the drug release control properties from nanocapsules^{3,15,16}.

Recently, innovative polymeric nanocapsules called lipid-core nanocapsules (LC-NC) were proposed^{17,18}. They present a different core compared to the original nanocapsules proposed by Fessi and co-workers (1988)¹⁹. Lipid-core nanocapsules are characterized by a lipid core composed of a dispersion of an oil and a solid lipid, as sorbitan monostearate^{5,18}. These studies were carried out using a mixture of medium chain triglycerides, as the oil component of the core. Furthermore, our research group reported recently the development of LC-NC containing RB, SB or SF oil, as potential nanocarriers²⁰. RB, SB or SF oils did not show influence on the physicochemical characteristics of these formulations. In line with the growing interest in using nanomaterials as nanomedicines or nanocosmetics, an *in vivo* model environmental safety evaluation (*Allium cepa* test) showed that LC-NC containing such oils does not offer environmental damage or risk.

Taking these considerations into account, the aim of this work was to evaluate the influence of the type of liquid lipid (vegetable oils) of lipid-core polymeric nanocapsules on the modulation of the drug release profile, using clobetasol propionate as a model drug. Three different oily phases (RB, SB or SF oils) were evaluated. This influence was correlated to the viscosity of such oils and the consistency index of the lipid cores (dispersion of the solid lipid in a liquid lipid) of the nanocapsules.

Fatty acid composition analysis of the vegetable oils by gas chromatography was performed. RB, SB and SF oils were saponified in methanolic KOH solution and then esterified in methanolic H₂SO₄ solution²¹. Fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed

using an Agilent Technologies gas chromatograph (HP 6890) fitted with a capillary column DB-23 (50% cyanopropyl-methylpolysiloxane, 60 m x 0.25 mm x 0.25 μm) and flame ionization detection. The temperature of the injector port and the detector was set at 250°C; the carrier gas was nitrogen (0.6 ml/min). After injection (1 μl , split ratio 50:1), the oven temperature was held at 120°C for 5 min, increased to 240°C at a rate of 4°C min^{-1} , and held at this temperature for 10 min. Standard fatty acid methyl esters (37-component FAME Mix and polyunsaturated fatty acid no. 2 from Sigma, Saint Louis, MO, USA) were run under the same conditions and the subsequent retention times were used to identify the fatty acids. Fatty acids were expressed as percentage of the total fatty acid content. The fatty acids analysis revealed considerable differences between the three vegetable oils (Table 1). The RB oil presents higher concentration of myristic, palmitic and oleic acid than SB and SF oils.

Table 1. Fatty acid composition of rice bran, soybean or sunflower seed oils, expressed in percentage.

	Miristic acid (14:0)	Palmitic acid (16:0)	Stearic acid (18:0)	Oleic acid (18:1)	Linoleic acid (18:2)	Linolenic acid (18:3)
Rice bran oil	0.23	18.88	1.94	40.49	34.21	1.58
Soybean oil	0.04	10.89	3.56	25.58	52.62	5.62
Sunflower seed oil	0.08	9.54	3.63	22.96	58.30	3.98

Lipid-core clobetasol propionate-loaded nanocapsules were prepared ($n=3$) by interfacial deposition of preformed polymer^{17,18}. Briefly, an organic solution containing the solvent (acetone) with a film-forming component [poly(ϵ -caprolactone)], oil (rice bran, soybean or sunflower seed oil) at 3 % (v/v), clobetasol-propionate at 0.5% (v/v) and a solid lipid at room temperature (sorbitan monostearate) at 0.77% (w/v) was added into a non-organic solution that contains water supplemented (0.77 % w/v) by a hydrophilic surfactant (polysorbate 80), under moderate magnetic stirring (10 min). Finally, acetone was removed and the aqueous phase concentrated by evaporation under reduced pressure (bath at 40°C) to a final volume of 25 mL (0.50 mg/mL of drug). The drug-loaded lipid-core nanocapsules containing rice bran, soybean or sunflower seed oils were called as LC-RB-CP, LC-SB-CP or LC-SF-CP, respectively. All formulations were stored at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) and protected from light (amber glass flasks) until analysis.

Total drug content (mg/mL) was determined ($n=3$) after solubilization of the formulations in methanol (1 mL of suspension to 25 mL of methanol) and assayed by previously validated LC method²². Free clobetasol propionate (non-associated to formulations) was determined in the ultrafiltrate by using the ultrafiltration/centrifugation technique (Ultrafree-MC 10,000 MW, Millipore) at 12000 rpm for 5 min. Encapsulation efficiency (%) was determined by the quotient of the drug entrapped and total drug content. pH values of the suspension were determined directly in the formulations using a calibrated potentiometer (MPA-210 Model, MS-Tecnoyon, São Paulo, Brazil). Particle sizes and polydispersity indices ($n=3$) were determined by light diffraction (Mastersizer, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) considering the volume of the particles as well as by photon correlation spectroscopy (3 measures/batch; 2 runs of 30 s/measure, 25 °C) after adequate dilution of an aliquot of the suspensions in purified water (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Zeta potentials were measured using the same instrument at 25°C, after the dilution of the samples in 10 mM NaCl aqueous solution (3 measures/batch; 10 runs/measure at 25 °C). The effect of storage time of the LC-RB-CP, LC-SB-CP and LC-SF-CP formulations was monitored up to 3 months of storage by particle size, polydispersity index, zeta potential and pH. Formulations were stored at room temperature (25± 2°C) and protected from light (amber glass flasks).

All lipid-core nanocapsule formulations showed a unimodal particle size distribution at the nanoscale range (data not showed), regardless the type of vegetable oil. This showed that the quali-quantitative composition of such formulations did not form concomitantly micrometric particles. The physicochemical characteristics of the LC-NC are presented in Table 2.

Table 2. Physicochemical characteristics of lipid-core clobetasol propionate-loaded nanocapsules containing rice bran (LC-RB-CP), soybean (LC-SB-CP) or sunflower seed (LC-SF-CP) oils after preparation ($n=3$).

Formulation	Drug content (mg/mL)	Particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	pH
LC-RB-CP	0.46 ± 0.01	235 ± 7	0.17 ± 0.01	-8.1 ± 0.4	5.3 ± 0.1
LC-SB-CP	0.45 ± 0.03	228 ± 2	0.16 ± 0.03	-7.9 ± 0.7	5.3 ± 0.1
LC-SF-CP	0.49 ± 0.03	231 ± 3	0.16 ± 0.02	-7.8 ± 0.1	5.4 ± 0.1

All formulations showed drug content values in accordance with the theoretical value (0.5 mg/mL) and encapsulation efficiency higher than 99%. The formulations presented particle sizes in the nanometric range scale (228-235 nm), negative zeta potentials around -8 mV, pH values between 5.29 and 5.45 and polydispersity index below 0.18, indicating the homogeneity of the formulations. These characteristics remained unchangeable up to 3 months after the preparation ($p \geq 0.05$). Furthermore, morphological analysis by transmission electron microscopy showed homogeneous spherical-shaped particles, whose diameters were in agreement with those obtained by photon correlation spectroscopy (Figure 1).

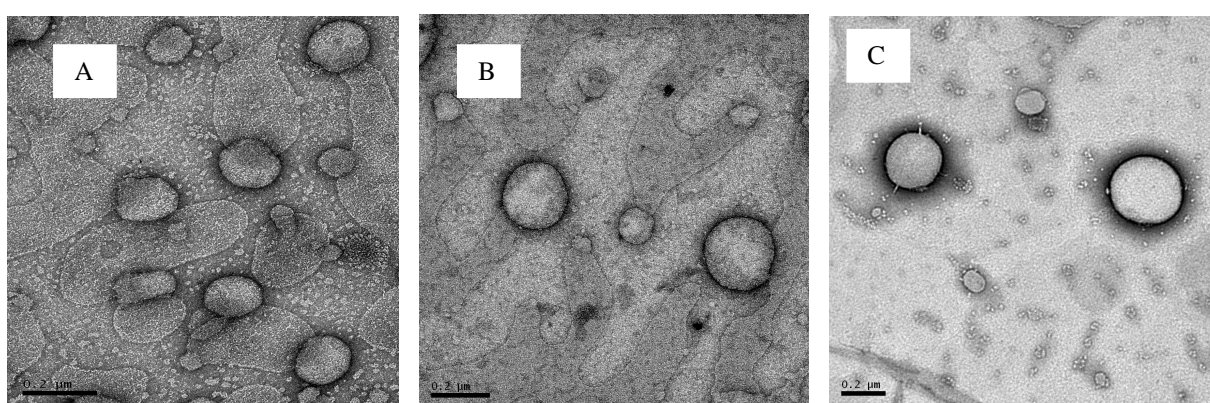


Figure 1. Transmission electron microscopy images of (A) LC-RB-CP, (B) LC-SB-CP and (C) LC-SF-CP [bar = 200 nm (150,000x)].

Considering the statistical analysis, rice bran, soybean or sunflower oil used in the preparation of LC-NC did not show any influence on the physicochemical or encapsulation characteristics ($p > 0.05$).

The *in vitro* CP release profiles from LC-RB-CP, LC-SB-CP and LC-SF-CP were evaluated ($n = 3$) by the dialysis bag method using water/polysorbate 80/polyethylene glycol 400 (60:0.5:40 v/v) pH 7.60 as medium, at 37 °C³. The dialysis bag (Spectra Por 7, 10 Kd) containing 1 mL of the sample (0.5 mg/mL) was put into a 250 ml erlenmeyer which contained 200 mL of release medium under constant moderate stirring. The amount of 2 mL of the external medium was withdrawn from the system at predetermined time interval, replaced by an equal volume of fresh medium and filtered through a 0.45 μm membrane. As control, an ethanolic solution of free clobetasol propionate (CP-ES) at 0.5 mg/mL was prepared in order to evaluate the diffusion of non-encapsulated drug across the dialysis bag. CP was assayed by liquid chromatography²².

Figure 2 shows CP release profiles from LC-RB-CP, LC-SB-CP and LC-SF-CP as well as the diffusion profile of the CP ethanolic solution (CP-ES). CP showed a fast diffusion through the dialysis bag from the CP-ES.

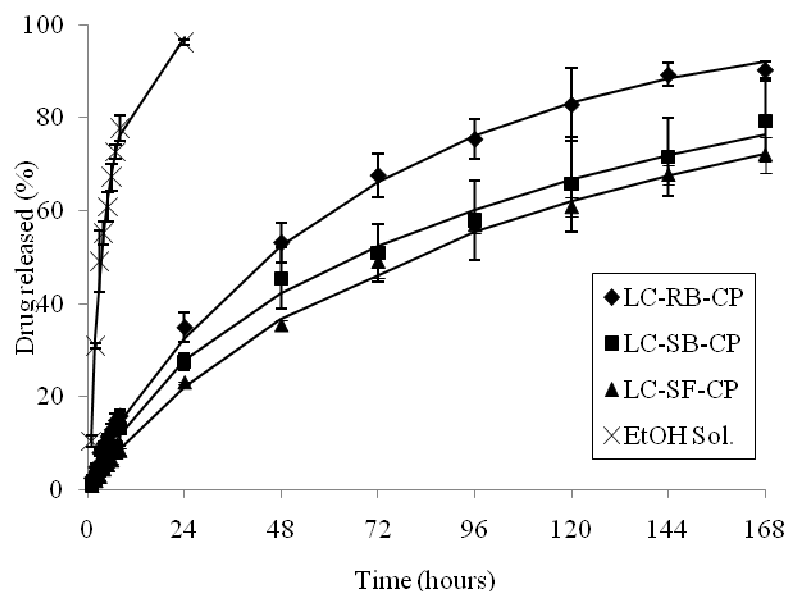


Figure 2. *In vitro* CP release profiles from ethanolic solution (CP-ES) and from lipid-core nanocapsules prepared with rice bran LC-RB-CP), soybean (LC-SB-CP) and sunflower seed (LC-SF-CP) oils. The lines correspond to the fitting to the biexponential equation.

Regarding the drug release profiles from the formulations we can observe that the type of vegetable oil influenced on the drug release control. After 168 hours (7 days), the concentration of clobetasol propionate released from the lipid-core formulation containing rice bran oil (LC-RB-CP) was 0.45 mg/mL. At the same period, the total drug release from the lipid-core nanocapsules containing soybean (LC-SB-CP) or sunflower seed (LC-SF-CP) oils were 0.40 mg/mL and 0.36 mg/mL, respectively.

To better understand the characteristics underlying the drug release profile from LC-NC, a mathematical modeling was performed using MicroMath[®] Scientist[®] for Windows[™] software^{3, 15}. The selection of the model that best fitted the release profiles was based on the best correlation coefficient and the best model selection criteria (MSC), both provided by the software. The model that best described the release profile for all formulations was the biexponential model (Table 3).

Table 3. Rate constants, correlation coefficients, and MSC obtained by fitting the release profiles of clobetasol propionate-loaded from lipid-core nanocapsules formulations containing rice bran (LC-RB-CP), soybean (LC-SB-CP) or sunflower seed (LC-SF-CP) oils according to the biexponential equation.

	LC-RB-CP	LC-SB-CP	LC-SF-CP
k_1 (h ⁻¹)	0.2509 ± 0.1167 ^a	0.0676 ± 0.0170 ^b	0.0510 ± 0.0328 ^b
k_2 (h ⁻¹)	0.0143 ± 0.0020 ^a	0.0076 ± 0.0023 ^b	0.0064 ± 0.0014 ^b
a (mg mL ⁻¹)	0.0840 ± 0.0011 ^a	0.1964 ± 0.0379 ^a	0.1897 ± 0.1087 ^a
b (mg mL ⁻¹)	0.9207 ± 0.0210 ^a	0.8179 ± 0.0307 ^a	0.8157 ± 0.1142 ^a
r (range)	0.9964 ± 0.0063	0.9971 ± 0.0016	0.9995 ± 0.0001
MSC (range)	6.4276 ± 0.5629	4.7962 ± 0.7535	6.3654 ± 0.2003

^{a,b} Means, in line, with the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).

This profile characterizes a biphasic release – an initial burst release followed by a rather slow drug release process. Concentration of CP responsible for the burst (a) and for the sustained (b) release phases from LC-NC ranged between 0.04 and 0.10 mg/mL and 0.41 and 0.46 mg/mL, respectively. These values represent that around 80-90 % of drug was entrapped within LC-NC and that about 10-20% was adsorbed on the particle surface. This result is in agreement with another work of our group where the CP released from lipid-core nanocapsules prepared using a mixture of medium chain triglycerides, was also biexponential. On the other hand, the rate constants for the burst (k_1) and the sustained (k_2) phases among the formulations were statistically different ($p \leq 0.05$). The LC-RB-CP formulation had higher rate constants for both burst and sustained phases ($k_1 = 0.2509 \pm 0.1167$ and $k_2 = 0.0143 \pm 0.0020$) than LC-SB-CP ($k_1 = 0.0676 \pm 0.0170$ and $k_2 = 0.0076 \pm 0.0023$) or LC-SF-CP ($k_1 = 0.0510 \pm 0.033$ and $k_2 = 0.006 \pm 0.001$) formulations.

We hypothesized that the differences between k_1 and k_2 rate constants from the LC-NC formulations could be explained by the solubilization of the polymer by such oils or by differences in their viscosity. The first hypothesis can be discarded due to our previous report showing no significant interaction between these oils and the polymer²⁰. In order to check our second hypothesis, the viscosity of three oils was measured using a Brookfield rotational viscosimeter (model DV II+ PRO, Brookfield Engineering, USA) with an ultra low adapter

(ULA). The data obtained were analyzed with the Rheocalc software (V3.1-1 version, Brookfield, USA). This analysis was carried out at 25, 37 and 50 °C. The viscosity values at 25 °C for RB, SB and SF oils were 59.49, 46.87 and 48.15 mPa.s, respectively. At 37 °C, the RB, SB and SF oils showed viscosity values of 40.7, 33.93 and 33.33 mPa.s, respectively. When the temperature was increased to 50 °C, the viscosity values decreased to 24.09, 21.31 and 21.69 mPa.s for RB, SB and SF oils, respectively. These results showed a linear correlation between the viscosity and temperature for all oils ($r^2 > 0.99$). Analyzing the viscosity values of the different oils, we can observe that there was no relation between their viscosities and the control of drug release, since RB oil had higher viscosity and the LC-NC formulation prepared with this vegetable oil showed lower control of drug release (higher release rates). Thus, the second hypothesis was also refuted.

Considering that the structure of lipid-core nanocapsules presents a dispersion of a liquid oil (in this case, the vegetable oils) and a solid lipid (sorbitan monostearate) in the core, the rheological analysis from this dispersion should be considered. Thus, our third hypothesis was that the type of vegetable oil has influence on the viscosity of this solid dispersion, which is an important factor governing the drug release profile from LC-NC¹⁸. To reproduce the lipid-core of these nanosystems, sorbitan monostearate (SM) and the vegetable oils were mixed at the same concentration used to prepare the formulations¹⁸. RB, SB or SF oils were added (22 mL) into an acetone solution containing SM (5.65 g) previously dissolved. Acetone was removed under reduced pressure and the lipid dispersions containing the rice bran, soybean or sunflower seed oil and sorbitan monostearate were called RB-SM, SB-SM and SF-SM, respectively.

After preparation, all lipid dispersions showed a macroscopic homogeneous solid appearance, like an ointment, regardless of the type of vegetable oil. In order to verify the real influence of the vegetable oils on the viscosity of the dispersion, rheological analysis of the lipid dispersions were analyzed at 50 °C. This temperature was chosen due to the possibility of using the same apparatus as described for the liquid oils. The linear regression observed for the viscosity of liquid oils at different temperatures (25, 37 and 50 °C), as previously commented, supports this analysis.

Considering that all dispersions showed a non-linear curve of shear stress as a function of the shear rate (Figure 3), mathematical models were used to analyze the rheological behavior in order to establish the flow and consistency indices (n and k , respectively) of the different systems.

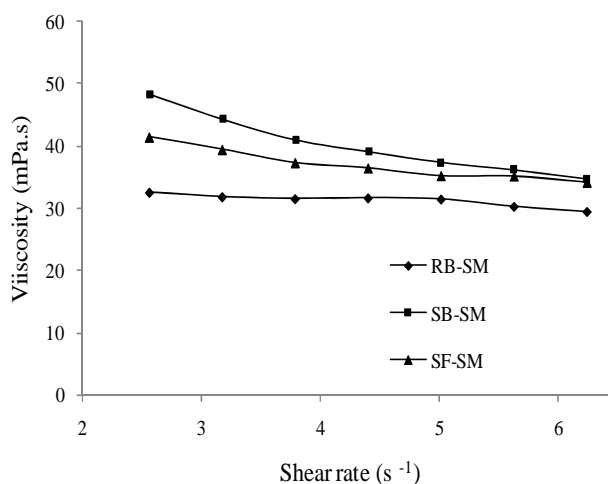


Figure 3. Graphic representation of viscosity (mPa.s) of the dispersions composed by rice bran (RB), soybean (SB) or sunflower seed (SF) oil with the sorbitan monostearate (SM) (RB-SM, SB-SM or SF-SM) in relation to the shear rate (s⁻¹), at 50°C.

The best fitting to the data of the following models were used to calculate these indices at 50°C: Herschel-Bulkley ($\tau = \tau_0 + \kappa\gamma^{0.5}$), Casson ($\tau = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5}\gamma^{0.5}$) and Ostwald ($\tau = \kappa\gamma^{0.5}$). According to the regression coefficient ($r > 0.99$), all lipid dispersions followed the Herschel-Bulkley model. Flow indexes were below 1.0 for all lipid dispersions, regardless of the type of oil, which is related to non-Newtonian pseudo-plastic rheological behaviors²³. Regarding the consistency indices, the RB-SM showed lower consistency index ($k = 31.6$) than SB-SM ($k = 34.5$) and SF-SM ($k = 34.3$). These consistency values can be clearly related to the drug release rates from the lipid-core nanocapsules, confirming our third hypothesis. A good correlation can be found between the consistency indices and the constant rates for the burst release phase ($r^2 = 0.9414$) or the constant rates for the sustained release phase ($r^2 = 0.9814$). Higher consistency index of the core of such nanocapsules led to the higher drug release control in both phases (burst and sustained phases). This way, we demonstrated in this study that the choice of liquid lipid (in this case the vegetable oil) is an important factor governing the control of drug release from LC-NC.

In conclusion, lipid-core nanocapsules prepared with rice bran, sunflower or soybean oil present adequate physicochemical properties regarding their nanometric characteristics. *In vitro* drug release study from LC-NC formulations showed a biphasic controlled release profile of clobetasol propionate, regardless of the type of vegetable oil. However, the control of the drug release could be modulated changing the liquid lipid due to its influence on the consistency indices of the resulting solid lipid dispersions (liquid lipid plus solid lipid) which composes the core of these nanocapsules. Therefore, the choice of the liquid lipid (oil) helps

to modulate the control of drug release from lipid-core nanocapsules during the development of nanomedicines.

Acknowledgements:

The authors thank the financial support of Rede Nanocosméticos/CNPq, SCT-RS, INCT_if, CAPES/Brazil and CNPq/Brazil. L. A. Rigo thanks CAPES/Brazil for his master fellowship.

REFERENCES

1. W. He, S.W. Horn, M. D. Hussain. Improved bioavailability of orally administered mifepristone from PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 334, 173-78, (2007).
2. A.F. Ourique, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, and R.C.R. Beck. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int. J. Pharm.* 352, 1-4, (2008).
3. M. C. Fontana, K. Coradini, S. S. Guterres, A. R. Pohlmann, and R. C. R. Beck. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. *J. Biom. Nanotechnol.* 5, 1-10, (2009).
4. M. C. Fontana, K. Coradini, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, and R. C. R. Beck. Nanocapsules Prepared from Amorphous Polyesters: Effect on the Physicochemical Characteristics, Drug Release, and Photostability. *J. Biom. Nanotechnol.* 10, 1-10, (2010a).
5. A.F. Ourique, S. Azoubel, V.C. Ferreira, C.B. Silva, M.C.L. Marchiori, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, and R.C.R. Beck. Lipid-core nanocapsules as a

- nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. *J. Biomed. Nanotechnol*, 6, 1-10, (2010).
6. J.S. Almeida, F. Lima, S. Da Ros, L.O.S. Bulhões, L.M. Carvalho, and R.C.R. Beck. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale. Res. Lett.* 5, 1603-10, (2010).
 7. C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, and A. Elaissari. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. of Pharm.* 385, 113-42, (2010).
 8. N.S. Santos-Magalhães, A. Pontes, V.M.W. Pereira, and M.N.P. Caetano. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm*, 208, 71-80, (2000).
 9. V.C.F. Mosqueira, P. Legrand, H.P. Alphanbary, F. Puisieux, and G. Barratt. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci*, 89, 614-26, (2000).
 10. R.B. Friedrich, M.C. Fontana, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, and R.C.R. Beck, Development and characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. *Quim. Nova*, 5, 1131-36 (2008).
 11. J.S. Almeida, L. Jezur, M.C. Fontana, K. Paese, C.B. Silva, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, and R.C.R. Beck. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. *Lat. Am. J. Pharm.* 28, 165-72, (2009).
 12. M.H. Chen, and C.J. Bergman. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol contents. *J. Food. Compos. Anal.* 18, 139-51, (2005).

13. L. Amadou, S. Yong-Hui, L. Sun L, and Guo-Wei. Fermented soybean products: some methods, antioxidant compound extraction and their scavenging activity. *Asian. J. Biochem.* 3, 68-76, (2009).
14. G. Perreti, E. Finotti, S. Adamuccio, R. Della Sera, and L. Montanari. Composition of organic and conventionally produced sunflower seed oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 81, 1119-23, (2004).
15. L. Cruz, L. Soares, T. Dalla-Costa, G. Mezzalira, N. P. da Silveira, S.S. Guterres, and A.R. Pohlmann. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int. J. Pharm.*, 313, 198-205, (2006).
16. M.M.A. Abdel-Motaleb, D. Neumann, and A. Lamprecht, In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). *Int. J. Pharm.* 390, 208-213 (2010).
17. C. R. Müller, S.R. Schaffazick, A.R. Pohlmann, T.D. Costa, N.P. Silveira, L.D.L. Freitas, and S.S.Guterres. Spray-dried diclofenac-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres characterization. *Pharmazie* 56, 864-7, (2001).
18. E. Jäger, C.G.Venturini, F.S. Poletto, L.M. Colomé, J.P.U. Pohlmann, A. Bernardi, A.M.O. Battastini, S.S. Guterres, and A. R. Pohlmann. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *J. Biomed. Nanotech.*, 5, 130-40 (2009).
19. H. Fessi, J. P. De vissaguet, F. Puisieux, C. Thies, Procédé de préparation des systèmes colloïdaux d'une substance sous forme de nanoparticules. European Patent 0275796 A1 (1988).
20. L.A.Rigo, V. Frescura, L. A. Fiel, A. F. Ourique, S. B. Tedesco, C. B. Silva, S.S.Guterres, A. R. Pohlmann, and R. C. R. Beck. Lipid-core nanocapsules containing alternative vegetable oils: development and *in vivo* genotoxicity study. *Sci. Total Environ.*, (2010). *To be submitted.*

21. L. Hartman, and B.C. Lago. A rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Practice*, 22, 475-77, (1973).
22. M.C. Fontana, M.O. Bastos, and R.C.R. Beck. Development and validation of a fast RP-HPLC method for the determination of clobetasol propionate in topical nanocapsule suspensions. *J. Chromatogr. Sci.* 8, 637-40, (2010b).
23. R. P. Chhabra, and J. F. Richardson, Editors, *Non-newtonian flow and applied rheology: engineering applications*, Butterworth Heinemann, Oxford (2008).

DISCUSSÃO GERAL

O estado do Rio Grande do Sul é tradicionalmente reconhecido no cenário nacional como um dos estados líderes na produção de grãos, cereais e oleaginosas, destacando-se no cultivo de arroz, soja e girassol (IBGE, 2010). Os óleos vegetais obtidos a partir do produto, no caso da soja e do girassol, e do subproduto, no caso do óleo de arroz, destas culturas têm sido amplamente estudados em relação ao metabolismo de lipídios endógenos (efeitos anti-hiperlipidêmicos e anti-arterioscleróticos), devido à atividade antioxidante de compostos polifenólicos presentes nestes óleos (JULIANO *et al.*, 2005; AUSMANN *et al.*, 2005; SIGER *et al.*, 2006; WILSON *et al.*, 2007). Compostos com atividade antioxidante são produtos de interesse para a indústria farmacêutica e cosmética porque há grande envolvimento dos radicais livres na progressão de doenças cardiovasculares e cutâneas (ICHIHASHI *et al.*, 2003; BRUCKDORFER, 2006).

Partindo destas considerações, foi estudada neste trabalho a viabilidade tecnológica de desenvolver formulações cosméticas fotoprotetoras (géis-creme) e de base nanotecnológica (nanocápsulas de núcleo lipídico) contendo os óleos de arroz, soja ou girassol, avaliando-se as propriedades físico-químicas e a influência de cada tipo de óleo sobre as características de cada formulação.

Considerando a tendência mundial em desenvolver produtos fotoprotetores com concentração reduzida de substâncias sintéticas e contendo compostos bioativos oriundos de produtos naturais, formulações fotoprotetoras foram preparadas contendo os óleos de arroz ou soja em duas concentrações distintas (3 e 5 %), utilizando a BZ3 como filtro solar químico (Capítulo 1). Formas farmacêuticas do tipo gel-creme foram escolhidas a fim de obter um produto com menor concentração de lipídios e conferir um aspecto menos untuoso às formulações, cujas características são fundamentais na preferência de produto fotoprotetor. A influência da presença destes óleos vegetais na formulação foi avaliada quanto ao pH, comportamento reológico, espalhabilidade e fator de proteção *in vitro*.

Após o preparo, as formulações apresentaram aspecto homogêneo e coloração ligeiramente esverdeada em razão da coloração natural predominante dos próprios óleos vegetais utilizados, com valores de pH compatíveis para o uso cutâneo. Com relação à baixa solubilidade aquosa da BZ3, o uso de ambos os óleos vegetais a 3 ou 5% foram suficientes para solubilizar e incorporar a BZ3 de forma adequada nas formulações. Para fins comparativos, formulações sem a presença da BZ3 foram preparadas, cujos valores de pH

foram similares em relação às formulações contendo a BZ3. A análise estatística confirmou que a presença da BZ3 ou dos óleos vegetais nas diferentes concentrações avaliadas não influenciou significativamente os valores de pH ($p > 0.05$). Por outro lado a presença da BZ3 nas formulações influenciou significativamente a característica da espalhabilidade, sendo que as formulações preparadas com BZ3 apresentaram um menor fator de espalhabilidade em comparação com as formulações sem a BZ3 ($p \leq 0.05$). Com relação à presença dos óleos vegetais, as formulações com maior concentração de óleo apresentaram um melhor perfil de espalhabilidade, independentemente do tipo de óleo vegetal. Considerando que a topografia da pele é bastante irregular, um produto fotoprotetor deve espalhar facilmente sobre a área aplicada a fim de garantir a eficácia do produto (TANNER, 2006).

A viscosidade das formulações semissólidas está relacionada com o seu perfil de espalhabilidade. Além disso, as características de viscosidade também influenciam nas etapas do processo de fabricação das formulações bem como a retirada do produto da embalagem. Portanto, a compreensão do comportamento reológico das formulações semissólidas, principalmente as formulações fotoprotetoras, é de fundamental importância (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003). As formulações fotoprotetoras devem apresentar comportamento reológico não-Newtoniano preferencialmente com perfil pseudo-plástico. Sendo assim a viscosidade da formulação diminui no momento da aplicação, espalhando de maneira uniforme, sendo capaz de formar um filme homogêneo e cobrindo toda a área aplicada.

Todas as formulações preparadas apresentaram comportamento reológico não-Newtoniano pseudo-plástico, onde as curvas de fluxo ascendentes e descendentes não são lineares, independentemente da presença da BZ3 ou dos óleos vegetais nas diferentes concentrações. Porém, as formulações sem a presença de BZ3 apresentaram menores valores de tensão de cisalhamento em relação às formulações contendo BZ3, demonstrando a influência que a BZ3 exerce sobre as características reológicas. Além disso, entre os modelos matemáticos utilizados para tratamento dos dados todas as formulações seguiram o modelo Herschel-Bulkley, onde os índices de fluxo calculados foram abaixo de 1.0, confirmando o comportamento pseudo-plástico das formulações (CHHABRA & RICHARDSON, 2008). Nas formulações contendo BZ3 não houve influência da concentração dos óleos vegetais no índice de consistência ($p > 0.05$); entretanto, o tipo de óleo influenciou esta característica. As formulações contendo óleo de arroz apresentaram maiores índices de consistência que aquelas preparadas com óleo de soja. Este fato pode ser explicado pela viscosidade superior do óleo de arroz (67.87 ± 3.40 mPa.s) em relação ao óleo de soja (53.37 ± 0.17 mPa.s).

Por fim, o primeiro capítulo encerra com a avaliação da influência dos óleos vegetais sobre o FPS *in vitro*. Como controle, uma formulação contendo somente BZ3 foi preparada. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores de FPS das formulações contendo ou não BZ3, independente do tipo de óleo ou concentração utilizada ($p > 0.05$). Isto indica que não houve interação entre a BZ3 e os óleos vegetais, confirmando o potencial uso destes óleos vegetais neste tipo de formulação pela sua não interferência com a fotoproteção. Assim, demonstramos pela primeira vez a promissora viabilidade de utilizar os óleos de arroz ou de soja em formulações cosméticas fotoprotetoras inovadoras contendo BZ3 com propriedades físico-químicas e reológicas adequadas.

O segundo capítulo abordou desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo os óleos de arroz, soja ou girassol como matérias-primas lipídicas alternativas no preparo desses nanosistemas. As formulações foram preparadas pelo método da deposição do polímero pré-formado, usando a poli (ϵ -caprolactona) como polímero biodegradável. As formulações foram caracterizadas quanto ao pH, diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, análise morfológica através da microscopia eletrônica de transmissão, análise reológica, estabilidade física relativa e em função do tempo (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). A compatibilidade dos óleos vegetais com o polímero utilizado também foi avaliada através do teste de inchamento do polímero. Além disso, a fim de avaliar um possível impacto ambiental, as formulações preparadas foram submetidas a um estudo *in vivo* de genotoxicidade. Existem alguns estudos disponíveis na literatura sobre o preparo de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de soja ou de girassol (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000; MOSQUEIRA *et al.*, 2000; FRIEDRICH *et al.*, 2008; OURIQUE *et al.*, 2008) e nenhum estudo sobre o preparo de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo algum dos três óleos selecionados neste estudo (óleos de arroz, soja ou girassol).

Primeiramente, o experimento de inchamento do polímero foi conduzido como um teste de pré-formulação a fim de avaliar se os óleos de arroz, soja ou girassol são matérias-primas adequadas para a preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico. O polímero permaneceu em contato com os óleos vegetais por um período de trinta dias consecutivos, cujo peso do material polimérico não apresentou diferença estatística durante o tempo experimental ($p > 0.05$), demonstrando que tais óleos não reagem com a poli (ϵ -caprolactona) e podem ser utilizados no desenvolvimento desses nanocarreadores. As nanopartículas apresentaram distribuição de tamanho de partícula unimodal dentro da faixa nanométrica, independentemente do tipo de óleo, sem a formação concomitante de micropartículas. O polímero desempenhou um papel fundamental para esse resultado, visto que as nanoemulsões,

também preparadas contendo os óleos vegetais para fins comparativos, apresentaram uma distribuição de tamanho de partícula dentro da faixa micrométrica. Por esse motivo, a continuidade das análises foi realizada somente com as suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico.

As formulações apresentaram pH entre 5 e 5.5, potencial zeta negativo e índice de polidispersão abaixo de 0,2, sem diferença estatística entre as formulações preparadas com os três os óleos vegetais ($p > 0.05$). Esses resultados apresentados pelas formulações coloidais estiveram de acordo com os valores normalmente encontrados para as nanocápsulas de núcleo lipídico (JÄGER *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2010). Com relação ao perfil reológico, todas as formulações apresentaram um comportamento Newtoniano, o que sugere o uso deste tipo de formulação no desenvolvimento de formulações de administração parenteral (ALLAHAM *et al.*, 2004; OURIQUE *et al.*, 2010).

Com o objetivo de obter informações sobre a estabilidade física das formulações, análises de espalhamento múltiplo de luz (transmissão e retroespalhamento) foram realizadas. Os resultados demonstraram que as formulações não apresentaram qualquer evidência de fenômenos de instabilidade típicos de suspensões coloidais como agregação, floculação ou coalescência. Através da estabilidade das formulações em função do tempo, pode-se observar um ligeiro aumento do potencial zeta (em módulo) para todas as formulações, o que pode contribuir de maneira positiva para a estabilidade dos nanossistemas. Esses resultados estão de acordo com outros estudos de estabilidade realizados com nanocápsulas contendo triglicerídeos de cadeia média (TCM) como conteúdo lipídico (FONTANA *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*; 2010).

O estudo de genotoxicidade *in vivo* demonstrou que os nanossistemas desenvolvidos não oferecem riscos ao meio ambiente, independente do tipo de óleo vegetal. A análise genética das células das raízes da cebola após o contato com as formulações não apresentou aberrações cromossômicas consideráveis em comparação com o controle positivo. Estes resultados estão de acordo com formulações de nanocápsulas convencionais contendo somente um óleo líquido dentro da cavidade polimérica (FACHINETTO *et al.*, 2008; MARCHIORI *et al.*, 2010).

O terceiro e último capítulo apresentou a preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo um fármaco modelo e a influência do tipo de óleo vegetal sobre as suas propriedades de liberação *in vitro*. A análise dos componentes lipídicos dos óleos vegetais por cromatografia gasosa também foi realizada. Diferenças consideráveis entre a

composição dos três óleos vegetais pode ser observada. O óleo de arroz apresentou maior predomínio dos ácidos palmítico, mirístico e linoléico do que os óleos de soja e girassol.

Após o preparo, as formulações de nanocápsulas apresentaram teor de fármaco próximo ao teórico, eficiência de incorporação próxima a 100 %, pH em torno de 5,0, potencial zeta negativo, índice de polidispersão abaixo de 0,2 e diâmetro médio de partícula na faixa nanométrica, com partículas apresentando morfologia esférica regular. Na comparação dos resultados obtidos entre as formulações contendo o fármaco modelo com aqueles obtidos a partir das formulações sem a presença do fármaco (Capítulo 2) não foi possível observar a influência da presença do fármaco sobre as características físico-químicas dos nanossistemas. Os resultados de diâmetros médios, índices de polidispersão e potenciais zeta apresentados pelas formulações coloidais estiveram de acordo com os valores normalmente encontrados para este tipo de nanopartícula (ALMEIDA *et al.*, 2009; JÄGER *et al.*, 2009; FONTANA *et al.*, 2009; FONTANA *et al.*, 2010; OURIQUE *et al.*, 2010).

Os resultados da estabilidade das formulações em função do tempo de armazenamento também demonstraram um aumento do potencial zeta (em módulo) para todas as formulações, contribuindo com a estabilidade dos nanossistemas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os parâmetros de pH, potencial zeta e tamanho médio de partícula permaneceram estáveis durante o período de armazenamento, conforme também com os resultados observados nas formulações preparadas sem a presença do fármaco (Capítulo 2).

O estudo da liberação *in vitro* do fármaco modelo a partir das nanopartículas foi realizado através do método dos sacos de diálise, onde foi observado que tipo de óleo vegetal influenciou na liberação do fármaco modelo. Em um período de 168 horas, as nanocápsulas contendo o óleo de girassol apresentaram maior controle de liberação com 0,36 mg/mL de fármaco liberado enquanto que as formulações contendo os óleos de soja e arroz liberaram 0,40 e 0,45 mg/mL, respectivamente. De acordo com a modelagem matemática, para todas as formulações de nanocápsulas, foi observada uma rápida liberação inicial seguida de uma liberação mais lenta do fármaco seguindo o modelo biexponencial. Através da modelagem também foi demonstrado que em torno de 80-90 % do fármaco encontra-se retido no interior das nanocápsulas e que cerca de 10-20 % está adsorvido na sua superfície, independente do tipo do tipo de óleo vegetal. Entretanto, a suspensão de nanocápsulas contendo óleo de arroz apresentou diferença significativa nas constantes das fases lenta e rápida de liberação em comparação com as outras formulações preparadas com os óleos e soja ou girassol ($p \leq 0.05$). Primeiramente, levantou-se a hipótese de que os óleos vegetais estariam solubilizando o polímero em diferentes graus; porém, isto não explica essa diferença visto que os óleos são

compatíveis com o polímero, conforme observado nos estudos de inchamento apresentado no Capítulo 2. A nossa segunda hipótese considerava que a diferença de viscosidade entre os óleos vegetais governasse a velocidade da liberação, ou seja, o óleo vegetal que apresentasse maior viscosidade proporcionaria maior controle da liberação. Esta análise foi feita em diferentes temperaturas: 25, 37 e 50 °C. A análise reológica dos óleos vegetais puros demonstrou que o óleo de arroz possui maior viscosidade do que os óleos de soja e de girassol independentemente da temperatura. Estes resultados apresentaram correlação linear entre viscosidade e temperatura para todos os óleos ($r^2 > 0.99$); porém, através destes dados, também não foi possível atribuir alguma relação entre as viscosidades dos óleos vegetais e o controle da liberação uma vez que o óleo de arroz apresentou maior viscosidade e a formulação de nanocápsulas preparada com este óleo apresentou menor controle da liberação. Assim, a segunda hipótese também foi desconsiderada.

Considerando que o núcleo das nanocápsulas de núcleo lipídico é formado pela dispersão de um lipídio sólido em um lipídio líquido, a análise reológica dessa dispersão foi realizada. Sendo assim, nossa terceira hipótese foi investigar se haveria influência do tipo do óleo vegetal na viscosidade das dispersões lipídicas. As dispersões lipídicas foram reproduzidas nas mesmas concentrações utilizadas no preparo das formulações.

A análise reológica das dispersões lipídicas foi realizada a 50°C. Esta temperatura foi escolhida para que fosse permitido utilizar o mesmo acessório do viscosímetro utilizado para as análises dos óleos vegetais puros. Todas as dispersões lipídicas apresentaram curvas de fluxo de tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento não-lineares. Entre os modelos matemáticos utilizados para descrever o comportamento reológico das dispersões, todas seguiram o modelo Herschel-Bulkley, com índices de fluidez abaixo de 1.0, o que caracteriza um comportamento não-Newtoniano pseudo-plástico.

Considerando o índice de consistência das dispersões lipídicas, a dispersão contendo óleo de arroz apresentou menor valor do que as outras dispersões contendo os óleos soja ou de girassol. Com esse resultado podemos atribuir o controle da liberação do fármaco a partir das formulações de nanocápsulas, o que confirma nossa terceira hipótese. As formulações de nanocápsulas que apresentaram maior controle da liberação do fármaco foram aquelas onde foram observados os maiores valores de índice de consistência da dispersão lipídica. Através disso, ficou demonstrado que o controle da liberação a partir destas formulações de nanocápsulas foi modulado pelo tipo de óleo vegetal devido à sua influência sobre o índice de consistência da dispersão lipídica que compõe o núcleo das nanocápsulas.

CONCLUSÕES

- Foi possível a preparação de formulações cosméticas fotoprotetoras do tipo gel-creme com os óleos de arroz ou de soja nas concentrações de 3 e 5% contendo BZ3 como filtro solar orgânico. A presença destes óleos vegetais em ambas as concentrações não alterou as características de pH, nem o comportamento reológico das formulações (pseudoplasticidade e tixotropia);
- As formulações fotoprotetoras desenvolvidas apresentaram valor de FPS em torno de 10, independente do óleo vegetal e da concentração utilizada. Entretanto, as formulações contendo maior concentração de óleo apresentaram melhor perfil de espalhabilidade em comparação com as formulações preparadas com menor concentração de óleo;
- Foi possível a preparação de formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo os óleos de arroz, soja e girassol. Estas nanopartículas apresentaram pH médio de 5, tamanho de partícula nanométrico, baixo índice de polidispersão e potencial zeta negativo. Estes parâmetros permaneceram estáveis até 3 meses de armazenamento com exceção do potencial zeta, que sofreu um leve aumento (em módulo). Considerando os fenômenos de instabilidade física, este resultado é positivo. Além disso, as formulações apresentaram forma esférica e comportamento reológico Newtoniano, característica que interessa para o desenvolvimento de formulações de administração intravenosa;
- Pode-se sugerir que nenhuma das formulações de nanocápsulas desenvolvidas contendo os óleos estudados oferece riscos ao meio ambiente, uma vez que não houve evidências de efeitos genotóxicos através do estudo *in vivo* em modelo vegetal;
- As formulações de nanocápsulas contendo o fármaco modelo também apresentaram parâmetros físico-químicos adequados, comparáveis com aqueles das nanocápsulas sem a presença do fármaco, indicando que essas formulações podem ser utilizadas como nanocarreadores de fármacos. Além disso, o estudo da liberação *in vitro*

demonstrou que a diferença entre os índices de consistência das dispersões lipídicas que compõem o núcleo das formulações governou o controle da liberação do fármaco. A modelagem matemática demonstrou o comportamento biexponencial da liberação do fármaco para todas as formulações.

- Os trabalhos realizados apontam que os óleos de arroz, soja ou de girassol podem ser utilizados como fonte alternativa de matéria-prima lipídica no preparo de formulações fotoprotetoras do tipo gel-creme e de formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFAQ.; F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of biochemistry and Biophysics**, artigo em impressão, 2010.

ALLAHAM, A.; STEWART, P., MARRIOT, J.; MAINWARNING, D.E. Flow and injection characteristics of pharmaceutical parenteral formulations using a micro-capillary rheometer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, p. 139-148, 2004.

ALMEIDA, J.S.; LIMA, F.; DA ROS, S.; BULHÕES, L.O.S.; CARVALHO, L.M.; BECK, R.C.R. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 1603-16-10, 2010.

ALMEIDA, J. S.; JEZUR, L.; FONTANA, M. C.; PEASE, K.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 165-172, 2009.

ALONSO, M. J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 168-172, 2004.

ANVISA. Resolução RDC nº 79, de 28 de agosto de 2000. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 31 ago. 2000. Disponível em:
<http://w3.ufsm.br/ppgq/site/media/mdt_ufsm_2010.pdf>

AUSMANN, L. M.; RONG, N.; NICOLOSI R. J. Hypocholesterolemic effect of physically refined rice bran oil: studies of cholesterol metabolism and early atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v 16, p. 521–529, 2005.

BARRENA, R.; CASALS, E.; COLÓN, J.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A.; PUNTES, V. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. **Chemosphere**, v. 75, p. 850-857, 2009.

BENSON, H. A. E. Efficacy, skin penetration and toxicological aspects. In: WALTERS, K.A.; ROBERTS, M.S (Org.). **Dermatologic, cosmeceutic and cosmetic development**. New York: Informa Healthcare, 2008.p. 419-435.

BERNARDI, A.; ZILBERSTEIN, A.C.C.V.; JÄGER, E.; CAMPOS, M.M; MORRONE, F.B.; CALIXTO, J.B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BATTASTINI, A.M.O. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p.1104-1111, 2009.

BRUCKDORFER, K.R. Antioxidants and CVD. **Proceeding of the Nutrition Society**, v. 67, 214-222, 2008.

BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G. GOLIMOWSKI, J.; URBAN, P. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management, **Waste Management**, v. 29, p. 2587-2595, 2009.

CASTANEDO-TARDAN, M.P.; ZUG, K.A. Patterns of cosmetic contact allergy. **Dermatology Clinic**, v. 27, p. 265-280, 2009.

CHHABRA, R. P., RICHARDSON, J. F. **Non-Newtonian flow and applied rheology: engineering applications**. 2^a ed. 2008. 518 p.

COUVREUR, P. VAUTHIER, C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 1417-1450, 2006.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, 198-205, 2006.

DIFFEY, L.; TANNER, B.S.; MATTS, P.; NASH, F. In vitro assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal of American Academy Dermatology**, v. 43, p. 1024-1035, 2000.

DREHER, D., JUNOD, A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **European Journal of Cancer**, v.32A, p. 30-38, 1996.

FACHINETTO JM, OURIQUE AF, LUBINI G, TEDESCO SB, BECK RCR. Tretinoin-loaded polymeric nanocapsules: Evaluation of the potential to improve the antiproliferative activities on *Allium cepa* root-tip compared to the free drug. **Latin American Journal of Pharmacy**, 2008; 27:668–73.

FERRARI, M.; OLIVEIRA, M.; NAKANO, A.; ROCHA-FILHO, P.A. Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 626-630, 2007.

FLOR J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M.A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, p.153-158, 2007.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988a.

FISKEJO, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of Federal Regulations**. In: Title 21. Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=352&showFR=1>>

FONTANA, M.C.; KORADINI, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R. Nanoencapsulation as way to control de release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 1-10, 2009a.

FONTANA, M.C.; KORADINI, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the physicochemical characteristics, drug release, and photostability. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, p. 1-9, 2010.

FRIEDRICH, R. B., FONTANA, M. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, p. 1131-1136, 2008.

GABRIELLE-MALDEMONT, C.; LESIEUR, S.; OLLIVON, M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. **Journal of Biomedical and biophysics methods**, v. 56, p.189-217, 2004.

GALLAGHER, R.P.; LEE, T. K. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. **Progress in Biophysics Molecular Biology**, v. 92, 119-131, 2006.

GARLAND, C.F.; GORHAM, E.; MOHR, S.; GARLAND, F. Vitamin D for cancer prevention: Global perspective. **Epidemiology**, v. 19, p. 468-483, 2009.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS.; P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 35-44, 2003.

GUPTA, M.K. Sunflower oil. In: GUNSTONE, F.D. (Org). **Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses**. Boca Raton: Blackwell Publishing, 2002, p. 128-155.

GONZALES, S.; FERNANDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, 614-616, 2008.

IBGE. **Indicadores**. In: Indicadores do IBGE. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201010comentarios.pdf>

IRGA. **Informações e mercado**. In: Semeadura e colheita de arroz no RS: Safra 2010/2011. Disponível em:
<http://www.irga.rs.gov.br/uploads/anexos/1292943501Semeadura_e_Colheita_do_Arroz_no_RS__Safra_2010_2011.pdf>

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced damage skin. **Toxicology**, v. 189, p. 21-39, 2003.

INCA. **Publicações**. In: A situação do câncer no Brasil. Disponível em:
http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=471

ISMAIL, A.; MARJAN, Z. M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v. 87, p. 581-586, 2004.

JÄGER, E.; VENTURINI, C.G.; POLETTO F.S.; COLOMÉ LM.; POHLMANN J.P.U.; BERNARDI A.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130-140, 2009.

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M.C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, p. 146-154, 2005.

JUNQUEIRA, L.C, CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11° ed. 2008. 524 p.

JOSHI, M.; MÜLLER, R. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 161-172, 2009.

KARLSSON, I.; HILLESTROM, L.; STENFELDT, A.L.; MARSTENSONN, J.; BÖRJE, A. Photodegradation of Dibenzoylmethanes: Potential Cause of Photocontact Allergy to Sunscreens. **Chemicals Research Toxicology**, v.22, 1881-1892, 2009.

KAWASAKY, E.; PLAYER, A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. **Nanomedicine**, v. 1, p. 101-109, 2005.

KNOLL, M.F.; SILVA, A.C.F.; CANTODOROW, T.S.; TEDESCO, S.B. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetic Molecular Biology**, 29, p. 539-42, 2006.

KULLAVANNIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. **Journal American Academy of Dermatology**, v. 52, p. 937-958, 2005.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v, 75, 1-18, 2010.

KUMARI, M.; MUHERJEE, N.; CHANDRESAKARAN, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. **Science of the total environment**, v. 407, p. 5243-5246, 2009.

LAGUNA, C.; CUADRA, J.; MARTIN-GONZALEZ, B.; ZARAGOZA, L.; MARTINEZ-CASIMIRO, L.; ALEGRE, V. Allergic Contact Dermatitis to Cosmetics. **Actas Dermosifiliogr**, v.100, p. 53-60, 2009.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H.C.; PITTELKOW, R. Photoprotection. **The Lancet**, v. 370, p. 528-537, 2007.

LEE, C.H.; MOTURI, V. YUGYUNG, L. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, 88-98, 2009.

LINAZASORO, G. Potential applications of nanotechnologies to Parkinson's disease therapy. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 14, p. 383-392.

LOGUERCIO, C.; FEDERICO, A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, p. 1-10, 2003.

LOGT, M.J.; ROELOFS, M.J.; WOBBS, T.; NAGENGAST, F.M.; PETERS, W.H.M. High oxygen radical production in patients with sporadic colorectal cancer. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 182-187, 2005.

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

MIYAZAKI, K.; ISLAM, N. Nanotechnology systems of innovation—An analysis of industry and academia research activities. **Techinovation**, v. 27, p. 661-675, 2007.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p.113-142, 2010.

MÜLLER, C.R, SCHAFFAZICK SR, POHLMANN AR, COSTA TD, SILVEIRA NP, FREITAS LDL, GUTERRES SS. Spray-dried diclofenac-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres characterization. **Pharmazie**, v. 56, p. 864-7, 2001.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; ALPHANDARY, H.P.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 614-626, 2000.

NASH, J.F. Human safety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen products. **Dermatologic Clinics**, v. 24, p. 35-51, 2006.

NELSON D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3. ed. Sarvier, 2002.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatology Research**, v. 302, p. 1-19, 2010.

NIEMI, G.; McDONALD. Application of ecological indicators. **Annual Review Of Ecology Evolution And Systematics**, v. 35, p. 89-111, 2004.

NOHYNEK, G.; SCHAEFER, H. Benefit and risks of Organic Ultraviolet Filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, p. 285-299, 2001.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, p. 5-22, 2007.

OURIQUE, A.; 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, 1-4, 2008.

OURIQUE, A.F.; AZOUBEL, S.; FERREIRA, V.C.; SILVA, C.B.; MARCHIORI, M.C.L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, 1-10, 2010.

PAUCAR-MENACHO, L.M.; SILVA, L.H.; SANT'ANA, A.S.; GONÇALVES, L.A.G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do γ -orizanól. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 27, p. 45-53, 2007.

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

PERUGINI, P; VETTOR, M.; RONA, C.; TROISTI, L.; VILLANOVA, L.; GENTA, I.; CONTI, B.; PAVANETTO, F. Efficacy of oleoprein against UVB irradiation: preliminary evaluation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, p. 113-120, 2008.

ROSENTHAL A.; PYLE, D.L.; NIRANJAN, K. Aqueous and enzymatic process for edible oil extraction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 402-420, 1996.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p.71-80, 2000.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S; MOSQUEIRA, V.C.F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 560-575, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

SIES, H.; STAHL, W. Nutritional protection against skin damage from sunlight. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, p. 173-200, 2004.

SIGER, A.; NOGALA-KALUCKA, M.; LAMPART-SZCZPA, E. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plants oils. **Journal of Food Lipids**, v. 15, 137-149, 2007.

SNITOWSKA, M. JANICKI, S.; DABROWSKA, E.; ZUROWSKA-PRYCZWOSKA. Submicron emulsions as drug carriers Studies on destabilization potential of various drugs. **European Journal of Pharmaceutics**, v. 12, p.175-179, 2001.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M., KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

TANNER, P. R. Sunscreen Product Formulation. **Dermatologic Clinic**, v. 24, p. 53-62, 2006.

TARGOKLU, M.; CIRGIRGIL, N. Evaluation of black tea gel and its protection potential against UV. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, p. 437-442, 2007.

VELASCO, M. V. R.; SARRUF, F. D.; SALGADO-SANTOS, I. M. N.; HAROUTIANIAN-FILHO, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A.R. Broad spectrum bioactive sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 50-57, 2008a.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALLI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO T. M.; BABY, A. R. Associação da Rutina com *p*-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação *In Vitro* da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 23-27, 2008b.

WANG, L.; MUHAMMED, M. Synthesis of zinc oxide nanoparticles with controlled morphology. **Journal of Materials Chemistry**, v. 9, p. 2871-2878, 1999.

WANG, Q.S.; STANFIELD, J.W. OSTERWALDER, U. In vitro assessments of UVA protection by popular sunscreens available in the United States. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 59, p. 934-942, 2008.

WILSON, T. A.; NICOLOSI, R. J.; WOOLFREY, B.; KRITCHVSKY, D. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, 105-112, 2007.

ZHANG, Y.; ZHU, S.; YIN, L.; QIAN, F.; TANG, C.; YIN, C. Preparation, characterization and biocompatibility of poly(ethylene glycol)-poly(n-butyl cyanoacrylate) nanocapsules with oil core via miniemulsion polymerization. **European Polymer Journal**, v. 44, p. 1654-1661, 2008.