



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014018588-7 A2



(22) Data do Depósito: 28/07/2014

(43) Data da Publicação: 10/05/2016

(RPI 2366)

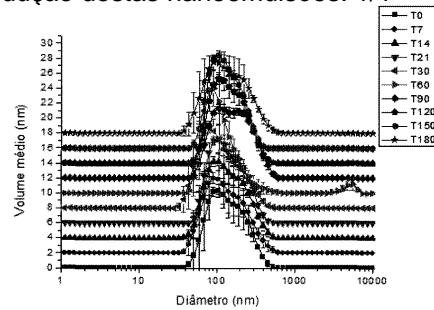
(54) Título: NANOEMULSÃO
FOTOPROTETORA E PROCESSO DE
PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO
FOTOPROTETORA

(51) Int. Cl.: A61K 8/06; A61K 8/73

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO

(72) Inventor(es): CRISTAL DOS SANTOS
CERQUEIRA COUTINHO, CLAUDIA REGINA
ELIAS MANSUR, ELISABETE PEREIRA DOS
SANTOS

(57) Resumo: RESUMO NANOEMULSÃO
FOTOPROTETORA E PROCESSO DE
PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO
FOTOPROTETORA A invenção se refere a uma
nanoemulsão óleo em água fotoprotetora e
antioxidante que compreende entre 10 e 25 %
(m/m) de compostos fotoprotetores, ao menos
um antioxidante, quitosana e tensoativos não-
iônicos; e ainda a invenção trata do processo de
produção destas nanoemulsões. 1/1



NANOEMULSÃO FOTOPROTETORA E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO FOTOPROTETORA

CAMPO DA INVENÇÃO

[001]A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia, especificamente ao campo da fabricação e/ou aplicação de nano estruturas, mais especificamente ao campo das nano estruturas para liberação de fármacos.

ESTADO DA TÉCNICA

[002]A radiação ultravioleta (UV) é responsável por uma variedade de efeitos agudos e crônicos na pele. As respostas agudas da pele humana à radiação UV incluem algumas respostas positivas, como a síntese de vitamina D₃. Já dentre as respostas negativas podemos citar o eritema. Os efeitos crônicos da radiação UV incluem o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese, provocada pela indução da imunosupressão e de mutações cromossômicas. Um aumento da consciência pública a respeito dos efeitos danosos causados pela radiação UV na pele resultou em um aumento no interesse pelo uso dos filtros-solares.

[003]A radiação ultravioleta é dividida em três faixas de comprimentos de onda. A radiação UVC atinge o comprimento de onda de 100 a 290 nm, e por enquanto não chega à superfície terrestre, mas pode passar a chegar com a degradação da camada de ozônio. Já radiação UVB atinge o comprimento de onda de 290 a 320 nm e a radiação UVA de 320 a 400 nm. Sendo que a radiação UVA é dividida ainda em UVA I que atinge comprimentos maiores entre 340 a 400 nm, e a UVA II que atinge comprimentos menores de entre 320 a 340 nm.

[004] Certo grau de proteção contra os danos causados pelos raios UV é fornecido pelos filtros solares ou agentes fotoprotetores. Estes agentes são classificados como orgânicos e inorgânicos, sendo estes últimos um grupo restrito formado pelo óxido de zinco e dióxido de titânio. Os filtros solares inorgânicos atuam absorvendo ou refletindo a radiação UV incidente e essa última característica confere a esses filtros solares uma ampla faixa de bloqueio à radiação UV quando comparado aos filtros solares orgânicos. Os filtros orgânicos são classificados como absorvedores da radiação UVA, UVB ou absorvedores de amplo espectro e essa absorção da radiação UV em comprimentos de onda específicos depende da estrutura química da molécula do filtro solar orgânico. Estes podem ser da classe dos p-metil benzoatos, salicilatos, cinamatos, benzofenonas, antranilatos, dibenzoilmetanos, derivados da cânfora entre outras classes diversas de moléculas orgânicas, as quais podem ser utilizadas em variadas concentrações máximas permitidas de acordo com as normas de vigilância sanitária.

[005] A nanotecnologia tem experimentando um rápido crescimento nas mais diversas áreas tecnológicas, como por exemplo, na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia, química, de ciência de materiais e poliméricas.

[006] Essa tecnologia também exerce um papel importante na área dermatológica em geral, tal como a área de nanosistemas contendo substâncias fotoprotetoras.

[007]O PI0600941-7 descreve uma nanocomposição cosmética e dermatológica, de uso estético, que compreende como agente emulsionante uma composição contendo lecitina, um éster de ácido graxo e sorbitol condensado com óxido de etileno e de um éster de ácido graxo e açúcar, em proporções específicas.

[008]O documento russo de patente RU2494728 descreve nanoemulsões contendo um peptídeo *delta sleep* induzido ou extratos herbais que são estáveis e podem ser armazenadas por um longo período de tempo.

[009]A patente US6242099 trata de microcápsulas feitas de quitosana que são úteis na incorporação de substâncias fotoprotetoras. O pedido americano de patente US2013022685 trata de uma nanopartícula de uso tópico capaz de carrear um ou mais princípios ativos.

[0010]Já US2011250239 trata da preparação de um biocoloide resultante da mistura de uma nanoemulsão com o extrato vegetal de *Mahonia aquifolium*. No entanto a nanoemulsão não funciona como um sistema carreador. Finalmente, o WO2010086754 descreve uma composição dermatológica capaz de promover crescimento celular, contendo extrato de ginseng, colágeno, quitosana, peptídeos e glicoproteínas tipo 1 e 2.

[0011]Conforme pode ser visto, o estado na técnica não antecipa nenhuma nanoemulsão cuja fase oleosa seja composta diretamente pelo princípio ativo da emulsão.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[0012]O objetivo da presente invenção é propor nanoemulsões óleo em água (O/A) fotoprotetoras e

antioxidantes, que compreendem compostos fotoprotetores, ao menos um antioxidante, quitosana e tensoativos não-iônicos.

[0013] É ainda, um objetivo da presente invenção propor um processo de produção de nanoemulsões óleo em água fotoprotetoras e antioxidantes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0014] A presente invenção trata de nanoemulsões óleo em água (O/A) fotoprotetoras e antioxidantes que compreendem compostos fotoprotetores, ao menos um antioxidante, quitosana e tensoativos não-iônicos, que apresentam efeitos fotoprotetor e antioxidante.

[0015] A veiculação de compostos fotoprotetores e ao menos um antioxidante em nanoemulsões à base de quitosana, visa o aumento da eficácia fotoprotetora e a segurança das formulações fotoprotetoras, pois, devido ao antioxidante e à quitosana, a mistura de filtros solares não permeia através da pele, não atingindo a corrente sanguínea permanecendo assim na superfície da pele, onde devem agir protegendo contra a radiação ultravioleta.

[0016] Devido ao fato de ser uma nanoemulsão, a formulação apresenta maior espalhabilidade na pele e, maior superfície de contato com a pele, fato que contribui para o aumento do fator de proteção solar (FPS). Desta forma, nanoemulsões óleo em água (O/A) fotoprotetoras e antioxidantes da invenção podem ser usadas em menor concentração do que em uma emulsão convencional, e mesmo assim, é obtida uma eficácia superior, proporcionando uma maior proteção contra a radiação UVA e UVB.

[0017] A invenção também trata de um processo de produção da nanoemulsão O/A com efeitos fotoprotetor e antioxidante.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0018] Para se obter uma completa visualização dos objetivos da presente invenção, é necessária a leitura deste documento e a análise dos desenhos que o acompanham e aos quais se faz referências conforme segue abaixo.

[0019] Figura 1 - Espectros de absorção: A) da mistura de filtros solares (FS) e B) das nanoemulsões O/A contendo FS a 15 %. Ambos os espectros foram obtidos na concentração da formulação de 25 µg/mL em etanol. Os $\lambda_{\text{máx}}$ estão marcados em vermelho

[0020] Figura 2: Distribuição de tamanho das gotas das nanoemulsões O/A preparadas sem quitosana.

[0021] Figura 3: Distribuição de tamanho das gotas das nanoemulsões O/A preparadas com quitosana.

[0022] Figura 4: Fotoestabilidade das nanoemulsões O/A - em A e B sem quitosana; em C e D com quitosana.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0023] A presente invenção refere-se a uma nanoemulsão óleo em água fotoprotetora e antioxidante que compreende entre 10 e 25 % m/m de compostos fotoprotetores, ao menos um antioxidante, quitosana e, tensoativos não-iônicos.

[0024] Os compostos fotoprotetores úteis na invenção são o dietilaminohidroxibenzoil hexil benzoato, octilmoxicinamato, octocrileno, benzofenona-3; e ainda compostos da classe dos p-metil benzoatos, salicilatos, cinamatos, benzofenonas, antranilatos, dibenzoilmetanos,

derivados da cânfora entre outras classes diversas de moléculas orgânicas.

[0025] As nanoemulsões O/A compreendem entre 10 a 25 % m/m de compostos fotoprotetores.

[0026] Preferencialmente, a mistura de compostos fotoprotetores da fase oleosa é consistida de entre 1 e 5% m/m de dietilaminohidroxibenzoil hexil benzoato; entre 4 e 10 % m/m de octilmetoxicinamato, entre 0,5 e 3% m/m de octocrileno; e, entre 1 e 5% m/m de benzofenona-3.

[0027] Os tensoativos não-iônicos são conhecidos dos especialistas na área farmacêutica, como por exemplo, os tensoativos pertencentes ao grupo consistido de: copolímeros em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO) ou monoleato de polioxietileno sorbitano, o monoleato de sorbitano ou álcoois etoxilados ou uma misturas destes.

[0028] Preferencialmente, as nanoemulsões compreendem os tensoativos não-iônicos entre 5 e 15% m/m de monoleato de polioxietileno sorbitano e o monoleato de sorbitano ou suas misturas, em sua fase oleosa.

[0029] A fase aquosa é uma mistura de entre 1 e 5% m/m de quitosana; entre 0,5 e 4% m/m de um ácido; e, entre 1 e 5% m/m de ao menos um antioxidante, todos solubilizados em uma quantidade suficiente de água para completar 100 % m/m de formulação.

[0030] Na presente invenção o ácido é pertencente ao grupo consistido de ácido cítrico, ácido glicólico, ácido lático, anidrido acético, ou uma mistura destes; e, o ao menos um antioxidante, que podem ser extratos vegetais

glicólicos ou hidroalcólicos e vitaminas, como por exemplo, o ácido ascórbico, ou uma mistura dos mesmos.

[0031] Mais especificamente, as nanoemulsões O/A compreendem entre 1 e 5 % m/m de extrato de alecrim, romã, artemísia ou castanha da índia.

[0032] Testes realizados pelos inventores, e descritos em seus pormenores nos exemplos abaixo, mostram que os diferentes diluentes e antioxidantes apresentam eficácia variável. Portanto, nas nanoemulsões O/A fotoprotetoras e antioxidantes preferencialmente, o ácido é pertencente ao grupo de ácido glicólico e o antioxidante é o extrato de romã.

[0033] As gotas das nanoemulsões O/A fotoprotetoras e antioxidantes da presente invenção apresentam entre 95 e 160 nm de diâmetro médio, índice de polidispersibilidade máximo de 0,2 e elevada estabilidade durante um longo período de tempo. E ainda, estas nanoemulsões são capazes de absorver um amplo espectro de radiação abrangem a radiação UVA e UVB e variam entre 290 e 400 λ de comprimento de onda.

[0034] Além disso, por conterem quantidades menores de compostos fotoprotetores do que as composições fotoprotetoras pertencentes ao estado da técnica, as nanoemulsões da presente invenção possuem um menor efeito tóxico e reduzidos efeitos adversos. Outras vantagens da destas nanoemulsões tornam-se óbvias aos especialistas na área após a análise deste descriptivo, desenhos e reivindicações anexas.

[0035] A presente invenção trata ainda do processo de

produção de nanoemulsões O/A que compreende as etapas de:

- (a) Preparação da fase aquosa;
- (b) Mistura dos componentes da fase oleosa ; e,
- (c) Formação da emulsão.

[0036] Inicialmente, na etapa (a) é preparada uma solução contendo quitosana e uma solução aquosa contendo um ácido pertencente ao grupo consistido de ácido cítrico, ácido glicólico, ácido lático, anidrido acético, ou uma mistura destes. Preferencialmente, a solução contém entre 1 e 5% m/m de quitosana, e o diluente é uma solução aquosa com entre 0,5 e 4% m/m de ácido glicólico.

[0037] A fim de se obter uma dissolução completa da quitosana, a solução contendo entre 1 e 5% m/m de quitosana e o diluente é submetida à agitação entre 700 e 1000 RPM durante um período entre 12 e 36h. Ao término da agitação, é obtido uma solução de quitosana, com pH compreendido entre 5,0 e 6,0.

[0038] Na etapa (b) os compostos fotoprotetores são misturados sob aquecimento e agitação suave até se alcançar a diluição completa dos compostos fotoprotetores sólidos. Nessa etapa, são misturados entre 1 e 5% m/m de dietilaminohidroxibenzoil hexil benzoato; entre 4 e 10 % m/m de octilmoxicinamato, entre 0,5 e 3% m/m de octocrileno; e, entre 1 e 5% m/m de benzofenona-3, e temperatura é de entre 50 e 70°C.

[0039] A fase oleosa é obtida solubilizando os compostos fotoprotetores nos tensoativos não-iônicos sob agitação suave. Os tensoativos não-iônicos desta etapa são preferencialmente o monoleato de polioxietileno sorbitano,

o monoleato de sorbitano ou uma mistura destes.

[0040] Preferencialmente a fase oleosa é obtida pela solubilização dos compostos fotoprotetores entre 10 e 15% m/m de monoleato de polioxietileno sorbitano e entre 1 e 5% mm de monoleato de sorbitano, até a completa homogeneização dessa solução.

[0041] A nanoemulsão é formada pela mistura da fase oleosa com entre 1 e 5% m/m da solução de quitosana, entre 1 e 5% m/m do antioxidante e quantidade suficiente de água para a obtenção de 100 % m/m da formulação, durante entre 15 e 40 minutos, a uma temperatura entre 2 e 7 °C, em ultrassom em amplitude de 100%.

[0042] O antioxidante adicionado é o ácido ascórbico, o extrato de alecrim, o extrato de romã, extrato de artemísia, extrato de castanha da índia ou uma mistura dos mesmos e o diluente adicionado é a água. Preferencialmente, o antioxidante é o extrato de romã.

[0043] Os compostos fotoprotetores contidos nas nanoemulsões produzidas pelo processo acima descrito, conferem fotoproteção de amplo espectro, tanto para radiação UVA, como para radiação UVB, e o antioxidante utilizado contribui para uma maior fotoestabilidade dos compostos fotoprotetores.

[0044] Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

[0045] Os exemplos abaixo têm meramente a função de

ilustrar as concretizações da presente invenção, e não tem o intuito de restringir ou delimitar os direitos do titular, os quais devem somente ser limitados ao escopo das reivindicações apresentadas.

[0046] **Exemplos:**

[0047] Exemplo 1: Seleção do extrato vegetal para o preparo das nanoemulsões:

[0048] Os ensaios da atividade antioxidante foram realizados através da metodologia de captação do radical livre DPPH• descrita Mensor et al. (2001), com modificações. Foram preparadas soluções etanólicas de todos os extratos na concentração de 1 mg/mL para posteriores diluições. Como padrão foi utilizado ácido ascórbico na mesma concentração. Foram adicionados a 1 mL solução etanólica do DPPH• 0,3 mM, 2,5 mL de cada solução do extrato em análise, diluídas em concentrações seriadas de 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 12,5 µg/mL. A reação transcorreu no escuro, à temperatura ambiente por uma hora e as absorbâncias foram lidas a 518 nm. Deste modo, foi possível avaliar a atividade antioxidante dos extratos vegetais comerciais, usando como comparação o padrão ácido ascórbico nas mesmas concentrações descritas. Todas as leituras foram feitas em triplicata. Os percentuais da atividade antioxidante total foram obtidos de acordo com a Equação 1.

$$\text{AA (\%)} = 100 - [\text{Abs}_{\text{AM}} - \text{Abs}_{\text{BR}}) \times 100] / \text{Abs}_{\text{CN}} \quad (\text{EQ.1}),$$

onde:

[0049] Abs_{AM} = absorbância da amostra (extrato + DPPH•);

[0050] Abs_{BR} = absorbância do branco (etanol);

[0051] Abs_{CN} = valor médio de absorbância encontrado para o controle negativo (DPPH[•] + etanol).

[0052] A partir dos dados, foram traçados os gráficos dos extratos e do padrão, onde na abscissa encontram-se as concentrações das amostras, em $\mu\text{g/mL}$ e, na ordenada, o % AAT (atividade que o extrato apresenta em capturar o radical livre DPPH[•]) calculado pelas médias das triplicatas. A cinética da reação foi calculada por regressão linear, obtendo-se o coeficiente de determinação (R^2), o coeficiente de correlação (r) e a equação da reta ($y = ax + b$). O valor encontrado para a CE_{50} representa a concentração de extrato necessária para se obter 50 % do efeito antioxidante máximo estimado, ele é frequentemente utilizado como medida para se avaliar a eficácia de um medicamento e possibilita a comparação entre substâncias distintas.

Exemplo 2 - Caracterização da amostra de quitosana:

[0053] A amostra de quitosana foi caracterizada quanto ao grau de desacetilação (GD) e a massa molar antes e após o processamento em ultrassom.

Exemplo 2.1 - Determinação do grau de desacetilação (GD) :

[0054] O GD da amostra comercial de quitosana utilizada foi determinado por a técnica de RMN-¹H. O espectro foi obtido em um espectrômetro Varian VNMRS-500 a 499,78 MHz para ¹H.

[0055] Para a realização da análise, aproximadamente 15 mg de amostra de quitosana foi solubilizada em 2 mL de solução de DCl 35 % (m/m) em D₂O e deixada sob agitação

constante, à 25 °C, por período de 6 horas para a completa solubilização da amostra. A análise foi realizada em tubo próprio de 5 mm de diâmetro, à temperatura de 70 °C.

[0056] Segundo Hirai, Odani e Nakajima (1991) e Varum e colaboradores (1991) a determinação do grau de desacetilação (GD) de uma amostra de quitosana pode ser determinado calculando-se a área do pico referente ao próton no carbono 1 do monômero desacetilado (H1D) e o pico referente aos três prótons do grupo acetila (HAc), que dessa forma precisa ser dividido por três, uma vez que a área determinada pela integral desse pico é referente a três prótons. A Equação 2 representa a % de GD a ser determinada utilizando-se as áreas mencionadas anteriormente.

$$\% \overline{GD} = \left(\frac{\text{H1D}}{\text{H1D} + \text{HAc}/3} \right) \times 100$$

(Eq. 2), onde:

[0057] H1D - Área do pico referente ao próton no carbono 1 do monômero desacetilado;

[0058] HAc - Área do pico referente aos três prótons do grupo acetila.

Exemplo 2.2 - Determinação da massa molar da quitosana:

[0059] Para a determinação da massa molar da quitosana foi utilizado o método viscosimétrico, a partir da viscosidade intrínseca de soluções do polímero (LAVERTU et al., 2003).

[0060] Para a determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$, foi preparada uma solução-mãe de 0,5 %, onde a

quitosana foi dissolvida em uma solução de ácido acético (0,1M) e de cloreto de sódio (0,2M) sob agitação constante por 24 horas. A partir da solução-mãe preparada, foram realizadas cinco diluições com a finalidade de se obter seis soluções de quitosana de concentrações diferentes.

[0061] Após o processamento em US da quitosana a 0,2 % em solução de cloreto de sódio com ácido acético em US por 30 minutos a 100 % de amplitude. Esses parâmetros selecionados visam mimetizar as condições de tempo de processamento, amplitude e concentração de quitosana, utilizados no preparo da fórmula completa, contendo a mistura de FS, o extrato vegetal e a quitosana.

[0062] As viscosidades absolutas (η) do solvente e das soluções de quitosana foram medidas em Reômetro Mars II, Haake, com o sensor de geometria cilindros-coaxiais, DG41, no intervalo de taxa de cisalhamento (γ) compreendida entre 1-300s⁻¹, à 25°C, a fim de determinar a região onde o comportamento é newtoniano.

[0063] Os cálculos de massa molar viscosimétrica média (M_v^-) foram realizados utilizando-se as equações de viscosidade relativa, específica, reduzida e intrínseca (LUCAS *et al.*, 2001). Para tanto, foi selecionada uma taxa de cisalhamento (dentro do intervalo de comportamento newtoniano) para a obtenção dos valores de viscosidade da solução e do solvente.

[0064] A viscosidade intrínseca é relacionada ao volume hidrodinâmico de uma cadeia polimérica, a qual está relacionada empiricamente com a massa molar do polímero. A massa molar viscosimétrica média (M_v^-) foi determinada

utilizando-se a equação de Mark-Houwink-Sakurada (LUCAS *et al.*, 2001). As constantes K e a são específicas e obtidas na literatura para uma determinada condição de temperatura de análise de um par polímero-solvente.

[0065] Para o sistema que foi utilizado neste trabalho (amostras de quitosana solubilizadas em uma solução de ácido acético/cloreto de sódio, à temperatura de 25°C) os valores das constantes utilizadas foram $K=1,81 \times 10^{-3}$ e $a=0,93$.

Exemplo 2.3 - Solubilidade da quitosana e preparo da solução de quitosana:

[0066] A solubilidade da quitosana foi avaliada frente a algumas soluções de ácidos comumente utilizados em produto tópicos, para que houvesse compatibilidade entre as formulações e a pele. A quitosana é solúvel em pH levemente ácido, em torno de 5,5, mas não apresenta solubilidade em água pura.

[0067] O aspecto visual da mistura quitosana em solução ácida foi avaliada após 24 h do preparo. Durante esse período de tempo o sistema foi mantido sob agitação constante a 800 rpm.

[0068] O ácido acético e o anidrido acético tem um odor característico acentuado, sendo inviável o desenvolvimento de uma formulação tópica com qualquer uma dessas substâncias. Sendo assim, foram testados ácidos fracos, amplamente utilizados em formulações farmacêuticas e cosméticas para a solubilização da quitosana.

[0069] O pH da solução de quitosana precisa ser compatível com o pH da pele (em torno de 5,0 - 6,5), pois

se o pH for baixo já nesse estágio, quando a solução de quitosana for adicionado ao restante dos ingredientes para o preparo na nanoemulsão final, o pH obtido tenderá a ser baixo e dessa maneira, incompatível com o pH da pele.

Exemplo 3 - Preparo das nanoemulsões:

[0070] As nanoemulsões foram preparadas com auxílio de um equipamento de Ultrassom utilizando os tensoativos não-iônicos monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween® 80) e monooleato de sorbitano (Span® 80), contendo 15 % (m/m) de mistura de filtros solares (benzofenona-3, dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato, octocrileno e octil metoxicinamato), extrato vegetal, com e sem a solução de quitosana (Tabela 1).

[0071] Todas as matérias-primas e preparações foram pesadas em balança analítica.

[0072] Primeiramente, foi preparada a solução de quitosana a 2 %, que compõe a fase aquosa da nanoemulsão. Para a solubilização da quitosana em água é necessário a adição de um ácido visando a diminuição do pH. Foi preparada uma solução de ácido glicólico e a essa solução foi adicionada quitosana em pó, de forma que ao final do preparo a concentração de ácido glicólico fosse de 1 % e a concentração de quitosana fosse de 2 %. A solução ficou em agitação por 24 h a 800 RPM para a dissolução completa da quitosana. O ácido glicólico foi escolhido com base em um ensaio de solubilidade da quitosana (resultados no subitem 4.4), onde foram testados outros ácidos fracos, compatíveis com produtos de uso tópico onde o pH final ficasse em torno de 5,0 - 6,0, já que não é desejável que

o produto cause irritação na pele por apresentar alguma incompatibilidade com o pH desta. Após o preparo da solução de quitosana, este foi reservado.

[0073] Em paralelo, foi preparada a mistura de filtros, que compõe a fase oleosa. Os filtros em pó (Dietilamino Hidroxibenzoil Hexil Benzoato e Benzofenona-3) foram aquecidos a 60 °C juntamente com os filtros líquidos (Octilmetoxicinamato e Octocrileno), todos em um mesmo recipiente. Assim que a mistura se tornou homogênea e amarela translúcida, esta foi retirada do aquecimento e reservada.

[0074] Os tensoativos não-iônicos e a mistura de filtros foram pesados, solubilizados e homogeneizados um no outro. Logo em seguida, a essa mistura, foi adicionado à solução de quitosana a 2 %, o extrato vegetal antioxidante de romã e foi adicionado o restante da quantidade da fórmula em água, para completar 100 % da quantidade a ser preparada. Todos os ingredientes juntos, em um recipiente de vidro, foram levados ao ultrassom por 30 min na amplitude de 100 %. O processamento em ultrassom foi realizado com o auxílio de banho termostatizado a 5 °C com a finalidade de impedir o aumento crescente da temperatura durante o processamento.

[0075] Para as nanoemulsões que não continham quitosana, a solução não foi adicionada e essa quantidade foi substituída por água na formulação.

[0076] Ambas as nanoemulsões foram processadas em US, por 30 minutos a 100 % de amplitude, já que a fase oleosa se apresentava com bastante viscosidade e, portanto nos

testes iniciais foi constatada a dificuldade de processamento, sendo necessário o processamento na amplitude máxima do equipamento e por 30 minutos.

Tabela 1: Composição base das formulações avaliadas.

Ingredientes	nanoemulsão fotoprotetora sem quitosana	nanoemulsão fotoprotetora com quitosana
	Composição (%)	
Tween® 80	12	12
Span® 80	3	3
Mistura de filtros F18	15	15
Extrato	3	3
Solução de quitosana a 2%	---	10
Água	Qsp 100 %	Qsp 100 %

Exemplo 4 - Caracterização das nanoemulsões:

[0077] A caracterização das nanoemulsões foi realizada por meio da determinação do tamanho médio, da distribuição de tamanho e do índice de polidispersividade das gotas, assim como pela determinação do pH e do potencial zeta. A eficácia das nanoemulsões como filtros solares também foi determinada (pelo método de Mansur e pela espectrofotometria por transmitância com esfera de integração), assim como a fotoestabilidade dessas formulações.

Exemplo 4.1 - Determinação do tamanho médio, da distribuição de tamanho e do índice de polidispersividade das gotas:

[0078] O tamanho médio, a distribuição de tamanho e o índice de polidispersividade das gotas, assim como a estabilidade destes sistemas, foram determinados em analisador de tamanho de gotas Zetasizer Nano ZS, o qual fornece os resultados de tamanho em forma de tabelas ou

gráficos percentuais de intensidade de luz espalhada, volume e número de gotas em função do tamanho (nm). Para a realização da análise, as nanoemulsões foram diluídas na proporção 1:20 em água destilada e deionizada. A distribuição de tamanho das gotículas formadas foi analisada imediatamente após o preparo e após 7, 14, 21, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

Exemplo 5 - determinação da eficácia das nanoemulsões como filtros solares:

[0079] O FPS *in vitro* das duas formulações desenvolvidas foi determinado através do método de Mansur (MANSUR, 1986).

[0080] Cada formulação foi submetida a uma diluição de modo a obter uma concentração final de 0,2 µg/ml de formulação em etanol P.A. A seguir, procedeu-se a determinação da absorbância desta diluição frente ao solvente. Este procedimento foi realizado em triplicata e a determinação espectrofotométrica do FPS foi avaliada empregando o espectrofotômetro. Os valores de absorbância destas amostras foram determinados nos comprimentos de onda de 290 a 320 nm, com um intervalo de cinco nm. Para o cálculo do FPS, foi utilizada a equação matemática (Equação 3) relaciona o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda (EE x I) (Tabela 2).

$$\text{FPS}_{\text{espectrofotométrico}} = \frac{\sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot \text{I}(\lambda) \cdot \text{abs}(\lambda)}{10}$$

(Eq.3)

Onde:

[0081] FC = 10 (fator de correção);

[0082]EE (λ) = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ) definido pela Tabela 2;

[0083]I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda (λ) definido pela Tabela 3;

[0084]Abs (λ) = valor espectrofotométrico da absorbância da solução da preparação no comprimento de onda (λ) definido pela Tabela 2.

λ (nm)	EE (λ) x I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864

Tabela 2: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.

Exemplo 6 – Ensaio de fotoestabilidade:

[0085]Os ensaios de fotoestabilidade foram realizados utilizando-se o Simulador Solar Oriel (91192-1000) equipado com o filtro 87066, que filtra a radiação no comprimento de onda do infravermelho e parte da luz visível, e o espectrofotômetro UV/VIS Jasco (V-630).

[0086]A lâmpada utilizada no simulador solar apresentava 900 W de potência, porém, na ocasião dos testes, de acordo com o tempo de utilização desta lâmpada, esta apresentava emissões mais baixas de radiação UVB e de radiação UVA com energia média de 1,9 J/s.m² e de 31,7 J/s.m², respectivamente. Foram realizadas medições da radiação solar em dias consecutivos com o auxílio de um dosímetro. Essas medições foram realizadas em ambiente externo e aberto às 12 h, no verão (de 06 a 10 de janeiro de 2014), com dias de intensa radiação solar e foi constatada uma emissão de radiação UVB natural média de 8,2 J/s.m² e de radiação UVA natural de 104,0 J/s.m². No

entanto, em função da menor intensidade da radiação UVA e UVB simulada frente a natural, o tempo de exposição das amostras foi estendido para 4 h, haja vista que o tempo habitual de ensaios dessa natureza é de 2 h em função do intervalo de tempo preconizado para a reaplicação do produto fotoprotetor (FDA, 2014).

[0087]Foram adicionadas em placas de Petri (30 mm de diâmetro), 500 mg de cada uma das quatro formulações a serem testadas (nanoemulsões fotoprotetoras com e sem quitosana e nanoemulsões fotoprotetoras com e sem extrato). Em seguida as placas ficaram em repouso por 10 minutos para a secagem da formulação. Esse passo teve o intuito de criar uma camada mais regular da formulação sobre a placa de Petri. Foram preparadas 15 placas para cada amostra, uma vez que 6 placas seriam irradiadas e as outras 6 placas ficariam na ausência de luz, atuando como um controle negativo. As 3 placas restantes foram utilizadas para uma verificação do FPS inicial das amostras para servir como ponto de partida, o "tempo zero". Esse ensaio foi realizado em triplicata para cada tempo, tempo 0 (T0), 2 h (T2) e 4 h (T4).

[0088]Após cada tempo estabelecido, estas amostras foram submetidas ao teste de FPS *in vitro*, conforme o subitem 2.9.1 (Método de Mansur).

Exemplo 7: Caracterização espectrofotométrica da mistura filtros solares e das nanoemulsões:

[0089]Na Figura 4 são apresentados os espectros obtidos para a mistura de FS pura e para as nanoemulsões estudadas, em soluções a 25 µg/mL. Na Tabela 4 são

mostrados o(s) valor(es) de $\lambda_{\text{máx}}$ obtidos para cada um desses sistemas. É importante ressaltar que todas as NE avaliadas apresentaram 15 % da mistura de FS em sua composição, o que significa que uma solução a 25 µg/mL da mistura de FS pura apresenta maior concentração de filtros do que soluções a 25 µg/mL das nanoemulsões contendo em sua composição 15 % dessa mesma mistura de FS. A ideia de ambas as análises é verificar e comparar o espectro de absorção da mistura de FS com o espectro de absorção da fórmula (NE) contendo a mistura de FS.

[0090] O espectro de absorção da radiação UV obtida no espectrofotômetro foi o mesmo para todas as nanoemulsões contendo a concentração de 15 % da mistura de FS. Como existiam dois fatores envolvidos, a adição ou não de quitosana e a adição ou não de extrato antioxidante, foi constado que tanto a quitosana como o extrato antioxidante não interferiram na absorção dos filtros solares. Esse fato não é surpresa, uma vez que a quitosana não apresenta grupos cromóforos em sua estrutura e o extrato antioxidante não necessariamente precisa absorver a radiação UV para atuar em sinergia com os filtros solares. O extrato antioxidante poderá atuar capturando os ROS e dessa forma, em um ensaio *in vivo*, ocorreria a diminuição da vermelhidão (eritema) apresentada na pele do voluntário e consequentemente o FPS do produto seria maior, ou seja, a reação inflamatória gerada pelos ROS na pele do voluntário seria minimizada, ou até mesmo extinta, devido a atuação das moléculas antioxidantes presentes no extrato vegetal em capturar os ROS.

[0091] De acordo com os espectros obtidos é possível observar que estes apresentam perfil similar, com o pico máximo de absorção da radiação UV em torno de 310 nm.

[0092] A norma do FDA (2011) determina que para um filtro solar ser considerado de amplo espectro, este precisa ter o λ_c de no mínimo 370 nm.

[0093] A mistura de FS apresentou um perfil espectrofotométrico amplo e diferenciado, dessa maneira a nanoemulsão fotoprotetora formulada com essa mistura pode ser considerada um produto fotoprotetor de amplo espectro, com o λ_c encontrado de 372 nm através do equipamento Labsphere UV-2000S (Tabela 3). Para um filtro solar ser considerado de amplo espectro, este precisa ter o λ_c de no mínimo 370 nm. Essa mistura de FS apresentou-se adequada para se formular nanoemulsões fotoprotetoras de amplo espectro, uma vez que a mistura de FS cobre os comprimentos de onda referentes à radiação UVB e à grande parte da radiação UVA.

Material	$\lambda_{\text{máx}} \text{ encontrados (nm)}$	$\lambda_c \text{ encontrado (nm)}$
Mistura de filtros	294,2 e 310	372
nanoemulsões	309,8	

Tabela 3: Valores de comprimento de onda obtidos onde ocorre o $\lambda_{\text{máx}}$ na mistura de filtros e nas nanoemulsões contendo FS a 15 %

Exemplo 8: Ensaio do DPPH• para avaliação da capacidade antioxidante dos extratos vegetais:

[0094] O método de captação do radical livre DPPH• foi utilizado como um screening para a escolha do extrato com maior capacidade antioxidante a ser utilizado.

[0095] Somente o padrão utilizado nessa análise, o ácido ascórbico e os extratos de alecrim e de romã apresentaram CE50 ($\mu\text{g/mL}$), os demais extratos (artemísia e

castanha-da-índia) apresentaram um potencial antioxidante baixo sendo impossível calcular o CE50 para eles. O potencial antioxidante (%) de cada extrato seguem na Tabela 4 os valores de CE50 obtidos para os extratos vegetais onde foi possível, a partir dos resultados de % de potencial antioxidante apresentado, calcular esse valor.

Substância	CE50 ($\mu\text{g/mL}$) \pm desvio padrão
Ácido ascórbico	5,64 \pm 0,09
Extrato de alecrim	1,84 \pm 0,13
Extrato de romã	0,45 \pm 0,02

Tabela 4: Extratos vegetais comerciais que apresentaram CE50 e o valor obtido para cada um deles

[0096] Foi verificado por espectrofotometria no UV, que os extratos estudados não absorvem nessa faixa de comprimento de onda (290 a 400 nm). A finalidade do extrato na formulação é a de atuar indiretamente no FPS, através de seu aumento quando a formulação é testada *in vivo* e no aumento da fotoestabilidade da mistura de FS utilizada.

[0097] Todos os extratos apresentaram diferença estatística entre os seus valores de CE50 obtidos ($p<0,05$). O extrato vegetal de romã apresentou o menor CE50, de $0,45 \pm 0,02$, isso significa que este extrato é o mais eficaz, já que pequena quantidade dele é necessária para obter-se 50 % da atividade antioxidante máxima. Esse extrato apresentou com atividade antioxidante acima de 90 % a partir da concentração $1,0 \mu\text{g/mL}$.

[0098] O padrão, ácido ascórbico, apresentou o maior CE50, de $5,64 \pm 0,09$, sendo, portanto menos eficaz como antioxidante do que os extratos vegetais. O extrato de alecrim apresentou um CE50 intermediário de $1,84 \pm 0,13$,

mas mesmo assim, bem acima do valor obtido para o extrato de romã.

[0099] Sendo assim, as nanoemulsões contendo o extrato de romã apresentarão potencial antioxidante conferido por esse extrato. O potencial antioxidante nas nanoemulsões poderá se dar como um aumento da fotoestabilidade da mistura de filtros solares e também como um aumento no FPS *in vivo* uma vez que no ensaio em humanos, com a incidência da radiação UV, radicais livres podem se formar na pele e com a veiculação do extrato na formulação esses radicais livres serão capturados, aumentando o FPS *in vivo*, que é verificado a partir do aparecimento do eritema na pele do voluntário. Como esses extratos não apresentam capacidade de absorver a radiação UV, eles só atuarão de forma indireta no aumento do FPS, capturando os radicais livres formados na pele e, portanto aumentando o FPS, uma vez que os radicais livres também são responsáveis pelo aparecimento do eritema.

Exemplo 9 - Solubilidade da quitosana e preparo da solução de quitosana:

[00100] É recomendável que pH para um produto tópico esteja na faixa de 5,5 - 6,5 para que seja compatível com o da pele, muito acima ou abaixo dessa faixa, o produto pode causar vermelhidão e irritação na pele.

Substância testada	Concentração do ácido (%)	Concentração da quitosana (%)	Resultado	pH
Ácido cítrico	1,0	0,5	Insolúvel	X
	1,0	1,0	Insolúvel	X
	1,0	1,5	Insolúvel	X
Anidrido	1,0	0,5	Solúvel*	2,8

Substância testada	Concentração do ácido (%)	Concentração da quitosana (%)	Resultado	pH
acético	1,0	1,0	Insolúvel	X
	1,0	1,5	Insolúvel	X
Ácido lático	0,5	0,5	Solúvel*	3,7
	0,5	1,0	Solúvel*	5,2
	0,5	1,5	Insolúvel	X
	1,0	0,5	Solúvel*	3,2
	1,0	2,0	Insolúvel	X
	1,5	1,5	Solúvel*	3,8
	1,5	2,0	Insolúvel	X
Ácido glicólico	1,0	2,0	Solúvel*	5,1
	1,0	3,0	Insolúvel	X
	1,5	3,0	Solúvel*	4,7
	1,5	4,0	Solúvel*	4,5

Tabela 5: Solubilidade de diferentes concentrações de quitosana em substâncias ácidas com concentrações distintas em solução aquosa.

[00101] O pH foi verificado nos sistemas onde a quitosana estava completamente solubilizada. Foi constatado que o ácido onde a quitosana apresentou melhor solubilidade é o ácido glicólico, na concentração de 2 % do polímero. A 3 % a quitosana também pode ser solúvel, no entanto, é necessária a adição de mais ácido o que faz o pH diminuir. Foi escolhido então trabalhar com a solução de quitosana a 2 % preparado em solução de ácido glicólico.

Exemplo 10 - Determinação do tamanho médio, da distribuição de tamanho e do índice de polidispersividade das gotas:

[00102] A caracterização dos sistemas produzidos, quanto ao tamanho médio, à distribuição de tamanho e ao índice de polidispersividade das gotas, foi realizada em triplicata. Os gráficos obtidos são representados em curvas das médias da triplicata da distribuição de tamanho de gotas para cada tempo (Figuras 2 e 3).

[00103] A estabilidade dos sistemas foi avaliada quanto à distribuição de tamanho das gotas em função do tempo de preparo visando verificar a possível desestabilização dos sistemas. Esta avaliação foi realizada analisando-se inicialmente a distribuição de tamanho das gotas no momento do preparo das formulações (tempo zero) e após intervalos de tempo pré-estabelecidos (7, 14, 21, 30, 60, 90 e 120 dias). Às formulações que não permaneceram estáveis em uma segunda ou terceira leitura de tempo não foi dada continuidade na análise de estabilidade ao longo do tempo, uma vez que não se apresentavam como sistemas promissores.

[00104] A partir da observação das nanoemulsões que mantiveram estabilidade durante o período de tempo estudado, é possível afirmar que essas formulações apresentaram diâmetro médio de gota de 97 nm para nanoemulsão fotoprotetora sem quitosana e 150 nm para a nanoemulsão fotoprotetora com quitosana e IP menor que 0,2 para todos os sistemas. Pequenas variações na faixa de diâmetro médio de gota foram observadas, dependendo do tempo de preparo da formulação sem, no entanto, caracterizar uma desestabilização do sistema. Além disso, todos os sistemas provaram ser estáveis frente a fenômenos de coalescência das micelas por pelo menos 6 meses após o preparo devido à manutenção do diâmetro médio das gotículas durante tal período de tempo. Nas Figuras 2 e 3 pode ser vista distribuição de tamanho das gotas das nanoemulsões preparadas com auxílio do ultrassom analisadas imediatamente após o preparo (tempo zero) e

após 7, 14, 21, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. A nanoemulsão foi preparada com 15 % m/m da mistura de filtros, 3 % m/m do extrato de romã, 12 % m/m de Tween 80, 3 % m/m Span 80 e água destilada e deionizada (qsp 100 % m/m).

[00105] Já na Figura 3, as nanoemulsões foram preparadas com quitosana com auxílio do ultrassom analisados imediatamente após o preparo (tempo zero) e após 7, 14, 21, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. A nanoemulsão foi preparada com 15 % m/m da mistura de filtros, 3 % m/m do extrato de romã, 12 % m/m de Tween 80, 3 % m/m Span 80, 10 % de solução de quitosana a 2 % e água destilada e deionizada (qsp 100 % m/m).

Exemplo 11 - Determinação do potencial zeta:

[00106] As médias das triplicatas dos valores de PZ das nanoemulsões, nanoemulsão fotoprotetora sem quitosana e nanoemulsão fotoprotetora com quitosana e do extrato vegetal de romã seguem na Tabela 6. Para as nanoemulsões foi verificado o PZ imediatamente após o preparo e após 6 meses da data do preparo.

[00107] As nanoemulsões foram preparadas com a mistura de filtros a 15 % (m/m), Tween® 80 a 12 % (m/m), Span® 80 a 3 % (m/m), extrato vegetal de romã a 3 % (m/m), podendo levar ou não 10 % de solução de quitosana a 2 % e água destilada e deionizada, qsp 100 % (m/m).

[00108] A nanoemulsão fotoprotetora com quitosana apresenta carga positiva ($14,2 \pm 0,81$) devido à presença do polímero catiônico no meio, que confere carga positiva ao sistema.

[00109] Já a nanoemulsão fotoprotetora sem quitosana apresenta carga negativa devido à ausência do polímero. Este fato pode ser demonstrado com a análise do extrato vegetal de romã, que apresenta carga negativa ($-26,7 \pm 0,95$). Quando o extrato é veiculado na nanoemulsão sem a presença da quitosana, ele confere ao sistema carga negativa ($-12,7 \pm 1,55$), uma vez que a mistura de filtros solares e a mistura de tensoativos não-iônicos não apresentam cargas.

[00110] Após 6 meses da data do preparo das nanoemulsões, o PZ se mantém similar, $13,7 \pm 0,59$ para a nanoemulsão fotoprotetora com quitosana e $-12,4 \pm 1,01$ para a nanoemulsão fotoprotetora sem quitosana. Este dado é um possível indicativo de que as nanoemulsões se mantêm estáveis.

Amostra	Imediato	Após 6 meses
	Potencial zeta (mV) ± desvio padrão	Potencial zeta (mV) ± desvio padrão
nanoemulsão fotoprotetora sem quitosana	$-12,7 \pm 1,55$	$-12,4 \pm 1,01$
nanoemulsão fotoprotetora com quitosana	$14,2 \pm 0,81$	$13,7 \pm 0,59$
Matéria-prima	Potencial zeta e desvio padrão	Potencial zeta e desvio padrão
Extrato de romã	$-26,7 \pm 0,95$	

Tabela 6 Média do potencial zeta com desvio padrão para nanoemulsões imediatamente após o preparo e após 6 meses; média do potencial zeta com desvio padrão para o extrato vegetal de romã.

Exemplo 12 – Determinação do pH:

[00111] Segue na Tabela 7 os valores de pH obtidos para os dois nanosistemas nanoemulsão fotoprotetora com quitosana e nanoemulsão fotoprotetora sem quitosana.

[00112] Os valores obtidos estão de acordo com o

preconizado para formulações tópicas, já estas devem apresentar pH dentro da faixa de pH do estrato córneo, para que não ocorra nenhuma irritação na pele.

Formulações	pH ± desvio padrão
nanoemulsão fotoprotetora sem quitosana	$6,6 \pm 0,11$
nanoemulsão fotoprotetora com quitosana	$5,3 \pm 0,17$

Tabela 7: Valores de pH obtidos para os dois nanosistemas

Exemplo 13 - Ensaio para a determinação da eficácia pelo método Mansur:

[00113] O FPS das nanoemulsões obtido pelo método de Mansur foi 14. É possível constatar que devido ao método de Mansur ser realizado através de leituras de absorbâncias não é verificada a real condição de aplicação da amostra, o que só é possível com a análise por transmitância com esfera de integração nas placas de quartzo.

[00114] No método de Mansur as gotas dispersas da nanoemulsão fotoprotetora são desfeitas, já que o método preconiza a solubilização da amostra para posterior leitura em espectrofotômetro. Já no método utilizado com a espectrofotometria por transmitância com esfera de integração, a amostra é avaliada após espalhamento na superfície da placa de quartzo e por esse motivo apresenta um FPS maior, uma vez que mimetiza as condições reais de aplicação e a amostra permanece íntegra. Na placa de quartzo leva-se em consideração o aumento da superfície de contato das gotas contendo filtro solar, já que elas possuem tamanho reduzido, já no método de Mansur, leva-se em consideração apenas o conteúdo de filtro e seu poder de absorção da luz no comprimento de onda do UVB, uma vez que

as micelas são rompidas quando a nanoemulsão é diluída em etanol para a análise.

Exemplo 13.1 - Espectrofotometria por transmitância com esfera de integração:

[00115] Os resultados obtidos no experimento seguem na Tabela 8. O valor de FPS é satisfatório para uma formulação fotoprotetora, e de acordo com as categorias do FDA para filtros solares, essas fórmulas seriam classificadas como produtos de média/alta proteção UVA.

[00116] A quitosana não influencia na fotoproteção conferida pela nanoemulsão fotoprotetora uma vez que é um polímero que não apresenta grupamentos que absorvem a radiação UV. Sendo assim, os valores de FPS, de Razão UVA/UVB e de comprimento de onda crítico (λ_c) são os mesmos para os dois nanosistemas (nanoemulsão fotoprotetora com quitosana e nanoemulsão fotoprotetora sem quitosana).

[00117] O extrato vegetal de romã não influencia o FPS *in vitro*. Como esses extratos não apresentam capacidade de absorver a radiação UV, eles só atuarão de forma indireta no aumento do FPS, através do aumento da eficácia da fotoproteção contra a radiação UVB *in vivo*, já que como o extrato vegetal apresenta moléculas que capturam os radicais livres formados na pele e que são responsáveis pelo aparecimento do eritema *in vivo*, com a atuação do extrato, o eritema demoraria mais tempo para aparecer e o FPS seria maior.

Parâmetros	Valor obtido para as nanoemulsões (média ± desvio padrão)
FPS	25 ± 2,10

Razão UVA/UVB	$0,715 \pm 0,02$
	$372 \pm 2,08$

Tabela 8: Resultados da avaliação do FPS pelo método de Mansur e da razão UVA/UVB.

Exemplo 13.2 - Ensaio de fotoestabilidade:

[00118] Após cada tempo estabelecido, as amostras das quatro nanoemulsões (com ou sem quitosana e com ou sem extrato) foram diluídas em etanol e analisadas em espectrofotômetro de UV segundo metodologia descrita no método de Mansur, descrito acima.

[00119] Os ensaios de fotoestabilidade em filtros solares comerciais utilizando pele humana, proveniente de cirurgia plástica, pele animal (suína) e placas de quartzo, para fins de comparação. Os autores constataram que a diferença obtida para o ensaio quando se varia o substrato não foi significativa, indicando que testes de fotoestabilidade não precisam ser necessariamente realizados em pele. Dessa forma, uma vez que os substratos utilizados (pele e placas de vidro) poderiam ser intercambiáveis, (apesar do uso da pele reproduzir melhores as condições de uso *in vivo*), a utilização do suporte de vidro agiliza o ensaio além de ser mais barato a longo prazo e pode ser facilmente reproduzido. Ainda segundo os autores, o ensaio de fotoestabilidade deveria ser implementado como análise obrigatória para se avaliar a eficácia de produtos fotoprotetores.

[00120] A mistura de FS contida nas quatro nanoemulsões avaliadas se manteve fotoestável na ausência de radiação (controle negativo) para os mesmos períodos de tempo avaliados, sem diferença estatística ($p>0,05$) para as

comparações entre T0, T2 e T4. A Figura 4 apresenta os gráficos com os resultados do ensaio de fotoestabilidade. O ensaio para cada amostra, tanto para as amostras irradiadas quanto para os controles negativos, foi feito em triplicata e nos gráficos estão representadas as médias dos valores obtidos \pm desvio padrão.

[00121] Comparando-se as nanoemulsões irradiadas contendo extrato, Figura 4 b e d (sem e com quitosana), é possível verificar que em ambos os casos, elas apresentam maior fotoestabilidade quando comparadas àquelas que não contêm extrato, a e c (sem e com quitosana), uma vez que em 4 h o FPS se mantém inalterado ($p>0,05$) para as comparações das formulações com extrato nos tempos T0, T2 e T4. Já as formulações que foram irradiadas e que não contêm extrato, a e d, apresentam um decaimento no FPS no tempo 4 h ($p<0,05$) quando comparado aos tempos T0 e T2, que não apresentam diferença significativa entre eles ($p>0,05$). Quando se compara dentro do mesmo gráfico T0 e T2 entre a média dos controles negativos e a média das amostras irradiadas é possível verificar que não há diferença estatística entre elas ($p>0,05$), porém quando se compara T4 da média dos controles negativos e da média das amostras irradiadas é possível verificar que nas formulações que não contêm extrato há um decaimento no valor de T4 na média das amostras irradiadas quando comparada à média dos controles negativos (a e c) ($p<0,05$), o que não é verificado nas amostras contendo extrato, b e d ($p>0,05$).

[00122] A contribuição de ativos antioxidantes à

fotoestabilidade de moléculas fotoprotetoras comerciais. Foram avaliados os antioxidantes vitamina E e o antioxidante sintético Bis(2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi-4-il) sebacato e verificaram que com a adição desses antioxidantes à moléculas fotoprotetoras ocorre um aumento na estabilidade dos filtros frente a radiação UV. A fotoestabilidade de moléculas fotoprotetoras não pode ser avaliada somente de acordo com sua eficácia, deve também ser levada em consideração a utilização de antioxidantes na fórmula, já que estes influenciam diretamente a eficácia das moléculas fotoprotetoras presentes na fórmula.

[00123] Nem mesmo uma complexa combinação de filtros solares orgânicos ou inorgânicos poderia prevenir a fotoinativação das moléculas fotoprotetoras quando expostas a doses crescentes de radiação UV. Além desse aspecto, ainda segundo os autores, a inativação das moléculas é maior na região do UVA, essa degradação leva a formação de ROS e de outros intermediários reativos e tóxicos. Ainda, esses intermediários também podem iniciar o dano às estruturas cutâneas e como em um ciclo, as moléculas fotoprotetoras que perdem sua eficácia permitem que mais ROS sejam formados diretamente na pele, pela radiação incidente. Em alguns casos, a fotodegradação das moléculas fotoprotetoras pode dar origem à radicais livres como subprodutos, dessa maneira, o extrato antioxidant pode atuar capturando essas espécies formadas.

[00124] Conforme pode ser visto na Figura 4, a fotoestabilidade das nanoemulsões irradiadas e controle

negativo (ambas representadas pelas médias das triplicatas para cada amostra \pm desvio padrão) no tempo zero, por 2 h e 4 h, na ausência (a e b) e na presença (c e d) de quitosana sendo que a e c não contém extrato e b e d contém extrato.

[00125] Dessa maneira, é possível sugerir que o extrato vegetal de romã aumentou a fotoestabilidade dos filtros solares contidos nas nanoemulsões, já que esse extrato apresenta moléculas antioxidantes em sua composição, como foi verificado no ensaio do DPPH•.

[00126] Foi verificado durante o ensaio que a quitosana não influencia na fotoestabilidade dos filtros, uma vez que esse polímero não apresenta grupamentos cromóforos. A presença ou não de quitosana não altera o decaimento da fotoestabilidade no T4 para as formulações que não contém o extrato vegetal de romã, indicando assim, que é o extrato vegetal que atua aumentando a fotoestabilidade dos filtros solares contidos nos nanosistemas.

REIVINDICAÇÕES

1 - Nanoemulsão óleo em água fotoprotetora e antioxidante **caracterizada** por compreender entre 10 e 25 % (m/m) de compostos fotoprotetores, ao menos um antioxidante, quitosana e tensoativos não-iônicos.

2 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de os compostos fotoprotetores úteis na invenção serem o dietilaminohidroxibenzoil hexil benzoato, octilmoxicinamato, octocrileno e, benzofenona-3; e ainda compostos da classe dos p-metil benzoatos, salicilatos, cinamatos, benzofenonas, antranilatos, dibenzoilmetanos, derivados da cânfora entre outras classes diversas de moléculas orgânicas.

3 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pela fase oleosa compreender uma mistura de entre 10 e 25 % m/m de compostos fotoprotetores e entre 5 e 15 m/m tensoativos não-iônicos; e a fase aquosa compreender uma mistura contendo entre 1,0 e 5,0 % m/m de um antioxidante; entre 1 e 5% m/m de quitosana e, todos solubilizados em água em quantidade suficiente para completar 100 % m/m de formulação.

4 - Nanoemulsão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, ou 3, **caracterizada** pelo fato de a mistura de compostos fotoprotetores da fase oleosa ser consistida de entre 1 e 5% m/m de dietilaminohidroxibenzoil hexil benzoato; entre 4 e 10 % m/m de octilmoxicinamato, entre 0,5 e 3% m/m de octocrileno; e, 1 e 5% m/m de benzofenona-3.

5 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de fase aquosa ser uma mistura de entre 1 e 5 % m/m de quitosana; entre 1 e 5% m/m de ao menos um antioxidante, todos solubilizados em água em quantidade suficiente para completar 100 % m/m de formulação.

6 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de o ácido é pertencente ao grupo consistido de ácido cítrico, ácido glicólico, ácido láctico, anidrido acético, ou uma mistura destes; e, o ao menos um antioxidante, que podem ser extratos vegetais glicólicos ou hidroalcóolicos e vitaminas, como ácido ascórbico ou uma mistura dos mesmos.

7 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelas gotas das nanoemulsões óleo em água fotoprotetoras e antioxidantes terem entre 95 e 160 nm de diâmetro médio e índice de polidispersibilidade máximo de 0,2.

8 - Processo de produção de nanoemulsões óleo em água **caracterizado** por compreender as etapas de:

- (a) Preparação da fase aquosa;
- (b) Mistura dos componentes da fase oleosa; e,
- (c) Formação da emulsão.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de na etapa (a) ser preparado uma solução contendo de quitosana e o ácido é pertencente ao grupo consistido de ácido cítrico, ácido glicólico, ácido láctico, anidrido acético, ou uma mistura destes; e, o ao menos um antioxidante, que pode ser extratos vegetais glicólicos ou hidroalcóolicos e vitaminas, como ácido

ascórbico ou uma mistura dos mesmos.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 9
caracterizado pelo fato de a solução conter entre 1 e 5% m/m de quitosana, e o diluente é uma solução aquosa com entre 0,5 e 4% m/m de ácido glicólico.

11 - Processo de acordo com a reivindicação 9
caracterizado pelo fato de a solução contendo entre 1 e 5% m/m de quitosana e o diluente é submetida à agitação entre 700 e 1000 RPM durante um período entre 12 e 36h.

12 - Processo de acordo com a reivindicação 8,
caracterizado pelo fato de na etapa (b) serem misturados entre 1 e 5% m/m de dietilaminohidroxibenzoil hexil benzoato; entre 4 e 10 % m/m de octilmetoxicinamato, entre 0,5 e 3% m/m de octocrileno; e, 1 e 5% m/m de benzofenona-3, e temperatura é de entre 50 e 70°C.

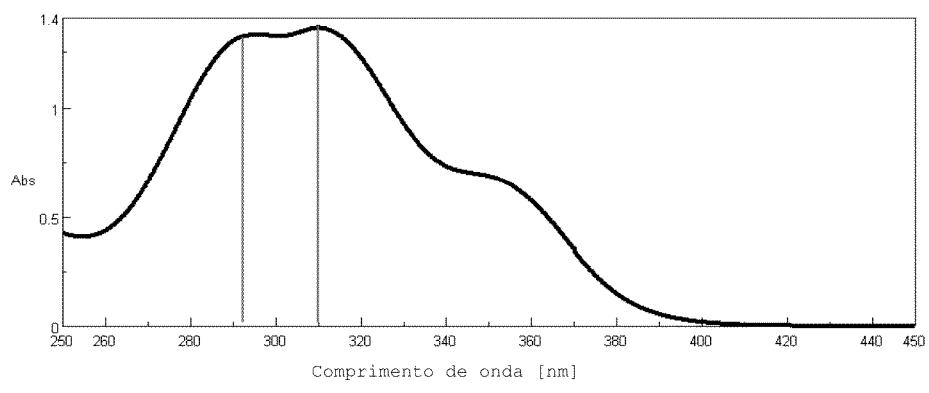
13 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 ou 12, **caracterizado** pelo fato de a fase oleosa ser obtida solubilizando os compostos fotoprotetores nos tensoativos não-iônicos sob agitação suave.

14 - Processo de acordo com a reivindicação 13,
caracterizado por solubilizar os compostos fotoprotetores entre 10 e 15% m/m de monoleato de polioxietileno sorbitano e entre 1 e 5% m/m de monoleato de sorbitano, até que a completa homogeneização.

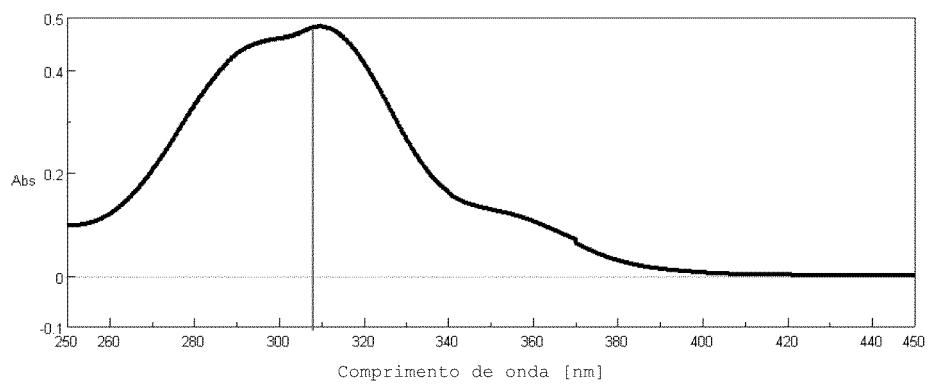
15 - Processo de acordo com a reivindicação 8,
caracterizado pelo fato de a nanoemulsão ser formada pela mistura da fase oleosa ter entre 1 e 5% m/m da solução de quitosana, entre 1 e 5% m/m do antioxidante e uma

quantidade suficiente de água para a obtenção de 100 % m/m da formulação; durante entre 15 e 40 minutos, a uma temperatura entre 2 e 7 °C, em ultrassom em amplitude de 100%.

16 - Processo de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de o antioxidante adicionado ser o ácido ascórbico, o extrato de alecrim, o extrato de romã ou uma mistura dos mesmos e o diluente adicionado ser a água.



A



B

Figura 1

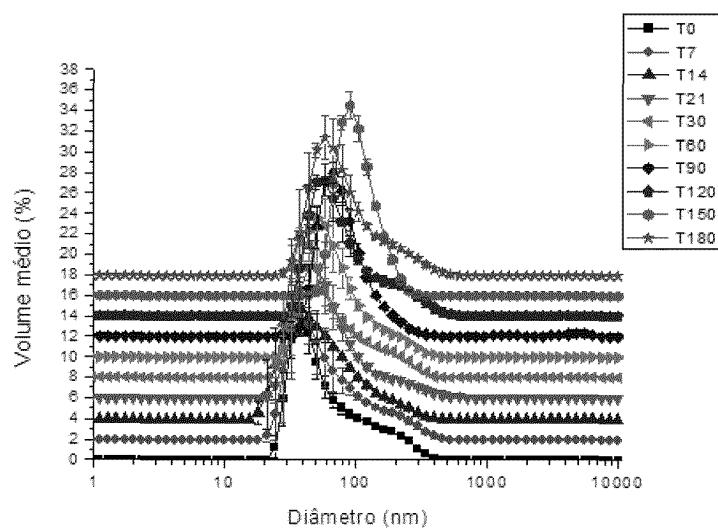


Figura 2

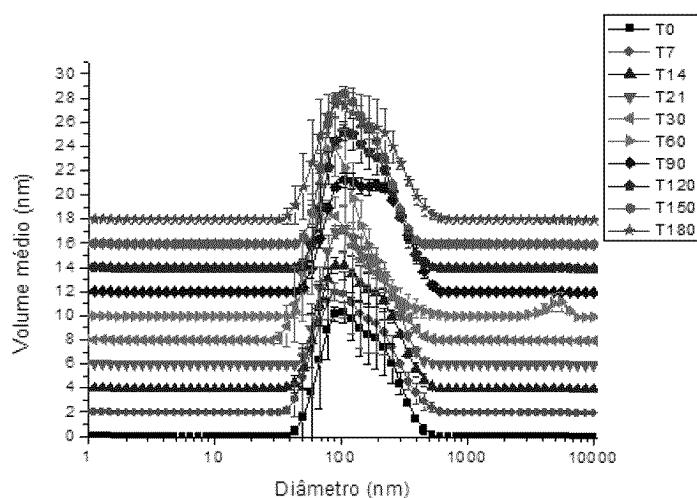


Figura 3

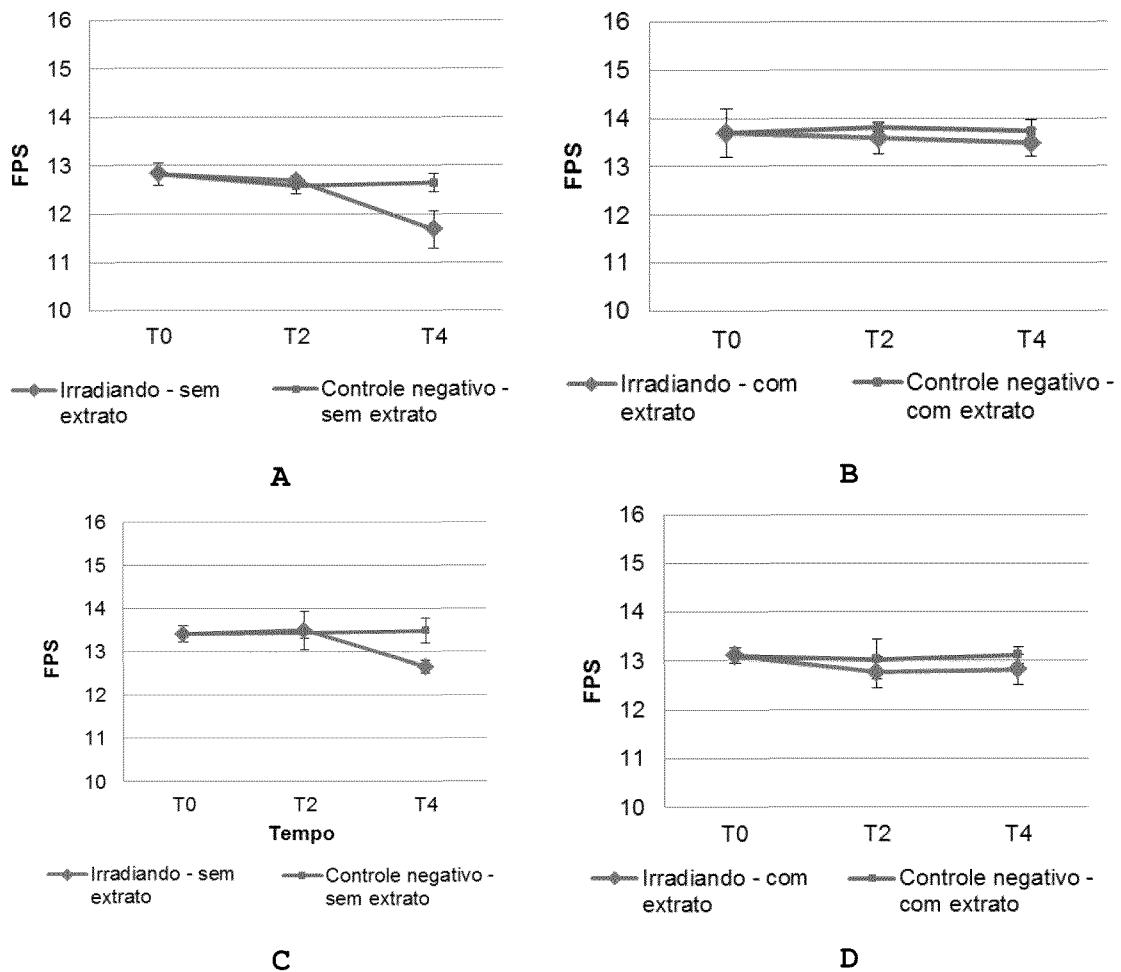


Figura 4

RESUMO

NANOEMULSÃO FOTOPROTETORA E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE

NANOEMULSÃO FOTOPROTETORA

A invenção se refere a uma nanoemulsão óleo em água fotoprotetora e antioxidante que compreende entre 10 e 25 % (m/m) de compostos fotoprotetores, ao menos um antioxidante, quitosana e tensoativos não-iônicos; e ainda a invenção trata do processo de produção destas nanoemulsões.