



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina/Apucarana
Programa de Pós-graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais - PPGCEM



LUIZA HAUSER NOVICKI

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MULTIVITAMÍNICO
ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS PARA SAÚDE DA PELE.**

LONDRINA
2022

LUIZA HAUSER NOVICKI

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MULTIVITAMÍNICO ENCAPSULADO
EM LIPOSSOMAS PARA SAÚDE DA PELE.**

**DEVELOPMENT OF A MULTIVITAMIN SYSTEM ENCAPSULATED IN
LIPOSOMES FOR SKIN HEALTH.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça

Coorientador: Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro

Viana

LONDRINA
2022



4.0 Internacional

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



LUIZA HAUSER NOVICKI

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MULTIVITAMÍNICO ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS PARA
SAÚDE DA PELE**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciência E Engenharia De Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Materiais Para Aplicação Em Engenharia E Tecnologia.

Data de aprovação: 23 de Setembro de 2022

Dr. Luis Fernando Cabeca, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Camila Fabiano De Freitas Marin, Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina (Ufsc)

Dr. Fabio Vandresen, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 23/09/2022.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me capacitado a realizar todas as minhas obrigações durante o período do Mestrado.

Aos meus pais, Luiz e Verena, que me educaram e me ajudaram a trilhar meus caminhos e completar as dificuldades enfrentadas, sempre aconselhando da maneira a tomar as melhores decisões. Aos meus irmãos Barbara e Rubens que são meu porto seguro e que sempre me apoiaram em todos os momentos. E também a todos da minha família que sempre torceram pelas minhas conquistas.

Gostaria de agradecer ao meu namorado Felipe, por toda dedicação e amor durante a minha caminhada desde a graduação até o mestrado, estando sempre ao meu lado nos momentos de felicidade e de dificuldade.

Aos amigos, Luana, Caio, Helen e Karina que tiveram junto comigo neste momento sempre dando apoio e também compartilhando conhecimento.

Agradeço também ao apoio do meu professor e orientador Luís Fernando Cabeça que pacientemente me acolheu como orientanda e me passou seus ensinamentos de forma brilhante e também ao meu coorientador Renato Márcio Ribeiro Viana por toda a sua dedicação e apoio em me auxiliar na execução deste trabalho.

Estendo meus agradecimentos aos colaboradores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná que me ajudaram de forma participativa durante a realização deste trabalho. E também aos professores Fabio Vandresen e Camila Fabiano de Freitas Marin por terem aceitado em participarem da banca deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que participaram de forma direta ou indireta durante essa etapa cheia de dificuldades e sucesso que foi a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

“Viver é acalentar sonhos e esperanças,
fazendo da fé a nossa inspiração maior. É
buscar nas pequenas coisas, um grande
motivo para ser feliz”

(Mario Quintana).

RESUMO

NOVICKI, L. H. **DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MULTIVITAMÍNICO ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS PARA SAÚDE DA PELE**. 2022. 52 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2022.

O envelhecimento da pele é um processo biológico que se caracteriza por alterações celulares, resultando na perda de suas propriedades e a replicação do tecido se torna menos eficiente. Existem alguns agentes que auxiliam na prevenção do envelhecimento da pele, como os antioxidantes que combatem a ação dos radicais livres. Porém, a pele funciona como uma barreira e para que estes ativos consigam exercer sua função eles precisam ultrapassá-la. Assim, o trabalho teve como propósito o desenvolvimento de uma formulação contendo as vitaminas C, D e E encapsulados em vesículas lipossomais para melhor penetração na pele. O desafio de colocar vitaminas com diferentes níveis de solubilidade foi iniciado com experimentos de encapsulação de cada vitamina nas vesículas lipossomais bem como sua caracterização. Diferentes métodos de encapsulação foram realizados para fornecer a melhor eficiência de encapsulação, sendo o que ofereceu melhor resultado foi o método de sonicação com 2% de T80. A formulação final inédita foi capaz de encapsular 53,69% de vitamina C (presente no cerne aquoso dos lipossomas), 99,09% de vitamina D e 100% de vitamina E (presentes na bicamada lipídica). Os testes de liberação foram realizados em célula de Franz e foi possível observar que as vitaminas encapsuladas em lipossomas levaram mais tempo para iniciar o processo de liberação e permaneceu liberando por um tempo mais prolongado comparado as vitaminas livres. Os métodos de caracterização utilizados no trabalho foram espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e cromatografia líquida de alta performance (CLAE).

Palavras-chave: pele, antioxidantes, lipossomas, vitaminas.

ABSTRACT

NOVICKI, L. H. **DEVELOPMENT OF ENCAPSULATED MULTIVITAMIN SYSTEMS IN LIPOSOMES FOR SKIN HEALTH.** 2022. 52 f. Master's Dissertation – Postgraduate Program in Materials Science and Engineering, Federal Technological University of Paraná. London, 2022

Skin aging is a biological process that is characterized by cellular changes, resulting in the loss of its properties and tissue replication becomes less efficient. There are some agents that help prevent skin aging, such as antioxidants that fight the action of free radicals. However, the skin works as a barrier and for these assets to be able to perform their function they need to overcome it. Thus, the purpose of this work was to develop a formulation containing vitamins C, D and E encapsulated in liposomal vesicles for better penetration into the skin. The challenge of placing vitamins with different levels of solubility began with experiments on the encapsulation of each vitamin in liposomal vesicles as well as their characterization. Different encapsulation methods were performed to provide the best encapsulation efficiency, and the one that offered the best result was the sonication method with 2% of T80. The new final formulation was able to encapsulate 53.69% of vitamin C (present in the aqueous core of the liposomes), 99.09% of vitamin D and 100% of vitamin E (present in the lipid bilayer). The release tests were performed in Franz cell and it was possible to observe that the vitamins encapsulated in liposomes took longer to start the release process and remained releasing for a longer time compared to free vitamins. The characterization methods used in the work were ultraviolet visible spectroscopy (UV-Vis), dynamic light scattering (DLS) and high-performance liquid chromatography (HPLC).

Keywords: skin, antioxidants, liposomes, vitamins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura molecular das vitaminas C, D ₃ e E	14
Figura 2 - Desenho demonstrando as camadas da pele.....	15
Figura 3 - Representação da penetração de substância na pele.	16
Figura 4 - Formação da vesícula lipossomal e molécula de fosfatidilcolina (SPC).	17
Figura 5 - Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas de liberação de drogas em lipossomas. (A) Lipossoma convencional (B) Lipossoma estabilizado estericamente (C) Lipossoma direcionado ao ligante (D) Lipossoma teragnóstico.	18
Figura 6 - Preparação das vesículas lipossomais através do método do filme lipídico.	20
Figura 7 - Mini extrusora.....	22
Figura 8 - Esquema da célula de difusão de Franz.	28
Figura 9 - Curva de calibração – absorbância em 254 nm pela concentração da solução da Vitamina C.....	30
Figura 10 - Curva de calibração – absorbância em 290 nm pela concentração da solução da Vitamina E.....	33
Figura 11 - Curva de calibração - absorbância em 265 nm pela concentração da solução da Vitamina D ₃	35
Figura 12 - Espectros de UV-Vis das amostras Lipossoma Vitaminas com Tween-80 (LVT), Lipossoma Vitaminas com Etanol (LVE) e Lipossoma Vitaminas com Tween-80 e Etanol (LVTE).	37
Figura 13 - Curva de calibração da vitamina C fornecida por análise de CLAE.	38
Figura 14 - Cromatograma da vitamina C, observado no comprimento de onda de 265 nm.	39
Figura 15 - Curva de calibração da vitamina D fornecida por análise de CLAE.	40
Figura 16 - Cromatograma da vitamina D e E, observado no comprimento de onda de 280 nm.	41
Figura 17 - Curva de calibração da vitamina E fornecida por análise de CLAE.	42
Figura 18 - Percentual de vitamina C livre liberado com o tempo.	43
Figura 19 - Percentual de vitamina D livre liberado com o tempo.	44
Figura 20 - Percentual de vitamina E livre liberado com o tempo.	44
Figura 21 - Percentual de vitamina C encapsulada liberada com o tempo.	46
Figura 22 - Percentual de vitamina D livre liberado com o tempo.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variações das concentrações e comprimento de onda utilizados para obtenção da curva de calibração das vitaminas.....	26
Tabela 2 - Valores de diâmetro médio, índice de polidispersividade (PDI), percentual de vitamina C encapsulada no lipossoma (EE%) e potencial zeta (PZ) para as amostras de vitamina C sonicada com tween-80 (VCST), vitamina C sonicada (VCS) e vitamina C extrusada (VCE).	31
Tabela 3 - Valores de diâmetro médio, índice de polidispersividade (PDI), percentual de vitamina C encapsulada no lipossoma (EE%) e potencial zeta (PZ) para as amostras de vitamina E extrusada (VEE) e vitamina E sonicada (VES).	34
Tabela 4 - Valores de diâmetro médio, índice de polidispersividade (PDI), percentual de vitamina C encapsulada no lipossoma (EE%) e potencial zeta (PZ) para a amostra de vitamina D (VD).	36
Tabela 5 - Valores de diâmetro médio, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta (PZ) para as amostras Lipossoma Vitaminas com Tween-80 (LVT), Lipossoma Vitaminas com Etanol (LVE) e Lipossoma Vitaminas com Tween-80 e Etanol (LVTE).	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

CLAE - Cromatografia líquida de alta performance

DLS - Espalhamento dinâmico de luz

EC - Estrato córneo

EE - Eficiência de encapsulação

GF - Fator de crescimento

LC - Vitamina C encapsulada em lipossomas

LD - Vitamina D encapsulada em lipossomas

LE - Vitamina E encapsulada em lipossomas

LVE - Lipossoma Vitaminas com Etanol

LVT - Lipossoma Vitaminas com Tween-80

LVTE - Lipossoma Vitaminas com Tween-80 e Etanol

PDI – Índice de polidispersividade do inglês polydispersity index

PZ – Potencial Zeta

SPC – Fosfatidilcolina de soja

T80 - Tween-80

UTFPR – LD - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Londrina

UV-Vis – Ultravioleta visível

VC – Vitamina C

VCE - Vitamina C extrusada (VCE)

VCS - Vitamina C sonicada (VCS)

VCST - Vitamina C sonicada com Tween-80

VD - Vitamina de D extrusada

VE – Vitamina E

VEE - Vitamina E extrusada

VES - Vitamina E sonicada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 MATERIAIS.....	21
4.2 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	21
4.2.1 VITAMINA C.....	21
1º MÉTODO.....	21
2º MÉTODO.....	22
3º MÉTODO.....	22
4.2.2 VITAMINA E	23
1º MÉTODO.....	23
2º MÉTODO.....	23
4.2.3 VITAMINA D ₃	23
4.2.4 PREPARO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM AS VITAMINAS C, D e E	24
1º MÉTODO.....	24
2º MÉTODO.....	24
3º MÉTODO.....	25
4.3 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ E POTENCIAL ZETA	25
4.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DAS VITAMINAS	26
4.4.1 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO POR UV-VIS.....	26
4.4.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO POR CLAE	26
4.6 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DAS VITAMINAS	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5.1 VITAMINA C ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS (LC)	29

5.2 VITAMINA E ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS (LE).....	32
5.3 VITAMINA D ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS	34
5.4 ENCAPSULAÇÃO DAS VITAMINAS C, D, E NAS VESÍCULAS LIPOSSOMIAS.	36
5.5 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DAS VITAMINAS	42
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A área da ciência e engenharia dos materiais está constantemente em busca de desenvolvimento de novos materiais, procurando novas formas de processamento e realizando alterações na estrutura do material buscando melhorar o desempenho para futuras aplicações, sejam estas de cunho estético, médico, industrial etc.

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), o Brasil é o quarto maior mercado consumidor global de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos, com 6,2% de fatia do mercado e um total de U\$D 30 bilhões em vendas ao consumidor no ano de 2018, estando atrás apenas do EUA (18,3% com U\$D 89,5 bilhões); China (12,7% com U\$D 62,5 bilhões) e Japão (7,7% com U\$D 37,5 bilhões) (ABIHPEC, 2019).

Entre os produtos cosméticos mais vendidos estão os dermocosméticos com ação anti-idade, que atuam no combate e prevenção do envelhecimento cutâneo, que é ocasionado pelo estresse oxidativo. O envelhecimento da pele é processo biológico que se define por alterações clínicas e celulares.

Durante o envelhecimento da pele acontece alterações no material genético, e a multiplicação celular diminui. Em decorrência disto, haverá perda de elasticidade e da capacidade de regular o metabolismo (SATO et al., 2004). O estresse oxidativo é causado e acelerado pela formação de radicais livres e para evitar este processo, a pele dispõe do seu próprio sistema de defesa (VIEIRA, 2007). Porém, a capacidade protetora desse mecanismo diminui com o envelhecimento e tratamentos externos podem reforçar a proteção natural e minimizar essas características de pele envelhecida.

Os principais agentes que podem ser usados como componentes de creme antienvelhecimento são os antioxidantes e os reguladores celulares. Os antioxidantes reduzem a degradação do colágeno, reduzindo a concentração de radicais livres nos tecidos. São exemplos de agentes antioxidante as vitaminas C, D e E.

As formulações de uso tópico devem possuir propriedades que ajudem atravessar a barreira epidérmica, composta por estrato córneo e epiderme, para que atinja o seu local de ação e assim exerça sua função na pele.

Uma maneira de superar a barreira córnea e promover a penetração percutânea é utilizar promotores de permeação. Um dos promotores que vem sendo muito estudado são os lipossomas, pois se acredita que a aplicação destas vesículas topicamente favoreça a formação de um filme lipídico oclusivo capaz de aumentar a retenção de água no estrato córneo. Assim, após a aplicação na pele, os lipossomas penetram à sua superfície, de modo que, os lipídios dos lipossomas se misturam com os lipídios intercelulares do estrato córneo, provocando desorganização nesta camada (DESAI et al., 2010).

Nesse sentido, o presente trabalho se propõe desenvolver uma formulação dermocosmética contendo vitaminas C, D e E encapsuladas em lipossomas para melhor penetração na pele. O uso comercial dos lipossomas já é bem relatado, especialmente na área farmacêutica, como em medicamentos para câncer (CHANG; YEH, 2012). Recentemente, tem surgido formulações mais tecnológicas na área de cosmética (FAKHRAVAR et al., 2016; MÜLLER et al., 2007; RAJ et al., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de formulação contendo vitamina C, D e E encapsuladas em lipossoma para liberação controlada em pele.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para que o objetivo principal seja atingido serão necessários alguns procedimentos intermediários, conforme abaixo:

- Preparar estruturas lipossomais utilizando lipídeos de fosfatidilcolina de soja (SPC) e colesterol (7:3).
- Preparar o complexo de inclusão entre lipossomas e vitamina C, D e E.
- Caracterizar os complexos lipossomas/vitaminas desenvolvidos quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão, carga superficial, eficiência de encapsulação.
- Caracterizar a formulação quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão, carga superficial, eficiência de encapsulação.
- Estudo de liberação das vitaminas do sistema lipossomal.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Pesquisas realizadas pela indústria de cosméticos por produtos que combatam e previnam o envelhecimento cutâneo, teve um crescimento exponencial nos últimos 20 anos. Pois, nas últimas décadas, a expectativa de vida da população subiu e com isso as pessoas querem envelhecer bem, o que leva, a cuidarem da saúde e da pele.

O envelhecimento cutâneo é classificado em dois tipos, quando falamos de sua causa. Em extrínseco quando causado por fatores externos, como pelo fotoenvelhecimento e em intrínseco, que é gerado por fatores genéticos, hormonais e imunológicos (GANCEVICIENE et al., 2012).

Independentemente do tipo de envelhecimento, a formação dos radicais livres é o principal responsável pelo envelhecimento da pele. Pois, estes são moléculas com elétrons desemparelhados que podem danificar células estruturais, lipídios, proteínas e DNA. A formação dos radicais livres é algo natural do organismo humano, porém o seu excesso gera o estresse oxidativo (SATO et al., 2004; VIEIRA, 2007).

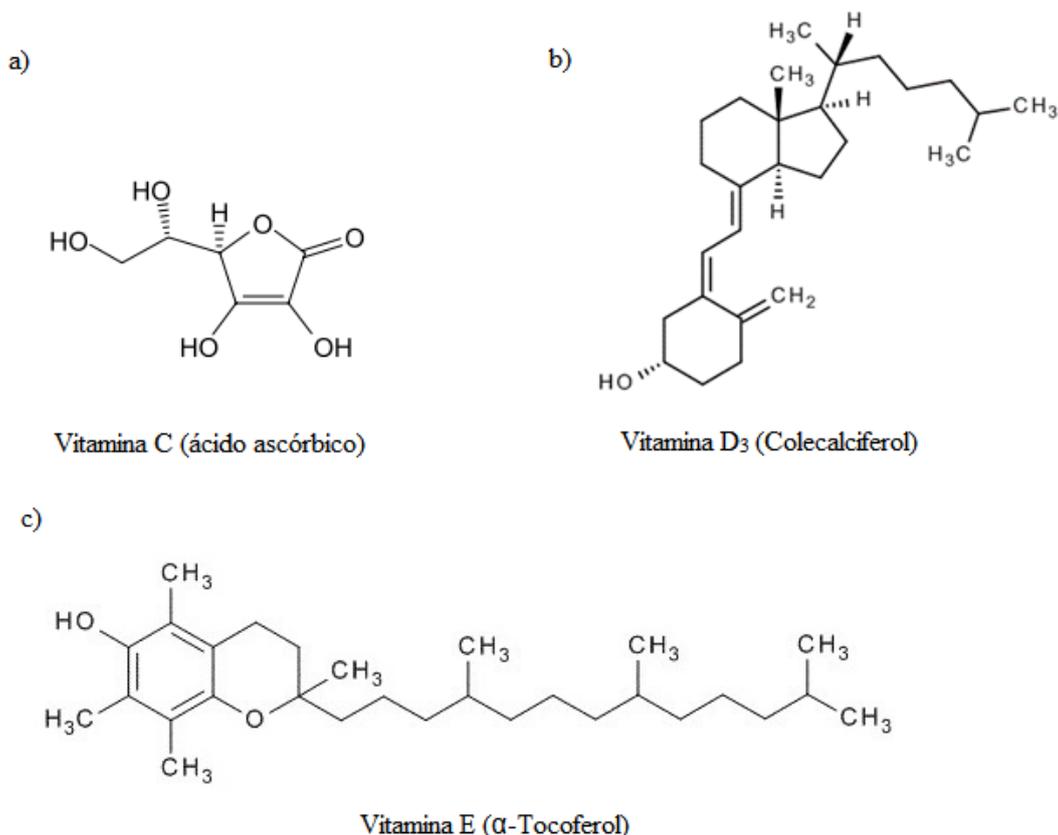
Para evitar esse processo, a pele possui seu próprio mecanismo de defesa antioxidante, mas a capacidade protetora desse mecanismo diminui conforme envelhecemos (VIEIRA, 2007). Para isso, o uso de cosméticos antioxidantes e tratamentos externos, podem prevenir a produção de radicais livres, reforçar a proteção natural e minimizar essas características de pele envelhecida.

Existem dois grupos principais de agentes que podem ser usados como componentes de creme antienvhecimento: os antioxidantes e os reguladores celulares. Os antioxidantes, como vitaminas, polifenóis e flavonoides, reduzem a degradação do colágeno, reduzindo a concentração de radicais livres nos tecidos. Os reguladores celulares, como retinóis, peptídeos e fatores de crescimento (GF), têm efeitos diretos no metabolismo do colágeno e influenciam sua produção.

As vitaminas C e E são uns dos antioxidantes mais importantes devido à sua capacidade de penetrar na pele devido ao seu peso molecular. Foi comprovado que o ácido L-ascórbico (vitamina C) (Figura 1a) em concentrações entre 5 e 15% tem um efeito antienvhecimento da pele,

induzindo a produção de colágeno, assim como enzimas importantes para a produção de colágeno e inibidores da matriz metaloproteinase. Estudos clínicos comprovaram que a proteção antioxidante é maior com a combinação de vitaminas C e E (Figura 1a e 1c) do que elas utilizadas isoladamente (GANCEVICIENE et al., 2012).

Figura 1 - Estrutura molecular das vitaminas C, D₃ e E



Fonte: Autoria própria, 2021.

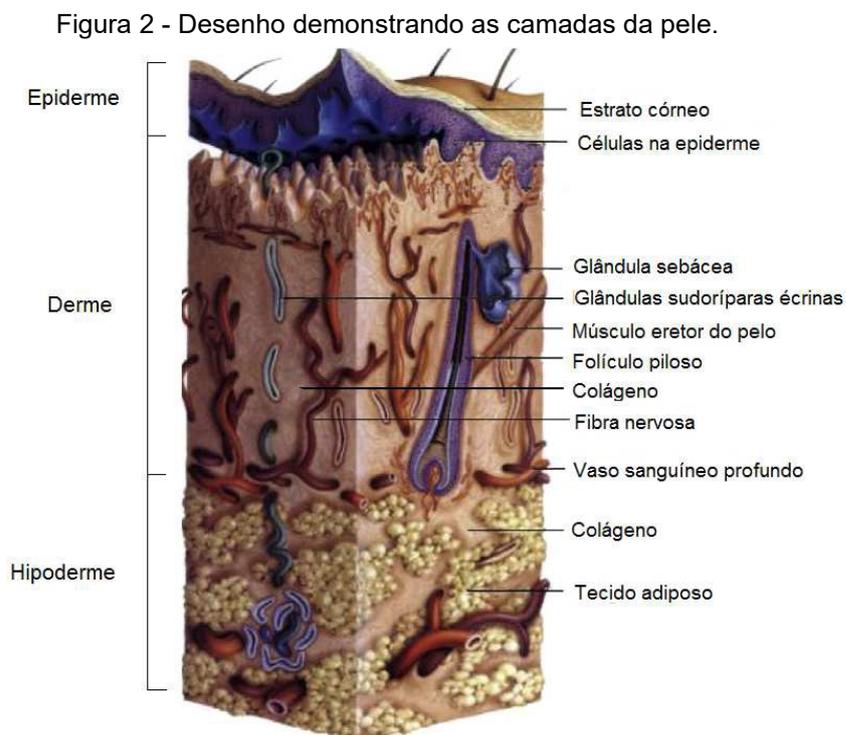
A vitamina E (α-tocoferol) (Figura 1c) que é usado como componente de produtos para a pele tem efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos em concentrações entre 2 e 20%. Atua suavizando a pele e aumentando a capacidade do estrato córneo de manter a umidade, acelerar a epitelização e contribuir para a fotoproteção da pele (GANCEVICIENE et al., 2012).

A vitamina D (Figura 1b) possui propriedades antioxidantes que combate a ação de radicais livres e também tem o poder de regular o crescimento de novas células epidérmicas. Isso faz com que uma reação química ocorra nas células diferenciadas do tecido epitelial (queratinócitos),

que passam a se dividir e diferenciar constantemente, renovando-se. Essa renovação faz com que os contornos da pele pareçam mais definidos melhorando sua elasticidade (DRAKE, 2011).

Essas formulações devem ser aplicadas de forma tópica e devem atravessar as barreiras epidérmicas - estrato córneo e epiderme viável.

A pele é o órgão mais externo do corpo e sua principal função é de proteger o organismo contra a perda de água e a entrada de agentes externos. A pele é composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 2).



Fonte: Adaptado de Bhushan et al, 2012

A epiderme é a camada mais externa da pele sendo subdividida em estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo. As células predominantes nesta camada são os queratinócitos, sendo estes capazes de sintetizar diferentes lipídios e proteínas estruturais (BARONI et al., 2012).

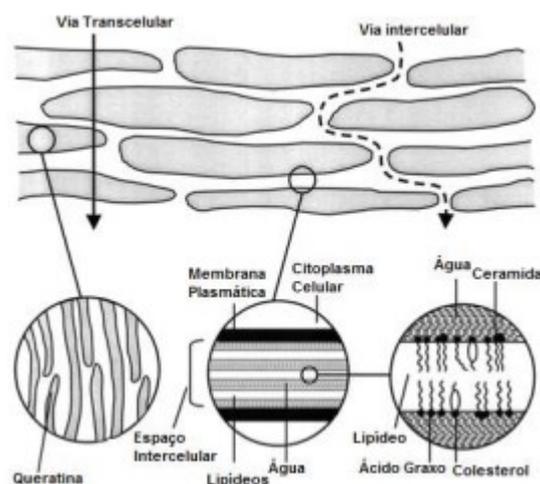
O estrato córneo (EC) é a camada mais superficial da pele, é formado por células mortas, secas, alongadas, chamadas de corneócitos, que são produtos finais da diferenciação das células produzidas na epiderme viável (ZATZ, 1993).

O EC é considerado barreira que limita a taxa de absorção percutânea e protege o corpo contra influências externas do mundo. Impede a evaporação da água do tecido abaixo e atua como uma barreira para grandes quantidades de água e substâncias estranhas com as quais a pele entra em contato (CEVC E BLUME, 1992; WEINER et al., 1989).

O EC é composto por camadas densas de células mortas achatadas cheias de proteína fibrosa, queratina, que é produzida pela epiderme abaixo. Na sua ausência, por exemplo, quando a pele está afetada por uma doença, o a absorção de fármacos pela pele é aumentada. Então, para que um ativo cosmético exerça seu efeito na pele, é necessário que sua molécula ultrapasse esta barreira e atinja seu local de ação (BARRY, 1983; CEVC AND BLUME, 1992; WEINER et al., 1989).

Existem duas vias disponíveis para a penetração de substâncias na pele: a via transepidérmica e os anexos cutâneos (Figura 3). A penetração de substâncias pela via transepidérmica ocorre por duas micro-vias: intercelular e transcelular. A rota intercelular é uma via contínua, mas tortuosa, através dos domínios lipídicos intercelulares. Já a via transcelular acontece através dos queratinócitos e, em seguida, através dos lipídios intercelulares (Williams e Barry, 1983)

Figura 3 - Representação da penetração de substância na pele.



Fonte: Adaptado de MOSER et al., 2001

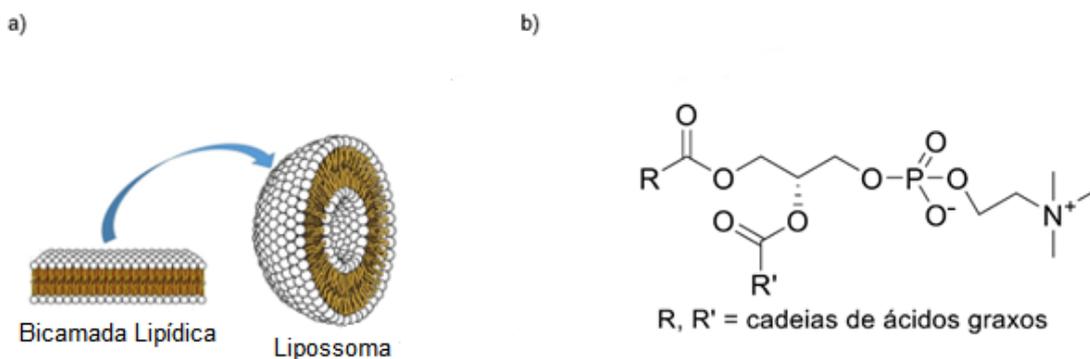
Consequentemente, a via intercelular é amplamente considerada como a principal via de permeação da maioria dos compostos, apesar da área de superfície relativamente pequena disponível para esta rota.

Muitos fatores governam a entrega de medicamentos e cosméticos na pele a partir de formulações aplicadas topicamente. Esses fatores incluem o tamanho da molécula, a lipofilicidade do componente, tipo de formulação, presença de intensificadores de penetração e físicos estado do EC.

Para promover penetração e absorção percutânea, são utilizados diferentes mecanismos para superar a barreira do estrato córneo, um exemplo é utilizar promotores de permeação como os lipossomas.

Lipossomas são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso e servem como carreadores de fármacos (Figura 4a). Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na bicamada lipídica (BATISTA *et al.*, 2007). A fosfatidilcolina (Figura 4b) está entre os lipídios mais utilizados nas formulações lipossomais, pois além de apresentar forma cilíndrica, possui alta estabilidade em variações de pH (BATISTA *et al.*, 2007).

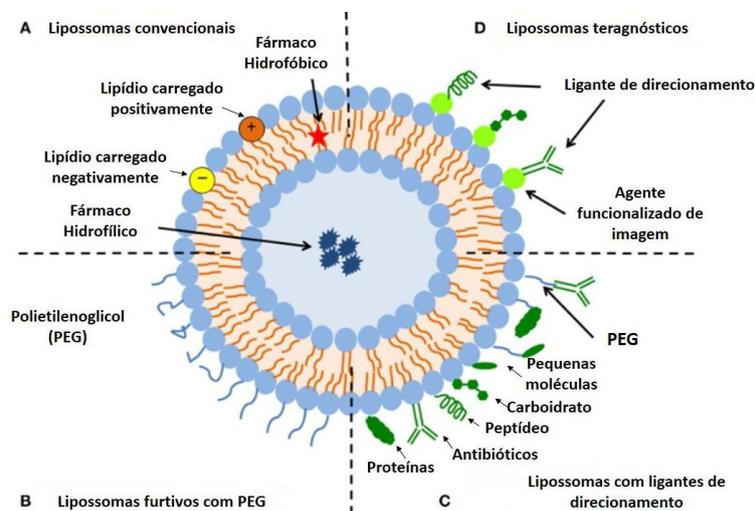
Figura 4 - Formação da vesícula lipossomal e molécula de fosfatidilcolina (SPC).



Fonte: Adaptado de LIPOLIFE, 2017

Com o passar do tempo modificações na estrutura básica das vesículas lipossomas foram realizadas para melhoria das suas propriedades bem como ampliação da aplicação terapêutica. Assim, os lipossomas podem ser classificados quanto às características de sua interação com o sistema, em quatro categorias distintas: lipossomas convencionais (Figura 5A), lipossomas estabilizados estericamente (Figura 5B), lipossomas com ligantes de direcionamento (Figura 5C) e lipossomas teragnósticos (Figura 5D) (SERCOMBE et al., 2015).

Figura 5 - Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas de liberação de drogas em lipossomas. (A) Lipossoma convencional (B) Lipossoma estabilizado estericamente (C) Lipossoma direcionado ao ligante (D) Lipossoma teragnóstico.



Fonte: Adaptado de SERCOMBE et al., 2015

O uso comercial de formulações farmacológicas com uso de lipossomas como carreadores já é bem relatado, especialmente na área farmacêutica para tratamento do câncer, de aumento de imunidade, etc (CHANG; YEH, 2012). Atualmente, também vem sendo aplicado na área de dermocosméticos, principalmente no combate de radicais livres que causam o envelhecimento cutâneo (FAKHRAVAR et al., 2016; MÜLLER et al., 2007; RAJ et al., 2012).

A capacidade dos lipossomas de aumentar a permeação de moléculas na pele envolve diferentes mecanismos de ação. Primeiramente, acredita-se que a aplicação tópica destas vesículas favoreça a formação de um filme lipídico oclusivo capaz de aumentar a retenção de água no estrato córneo e que após a aplicação na pele, os lipossomas se desintegram ou se fundem à

sua superfície. Desde modo, os lipídios dos lipossomas se misturam com os lipídeos intercelulares do estrato córneo, provocando desorganização nesta camada (DESAI et al., 2010).

Vários estudos relatam que o aumento elasticidade das vesículas lipossomais pode aumentar o transporte do fármaco através da pele, comparando-se com lipossomas com membranas rígidas (Verma, 2003). Lipossomas flexíveis possuem em sua composição tensoativo, como exemplo o Tween-80, que é capaz de reduzir a interação entre as cadeias carbônicas e consequentemente aumentar a fluidez na bicamada (Vrhovnik et al., 1998). Outros estudos também utilizam lipossomas combinados com etanol, pois o etanol diminui a tensão superficial das vesículas e as torna mais elásticas (BOUWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002).

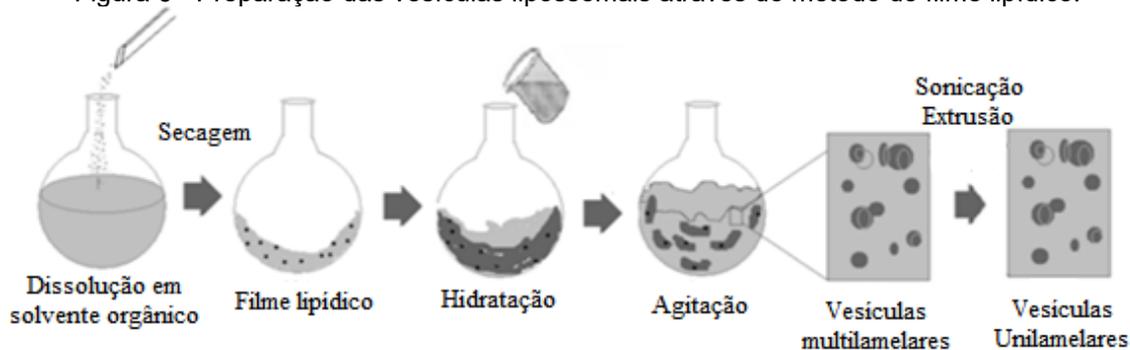
Acredita-se que vesículas, que são deformáveis suficientes, podem passar pelo EC com a estrutura intacta ou pode se acumular nas regiões semelhantes a canal no EC, dependendo de suas composições (CEVC AND BLUME, 1992). Alguns estudos ainda sugerem que lipossomas flexíveis de menores diâmetros médios ultrapassam o EC de maneira mais eficiente, pois possui menor resistência a penetração, o que resulta em um aumento de a quantidade de fármaco encontrado nas camadas mais profundas da pele (VERMA, 2003).

Existem vários métodos de preparo de lipossomas, dentre eles: hidratação do filme lipídico, evaporação de fase reversa e injeção etanólica (BATISTA et al., 2007).

Entre as mais clássicas a mais mencionada está o método da hidratação do filme lipídico, onde os lipídeos são dissolvidos em um solvente orgânico, seguido da sua evaporação e consequentemente a formação do filme lipídico.

A hidratação do filme deve ser efetuada com água ou solução tampão contendo o fármaco a ser encapsulado, se este for de natureza hidrofílica. O processo de hidratação promove a formação da dispersão de lipossomas multilamelares (Figura 6). O fármaco também pode ser dissolvido na mistura lipídica (solvente clorofórmio, antes da obtenção do filme lipídico), se for de natureza lipofílica (BATISTA et al., 2007; AKBARZADEH et al., 2013).

Figura 6 - Preparação das vesículas lipossomais através do método do filme lipídico.



Fonte: Adaptado de Sousa, 2007

Na técnica de injeção etanólica, os fosfolipídios são dissolvidos em etanol e a fase orgânica decorrente do processo, é injetada em uma fase aquosa contendo o fármaco sob agitação e em seguida o etanol é removido por evaporação (SKALKO et al., 1996)

O método de evaporação reversa consiste na mistura do fosfolipídio dissolvido em solvente orgânico com ativo a ser em capsulado dissolvido em solução aquosa. Esta mistura é então homogeneizada, para obtenção de uma emulsão. Após isso o solvente orgânico é evaporado para adquirir uma dispersão aquosa com as vesículas, que é levada para agitação para assim ocorrer a formação dos lipossomas. (TAYLOR et al., 2005).

Para a obtenção de vesículas lipossomais de tamanhos menores (nanolipossomas) duas técnicas podem ser empregadas. Método de sonicação que consiste no uso de ultrassom como fonte de energia para desarranjar e rearranjar as vesículas lipossomais e obter-se lipossomas de menores tamanhos mais homogêneos (BRAGA, 2010); e extrusão, onde a formulação lipossomas é passada por uma membrana de poros na escala entre 80 – 400 nm.

Assim, no presente trabalho o objetivo principal é o desenvolvimento de uma formulação lipossomas carreando as vitaminas C, D e E para uso contra o envelhecimento cutâneo. Após a formulação diferentes testes de caracterização serão realizados, tanto de ordem física e química.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os principais materiais utilizados para a realização do trabalho foram: Lipídeo de fosfatidilcolina de soja (SPC) (adquiridos da Lipoid GmbH); Colesterol (Sigma Life Science); tween-80 (marca Sigma-Aldrich); clorofórmio (marca Synth); vitaminas C, D₃ e E cedido pela Flora Cosméticos (V.V Indústria e Comércio de Cosméticos LTDA); álcool etílico absoluto (marca Synth);

4.2 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação de filme lipídico a partir de soluções fosfatidilcolina de soja (0,7mM), colesterol (0,3mM) ambas em solvente clorofórmio. Para cada vitamina foi realizado um processo diferente para obtenção dos nanolipossomas contendo as vitaminas para obtenção do máximo de encapsulação.

4.2.1 VITAMINA C

1º MÉTODO

Após a preparação da solução lipídica, contendo fosfatidilcolina de soja e colesterol (7:3), o solvente clorofórmio foi evaporado dando origem ao filme lipídico. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com 2 mL de solução tampão fosfato (pH 7,5, 0,05 mM) contendo vitamina C (1 mM). Os lipossomas multilamelares obtidos foram então extrusados com um sistema mini extrusor Avanti Polar Lipids® (Figura 7), equipado com membrana de policarbonato, com poros de 400 nm. Foram realizados 13 ciclos de extrusão, até obtenção dos lipossomas com tamanho homogêneo. Neste processo foi obtida a amostra de vitamina C extrusada (VCE).

Figura 7 - Mini extrusora.



Fonte: Própria autoria, 2021.

2º MÉTODO

Depois da preparação da solução lipídica, contendo Fosfatidilcolina de soja e colesterol, a solução foi evaporada para retirada do solvente (clorofórmio) dando origem ao filme lipídico. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com 2 mL de solução tampão fosfato (pH 7,5, 0,05 mM) com vitamina C (1mM). Os lipossomas multilamelares obtidos foram então levados ao sonicador (QSonica, Q500) no Laboratório multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Londrina (UTFPR-LD). Durante o processo de sonicação foi utilizado uma frequência de 20 kHz a 500 W e máxima amplitude (240 μ m). Foram realizados 10 ciclos de 1 min de agitação com 1 min de descanso sob banho de gelo. Neste processo foi obtida a amostra de vitamina C sonicada (VCS).

3º MÉTODO

Os lipídios fosfatidilcolina de soja e colesterol (7:3) foram solubilizados em 2 mL de etanol e à mistura foi adicionado 2% (em massa) de Tween-80 (ZHOU et al., 2014). A solução obtida foi evaporada a 55°C no rota evaporador por aproximadamente 3h para formação do filme. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com 2 mL de solução tampão fosfato (pH 7,5) com vitamina C (1mM). Os lipossomas multilamelares obtidos foram então levados ao homogeneizador ultrassônico (QSonica, Q500) no Laboratório multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Londrina (UTFPR-LD), durante o processo de sonicação foi utilizado uma frequência de 20 kHz a 500W e com máxima amplitude (240 μ m). Foram realizados 10 ciclos de 1 min de agitação

com 1 min de descanso sob banho de gelo. Neste processo foi obtida a amostra de vitamina C sonicada com Tween-80 (VCST).

4.2.2 VITAMINA E

1º MÉTODO

Após a preparação da solução lipídica, contendo fosfatidilcolina de soja e colesterol (7:3) (1 mM), a solução foi evaporada para retirada do solvente (clorofórmio) dando origem ao filme lipídico. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com 2 mL de uma solução contendo 80% de tampão fosfato (pH 7,5) e 20% de etanol com vitamina E (1mM). Os lipossomas multilamelares obtidos, foram então extrusados. Foram realizados 13 ciclos de extrusão, até obtenção dos lipossomas com tamanho homogêneo. Neste processo foi obtida a amostra de vitamina E extrusada (VEE).

2º MÉTODO

Após a preparação da solução lipídica, contendo fosfatidilcolina de soja e colesterol (7:3) (1 mM), a solução foi evaporada para retirada do solvente (clorofórmio) dando origem ao filme lipídico. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com 2 mL de uma solução contendo 80% de tampão fosfato (pH 7,5) e 20% de etanol com vitamina E (1mM). Os lipossomas multilamelares obtidos foram então levados ao homogeneizador ultrassônico (QSonica, Q500) no Laboratório multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Londrina (UTFP-LD). Durante o processo de sonicação foi utilizado uma frequência de 20 kHz a 500W e com máxima amplitude (240µm). Foram realizados 10 ciclos de 1 min de agitação com 1 min de descanso sob banho de gelo. Neste processo foi obtida a amostra de vitamina E sonicada (VES).

4.2.3 VITAMINA D₃

Após a preparação da solução lipídica, contendo fosfatidilcolina de soja, colesterol (7:3) (1 mM) e Vitamina D₃ (1mM) em clorofórmio, a solução foi evaporada para retirada do solvente, dando origem ao filme lipídico. Em

seguida, o filme lipídico foi hidratado com 2 mL de solução tampão fosfato (pH 7,5). Os lipossomas multilamelares obtidos foram então extrusados em mini extrusora com membrana de policarbonato de 400 nm de poro. Foram realizados 13 ciclos de extrusão, até obtenção dos lipossomas com tamanho homogêneo. Neste processo foi obtida a amostra de vitamina de D extrusada (VD).

4.2.4 PREPARO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL COM AS VITAMINAS C, D e E

1º MÉTODO

Foi preparado uma solução lipídica, contendo fosfatidilcolina de soja, colesterol (7:3) (3 mM) e Vitamina D₃ (1mM) em clorofórmio e à mistura foi adicionado 2% (em massa) de Tween-80. A mistura foi evaporada para retirada do solvente (clorofórmio), dando origem ao filme lipídico. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com 2 mL de solução tampão fosfato (pH 7,5) contendo Vitamina E (1mM) e Vitamina C (1mM). Os lipossomas multilamelares obtidos foram então levados ao homogeneizador ultrassônico (QSonica, Q500). Durante o processo de sonicação foi utilizado uma frequência de 20 kHz a 500W e com máxima amplitude (240 µm). Foram realizados 10 ciclos de 1 min de agitação com 1 min de descanso sob banho de gelo. Neste processo foi obtida a amostra de Lipossoma Vitaminas com Tween-80 (LVT).

2º MÉTODO

Foi preparado uma solução lipídica, contendo fosfatidilcolina de soja, colesterol (7:3) (3 mM) e Vitamina D₃ (1mM) em clorofórmio, a solução foi evaporada para retirada do solvente, dando origem ao filme lipídico. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com 2 mL de uma solução contendo 80% de tampão fosfato (pH 7,5) e 20% de etanol com vitamina E (1mM) e Vitamina C (1mM). Os lipossomas multilamelares obtidos foram então levados ao homogeneizador ultrassônico (QSonica, Q500), durante o processo de sonicação foi utilizado uma frequência de 20 kHz a 500W e com máxima amplitude (240µm). Foram realizados 10 ciclos de 1 min de agitação com 1 min de descanso sob banho de gelo. Neste processo foi obtida a amostra de Lipossoma Vitaminas com Etanol (LVE).

3º MÉTODO

Foi preparado uma solução lipídica, contendo fosfatidilcolina de soja, colesterol (7:3) (3 mM) e Vitamina D₃ (1mM) em clorofórmio e à mistura foi adicionado 2% (em massa) de Tween-80, a solução foi evaporada para retirada do solvente, dando origem ao filme lipídico. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com 2 mL de uma solução contendo 80% de tampão fosfato (pH 7,5) e 20% de etanol com vitamina E (1mM) e Vitamina C (1mM). Os lipossomas multilamelares obtidos foram então levados ao homogeneizador ultrassônico (QSonica, Q500), durante o processo de sonicação foi utilizado uma frequência de 20 kHz a 500W e com máxima amplitude (240µm). Foram realizados 10 ciclos de 1 min de agitação com 1 min de descanso sob banho de gelo. Neste processo foi obtida a amostra Lipossoma Vitaminas com Tween-80 e Etanol (LVTE).

4.3 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ E POTENCIAL ZETA

O espalhamento dinâmico de luz (do inglês dynamic light scattering - DLS) é uma técnica, que permite a determinação do tamanho médio e distribuição do tamanho médio de partículas em dispersão (HALLETT, 1994).

A distribuição de tamanho dos lipossomas presentes nas amostras foi medida a partir alíquotas de 600 µL (1 mM) em um aparelho LITESIZER 500 – Anton Paar no Laboratório multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Londrina (UTFP-LD).

O potencial Zeta (Z) é uma medida da magnitude da repulsão/atração das cargas entre partículas e o meio onde estão dispersas, sendo utilizado para avaliar a carga de superfície dessas partículas e a estabilidade da suspensão (BOTARI; BERNARDO; DANTAS, 2012).

Foram realizadas análises do potencial zeta e do índice de polidispersividade das amostras (1 mM), em um aparelho LITESIZER 500 – Anton Paar. Para o teste de potencial zeta amostras foram diluídas e feitas em triplicata.

4.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DAS VITAMINAS

4.4.1 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO POR UV-VIS

A eficiência de encapsulação das vitaminas em lipossomas foi determinada utilizando a técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação (Millipore, USA, ME Cut-off 10,000Da). Uma quantidade de 2 mL da amostra lipossomas/vitamina foi colocada em uma unidade de filtro e submetida a uma ultracentrifugação. A quantidade que passou através do filtro (vitamina livre) foi quantificada utilizando espectrofotometria de UV. O cálculo de eficiência foi realizado através da Equação 1:

$$\%Vitamina_{encapsulada} = \frac{(C_i - C_x)}{C_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que C_i e C_x representam, respectivamente, as concentrações iniciais e a analisada.

A quantidade de vitamina encapsulado nos sistemas foi obtida através do espectrofotômetro UV-Vis – Modelo: Libra Biochromem. Realizou-se uma curva de calibração das vitaminas utilizando diferentes concentrações.

Tabela 1: Variações das concentrações e comprimento de onda utilizados para obtenção da curva de calibração das vitaminas.

Vitamina	C	D ₃	E
Comprimento de onda (λ)	254nm	265nm	290nm
Variação das concentrações	1 a 0,2 mM	1 a 0,04 mM	1 a 0,02 mM

Fonte: Autoria própria, 2021.

4.4.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO POR CLAE

Ao realizar a quantificação das amostras de lipossomas com todas as vitaminas (LVT, LVE, LVTE) através da técnica de UV-Vis, ocorreu interferência no pico e não foi possível quantificá-las. Então, a análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

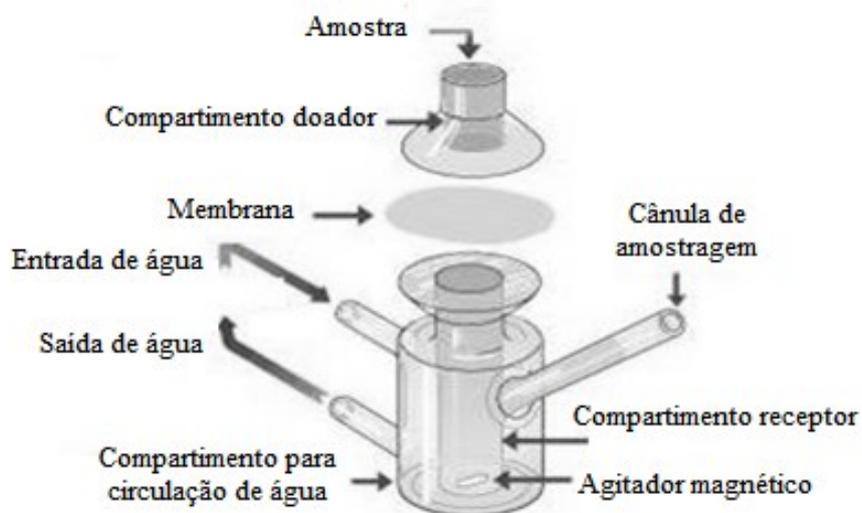
As curvas de calibração foram construídas a partir da diluição da solução de 10 mmol, composta pelas três vitaminas diluídas em 20% etanol e 80% água destilada, em água destilada (1 mmol/L). Foram utilizadas concentrações de: 0,1 mmol/L, 0,5 mmol/L, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 3 mmol/L e 5 mmol/L do complexo vitamina C, D, E. A quantificação foi realizada pelo espectro de absorção no ultravioleta, no comprimento de 265 nm para a Vitamina C e 280 nm para as vitaminas D e E. O percentual de encapsulação de cada vitamina foi calculado com a equação 1 descrita na seção 4.4.1.

Para a quantificação das vitaminas C, D e E e obtenção dos cromatogramas, foi utilizado o equipamento UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific), software Chromeleon, do Departamento de Química da UTFPR, campus Londrina. Utilizou-se a coluna cromatográfica C18 Phenomenex de fase reversa, com dimensões de 150 x 4,6 mm. A injeção da mostra foi de 5 µL, com fluxo de 1,5ml/min. A fase móvel foi composta por 100% de metanol.

4.6 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DAS VITAMINAS

O ensaio de liberação visou avaliar a capacidade que uma determinada formulação possui em liberar o fármaco nela contida para o meio, onde ele irá agir. Estes estudos são realizados em células de difusão do tipo Franz, que contém dois compartimentos, o denominado doador (superior) e o receptor (inferior). A membrana é posicionada entre os compartimentos e o compartimento receptor é preenchido com uma solução ideal para o experimento. Já no compartimento doador é colocado uma solução que será testada.

Figura 8 - Esquema da célula de difusão de Franz.



Fonte: Figura adaptada de Silva (2008).

Ao compartimento doador foi adicionado 1 mL da formulação a ser testada, enquanto o compartimento receptor foi acrescido de 15 mL de uma solução composta por 20% etanol e 80% de água destilada.

As células montadas foram, então, colocadas sob agitação magnética. Alíquotas de 5 mL foram coletadas nos tempos de 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 3,5 e 15 horas para a formulação das vitaminas puras e nos tempos de 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 23, 53 horas para as formulações das vitaminas encapsuladas em lipossoma, sendo que imediatamente após a retirada de cada amostragem, as alíquotas foram analisadas por CLAE. Em seguida, as amostras eram devolvidas ao sistema receptor da célula de Franz.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A habilidade das vesículas lipossomais em encapsular e liberar substâncias hidrofóbicas e lipofílicas foi utilizado para o desenvolvimento de uma formulação inédita contendo 3 vitaminas: C, D e E. Essa nova formulação tem o propósito de melhorar a penetração das vitaminas na pele para melhoria da saúde da pele.

Para o desenvolvimento da formulação lipossomais encapsulando vitaminas C, D e E, primeiro foi realizado o desenvolvimento da encapsulação de cada vitamina na vesícula lipossomas, bem como sua quantificação em termos de eficiência de encapsulação.

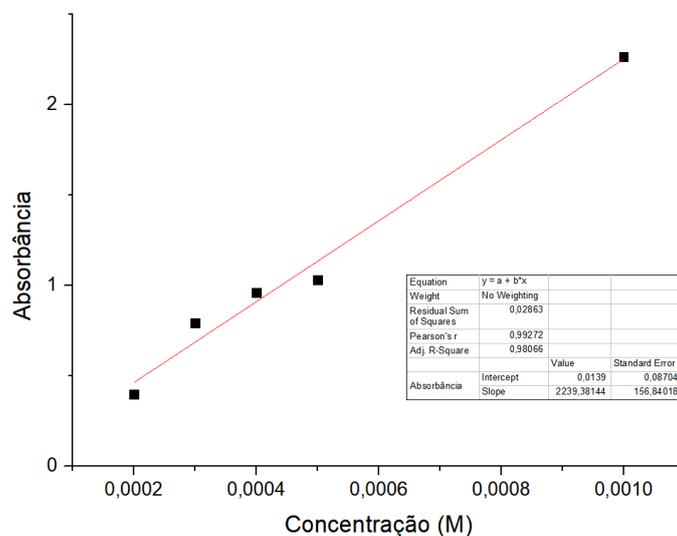
5.1 VITAMINA C ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS (LC)

Vitamina C é uma molécula solúvel em água e assim pode ser encapsulada no compartimento aquoso dos lipossomas ou pode localizar-se na fase aquosa externa. Assim, quando uma maior quantidade de vesículas é formada maior será a quantidade de VC encapsulada no compartimento aquoso, e melhor será a eficiência de encapsulação (EE). O aumento de EE% de substâncias hidrofílicas associadas ao aumento da quantidade de lipídios foi descrita anteriormente. Entretanto, uma busca de maior EE pode ser encontrada através dos diferentes métodos de obtenção de lipossomas para encapsular a vitamina C.

Foram realizados três diferentes métodos, todos partindo de formação de filme lipídico. No primeiro caso, após a formação do filme lipídico, foi realizada a extrusão do complexo lipossomas/Vitamina C. No segundo caso a vitamina C foi sonicada e no terceiro caso foi adicionado tween-80 ao filme lipídico e a amostra foi sonicada.

Caracterizações do complexo foram realizadas (Tabela 2): diâmetro médio dos lipossomas, polidispersividade (PDI), potencial zeta (PZ), porcentagem de eficiência de encapsulação (EE%). Para o calcula da EE da VC foi realizado uma curva de calibração (Figura 9)

Figura 9 - Curva de calibração – absorvância em 254 nm pela concentração da solução da Vitamina C.



Fonte: Autoria própria, 2021.

O coeficiente de correlação linear (R^2) foi de 0,9806, isto implica que o modelo utilizado é capaz de interpretar 98,06% dos pontos plotados. Equação que exprimi a relação linear entre a absorvância da vitamina C e as concentrações das soluções.

$$y = 0,0139 + 2239,38144x \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde (y) se refere a concentração de vitamina C e (x) a intensidade da absorvância no comprimento de onda de 254 nm no espectro de absorção no UV-Vis.

Além da composição dos lipossomas (tipo de lipídio) a ausência de tensoativos pode influenciar na porcentagem de encapsulação do fármaco. As substâncias hidrofílicas também tem seu %EE influenciada pela técnica de preparação (Maione-Silva et al., 2019).

Tabela 2 - Valores de diâmetro médio, índice de polidispersividade (PDI), percentual de vitamina C encapsulada no lipossoma (EE%) e potencial zeta (PZ) para as amostras de vitamina C sonicada com tween-80 (VCST), vitamina C sonicada (VCS) e vitamina C extrusada (VCE).

Amostra	Diâmetro médio (nm)	PDI	EE (%)	PZ
VCST	109,00 ± 0,23	0,236 ± 0,022	58,87	-5,2 ± 0,30
VCS	269,95 ± 3,70	0,267 ± 0,025	52,89	-6,8 ± 0,25
VCE	266,47 ± 3,20	0,240 ± 0,024	8,8	-22,8 ± 0,31

Fonte: Autoria própria, 2021.

Como pode ser visto na Tabela 2 a EE% foi menor para o método de extrusão, isso pode ser explicado pelo fato de a vitamina C ser uma molécula muito hidrofílica. Com isso, a sua afinidade com a água impede que ela entre com facilidade no lipossoma. Sendo assim, é necessário um método com uso de maior energia (sonicação) que possibilite a desestruturação da vesícula lipossomal e sua formação subsequente. Esse processo aumenta a quantidade de ativos hidrofílicos no compartimento aquoso interno da vesícula. Observa-se também um pequeno aumento da porcentagem de encapsulação na presença do Tween-80. Isso pode ser explicado, pois o T80 é um surfactante e deixa os lipossomas estericamente estabilizados. O uso de T80 também fornece lipossomas mais flexíveis, o que proporciona uma melhoria na permeabilidade cutânea (Zhou et al., 2014)

As partículas nas formulações VCS e VCE apresentaram diâmetros médios próximos a 270 nm. Apenas a amostra VCST teve diâmetro médio próximo 100 nm (109 nm). Vesículas menores também podem apresentar melhor permeabilidade na pele.

O índice de polidispersividade (PDI) foi usado como uma medida de uma distribuição de tamanho unimodal. Onde os valores das amostras de PDI de aproximadamente 0,2 indica uma amostra homogênea, enquanto um PDI (> 0,3) indica uma maior heterogeneidade na distribuição do tamanho das partículas (Verma, 2003). Todas as formulações apresentaram PDI inferiores à 0,3.

Pode-se observar que todas as amostras de lipossomas obtiveram valores negativos de potencial Zeta, sendo satisfatório para o presente estudo, pois, lipossomas carregados negativamente são capazes de interagir melhor com a membrana celular dos queratinócitos e fibroblastos.

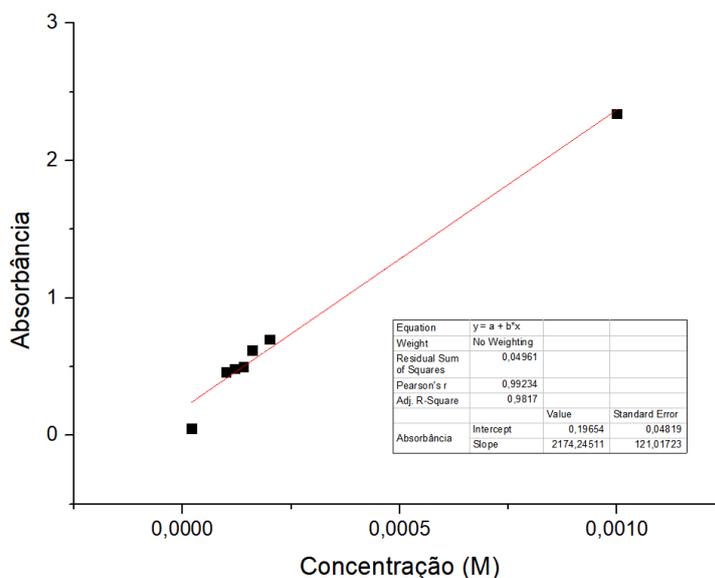
5.2 VITAMINA E ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS (LE)

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel, portanto é solúvel em lipídeos e pouco solúvel em água. Com isso, foi necessária a adição do álcool para aumentar da solubilidade da vitamina E em soluções aquosas e conseguir a obtenção da solução adequada para hidratação do filme lipídico (OLIVEIRA et al., 2014).

Foram realizados dois métodos diferentes, todos partindo de formação de filme lipídico. No primeiro caso foi realizado a extrusão da Vitamina E, já no segundo caso a vitamina E foi sonicada.

Caracterizações do complexo foram realizadas (Tabela 3): diâmetro médio dos lipossomas, polidispersividade (PDI), potencial zeta (PZ), porcentagem de eficiência de encapsulação (EE%). Para o cálculo da EE da VE foi realizado uma curva de calibração (Figura 10)

Figura 10 - Curva de calibração – absorbância em 290 nm pela concentração da solução da Vitamina E.



Fonte: Autoria própria, 2021.

O coeficiente de correlação linear (R^2) foi de 0,9817, isto implica que o modelo utilizado é capaz de interpretar 98,17% dos pontos plotados. Utilizando-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi obtida a Equação que exprimi a relação linear entre a absorbância da vitamina E e as concentrações das soluções.

$$y = 0,19654 + 2174,24511x \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde (y) se refere a concentração de vitamina E e (x) a intensidade da absorbância no comprimento de onda de 290 nm no espectro de absorção no UV-Vis.

Para o cálculo da porcentagem de eficiência de encapsulação da vitamina E no lipossoma, a amostra lipossomas/VE, foi preparada e levada para à ultracentrifugação. A vitamina E livre (filtrada) da amostra foi encaminhada para análise de UV-VIS para obtenção da absorbância e a eficiência de encapsulação foi calculada utilizando a Equação 3.

Tabela 3 - Valores de diâmetro médio, índice de polidispersividade (PDI), percentual de vitamina C encapsulada no lipossoma (EE%) e potencial zeta (PZ) para as amostras de vitamina E extrusada (VEE) e vitamina E sonicada (VES).

Amostra	Diâmetro médio (nm)	PDI	EE (%)	PZ – ζ (mV)
VEE	245,60 \pm 1,73	0,22 \pm 0,028	93,06	-11,93 \pm 0,23
VES	181,54 \pm 1,20	0,23 \pm 0,025	95,01	-8,40 \pm 0,19

Fonte: Autoria própria, 2021.

Pode-se observar na Tabela 3 que a EE% foi alta, acima de 90%, em ambos os métodos, pois a molécula de vitamina E possui um comportamento lipossolúvel, o que facilita a sua entrada na vesícula lipossomal.

As partículas lipossomais nas formulações VEE e VES apresentaram diâmetros médios de 245 nm e 181 nm respectivamente. A técnica de sonicação fornece vesículas menores uma vez usa energia em comparação com a de extrusão (uso de força mecânica).

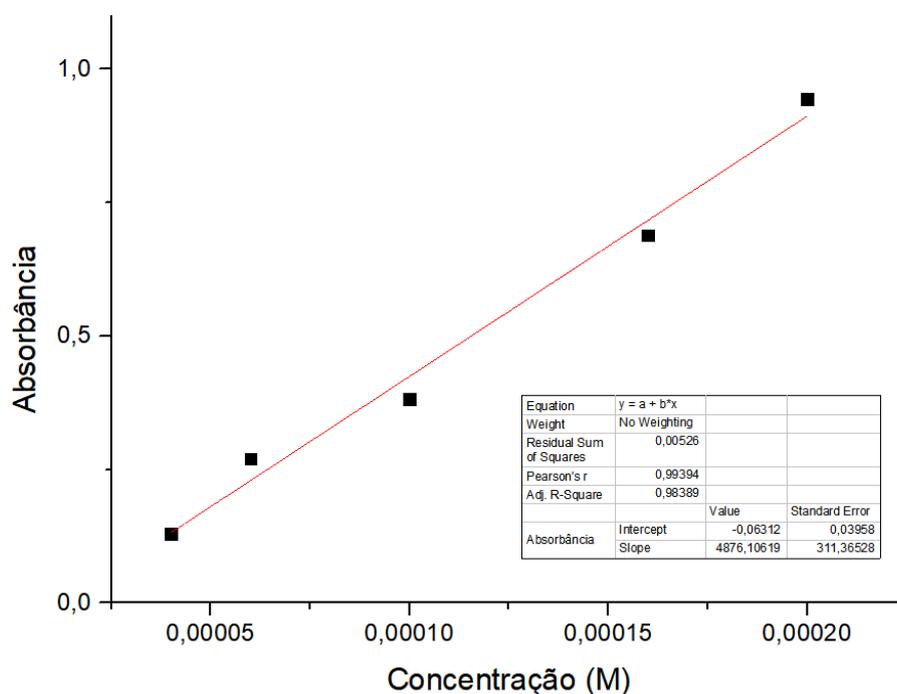
Os valores obtidos de PDI das amostras de vitamina E foram muito próximos de 0,2 indica uma distribuição homogênea, assim como os resultados obtidos para as amostras de vitamina C.

5.3 VITAMINA D ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS

A vitamina D é uma vitamina extremamente lipossolúvel, que é sintetizada a partir do colesterol com auxílio da irradiação solar sobre a pele (LOBO, 2007). Um dos benefícios desta vitamina é a revitalização da pele, e como se trata de um composto altamente lipofílico, para que aumente sua bioacessibilidade no organismo foi utilizado o processo de encapsulação em matriz lipídica (Parada & Aguilera, 2007).

Os resultados das caracterizações que foram realizados estão na (Tabela 4): diâmetro médio dos lipossomas, polidispersividade (PDI), potencial zeta (PZ), porcentagem de eficiência de encapsulação (EE%). Para o cálculo da EE da Vitamina D foi realizado uma curva de calibração (Figura 11).

Figura 11 - Curva de calibração - absorvância em 265 nm pela concentração da solução da Vitamina D₃.



Fonte: Autoria própria, 2021.

O coeficiente de correlação linear (R^2) foi de 0,98389, isto implica que o modelo utilizado é capaz de interpretar 98,39% dos pontos plotados. Utilizando-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi obtida a Equação que exprimi a relação linear entre a absorvância da vitamina D₃ e as concentrações das soluções.

$$y = -0,06312 + 4876,10619x \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde (y) se refere a concentração de vitamina E e (x) a intensidade da absorvância no comprimento de onda de 265 nm no espectro de absorção no UV-Vis.

Para o cálculo da porcentagem de eficiência de encapsulação da vitamina E no lipossoma, a amostra VD, foi preparada e levada para à ultracentrifugação. A vitamina D₃ livre (filtrada) foi encaminhada para análise de UV-VIS para obtenção da absorvância e a eficiência de encapsulação foi calculada utilizando a Equação 4.

Tabela 4 - Valores de diâmetro médio, índice de polidispersividade (PDI), percentual de vitamina C encapsulada no lipossoma (EE%) e potencial zeta (PZ) para a amostra de vitamina D (VD).

Amostra	Diâmetro médio (nm)	PDI	EE (%)	PZ – ζ (mV)
VD	265,4 ± 8,7	0,274 ± 0,025	98,71	-9,8 ± 0,13

Fonte: Autoria própria, 2021.

A EE% da vitamina D₃ foi alta, e relativamente mais alta do que as outras vitaminas, pois a sua molécula é hidrofóbica e possui um comportamento lipossolúvel, o que facilita a sua entrada no lipossoma.

O PDI, assim como as outras vitaminas, apresenta um valor menor que 0,3 o que indica uma distribuição homogênea. O diâmetro médio está dentro do esperado.

5.4 ENCAPSULAÇÃO DAS VITAMINAS C, D, E NAS VESÍCULAS LIPOSSOMIAS.

Para a viabilidade do estudo, foi feita a junção das três vitaminas em solução lipossomal. Onde foram realizados três métodos diferentes, todos partindo de formação de filme lipídico e todos obtidos por sonicação.

No primeiro caso foi realizada uma solução lipossomal com tween-80 e sem etanol, já no segundo caso foi realizado uma solução lipossomal sem tween-80 e com etanol e no terceiro caso foi realizado uma solução lipossomal com tween-80 e com etanol.

Os resultados das caracterizações que foram realizados estão na (Tabela 5): diâmetro médio dos lipossomas, polidispersividade (PDI) e potencial zeta (PZ).

Tabela 5 - Valores de diâmetro médio, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta (PZ) para as amostras Lipossoma Vitaminas com Tween-80 (LVT), Lipossoma Vitaminas com Etanol (LVE) e Lipossoma Vitaminas com Tween-80 e Etanol (LVTE).

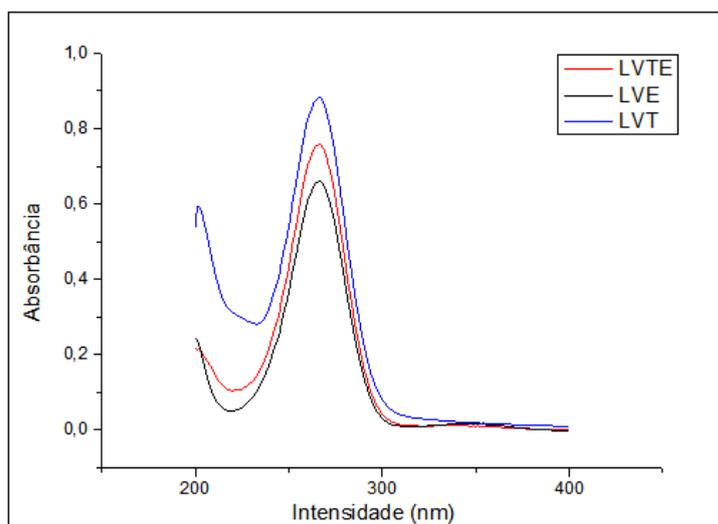
Amostra	Diâmetro médio (nm)	PDI	PZ – ζ (mV)
LVT	256,4 \pm 6,0	0,273 \pm 0,055	-3,9 \pm 0,15
LVE	23474,3 \pm 1430,71	0,394 \pm 0,022	-20,43 \pm 0,12
LVTE	224,3 \pm 5,6	0,267 \pm 0,03	-5,7 \pm 0,34

Fonte: Autoria própria, 2021.

É possível observar que as amostras LVT e LVTE, apresentaram diâmetros médios de 256 nm e 224,3 nm respectivamente, e mais baixo que amostra LVE. Isto está ligado ao uso do T80, pois por ser um surfactante traz uma boa estabilidade deixando os lipossomas estericamente estabilizados.

Os valores obtidos de PDI das amostras LVT e LVTE foram abaixo de 0,3 que indica uma distribuição homogênea, diferentemente da amostra LVE que apresentou um comportamento heterogêneo, pois seu PDI foi superior a 0,3.

Figura 12 - Espectros de UV-Vis das amostras Lipossoma Vitaminas com Tween-80 (LVT), Lipossoma Vitaminas com Etanol (LVE) e Lipossoma Vitaminas com Tween-80 e Etanol (LVTE).



Fonte: Autoria própria, 2021.

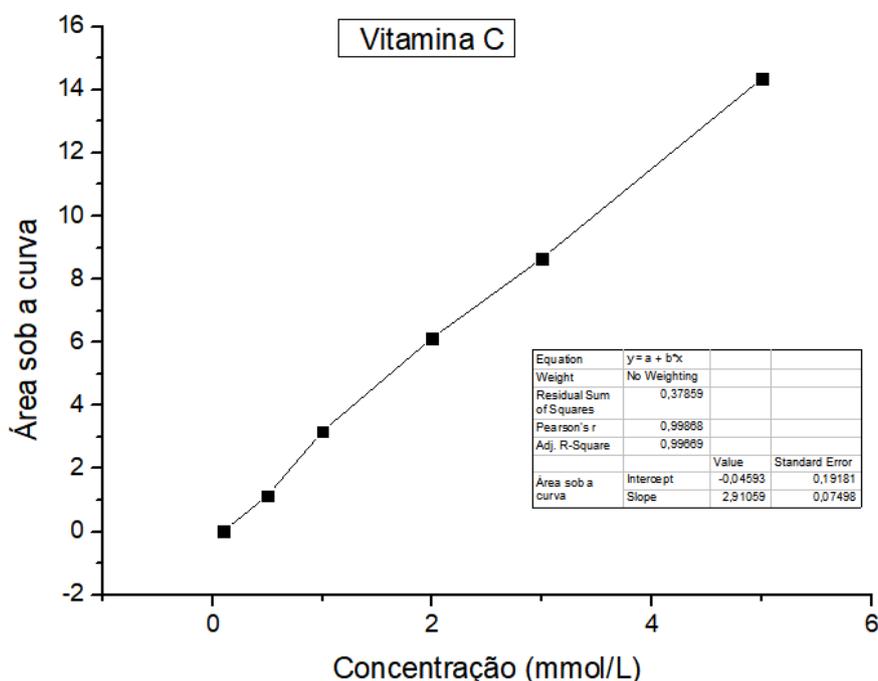
Através da varredura das amostras obtidas pelo UV-Vis foi possível verificar que se obteve somente uma curva que representa as 3 vitaminas o que evidencia que ocorreu interferência entre os picos. Isto, nos mostra que

este método não é qualificado para calcular o EE% de cada vitamina nas amostras.

Foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como nova estratégia de quantificação, pois esta técnica analítica é capaz de separar, identificar e quantificar os componentes numa mistura, onde cada uma é detectada em tempo diferente durante a análise.

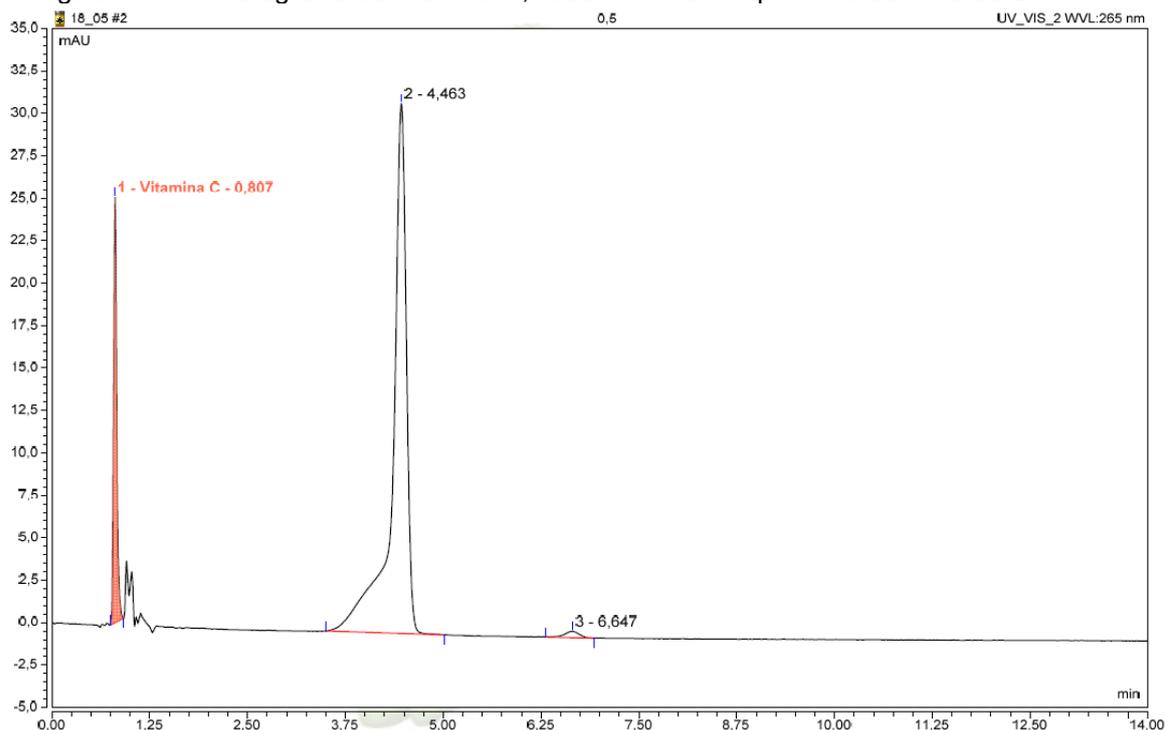
Para construção da curva de calibração do padrão analítico da Vitamina C utilizou-se soluções da vitamina C com as concentrações de: 0,1, 0,5, 1, 2, 3 e 5 mmol/L. A curva de calibração obtida está apresentada na Figura 12, na qual equação da reta é $y = -0,04593 + 2,91059x$ e $R^2 = 0,99669$. O cromatograma mostrou um pico com tempo de retenção de 0,81 minutos, em comprimento de onda 265 nm (Figura 13)

Figura 13 - Curva de calibração da vitamina C fornecida por análise de CLAE.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 14 - Cromatograma da vitamina C, observado no comprimento de onda de 265 nm.

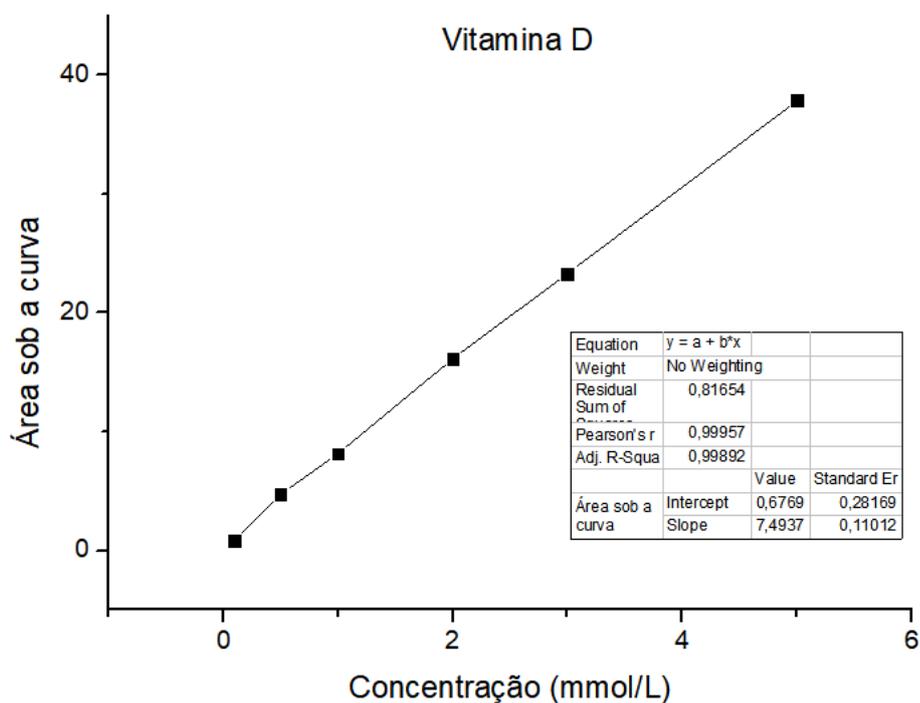


Fonte: Autoria própria, 2022.

A eficiência de encapsulação foi calculada a partir da área do pico no cromatograma (Figura 14) e de acordo com a curva de calibração, a concentração da solução foi de 4,6308 mmol/L. Esse resultado é a concentração que atravessou o filtro de ultracentrifugação, ou seja, vitamina C não encapsulada. Considerando a concentração da solução inicial como 10 mmol/L, a EE% da vitamina C foi de 53,69%.

Para o cálculo da curva de calibração do padrão analítico da Vitamina D utilizou-se as concentrações de: 0,1 mmol/L, 0,5 mmol/L, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 3 mmol/L e 5 mmol/L. Obteve-se a curva obtida está apresentada na Figura 14, na qual equação da reta é $y = 0,6739 + 7,4937x$ e $R^2 = 0,99892$. O cromatograma mostrou um pico com tempo de retenção de 4,5 minutos, em comprimento de onda 280 nm (Figura 15).

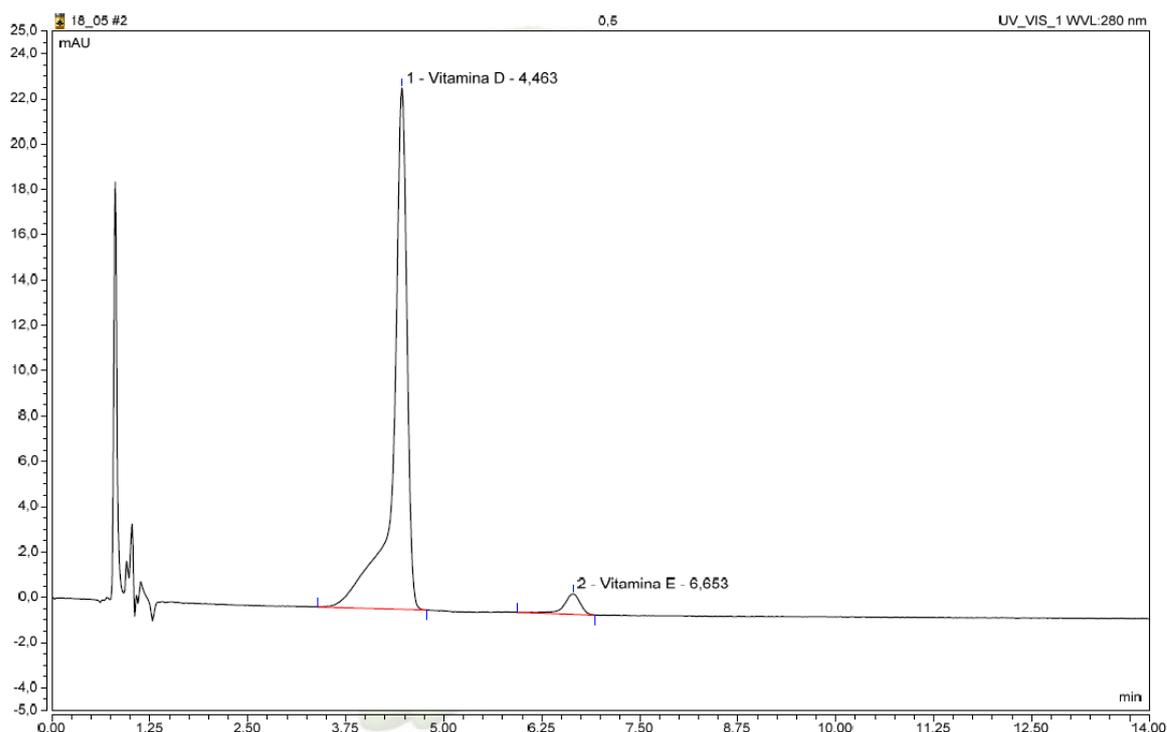
Figura 15 - Curva de calibração da vitamina D fornecida por análise de CLAE.



Fonte: Autoria própria, 2022.

A eficiência de encapsulação foi calculada a partir da área do pico no cromatograma (Figura 16) e de acordo com a curva de calibração, a concentração da solução foi de 0,0905 mmol/L. Esse resultado é a concentração que atravessou o filtro de ultracentrifugação, ou seja, vitamina D não encapsulada. Considerando a concentração da solução inicial como 10 mmol/L, a EE% da vitamina D foi de 99,09%.

Figura 16 - Cromatograma da vitamina D e E, observado no comprimento de onda de 280 nm.

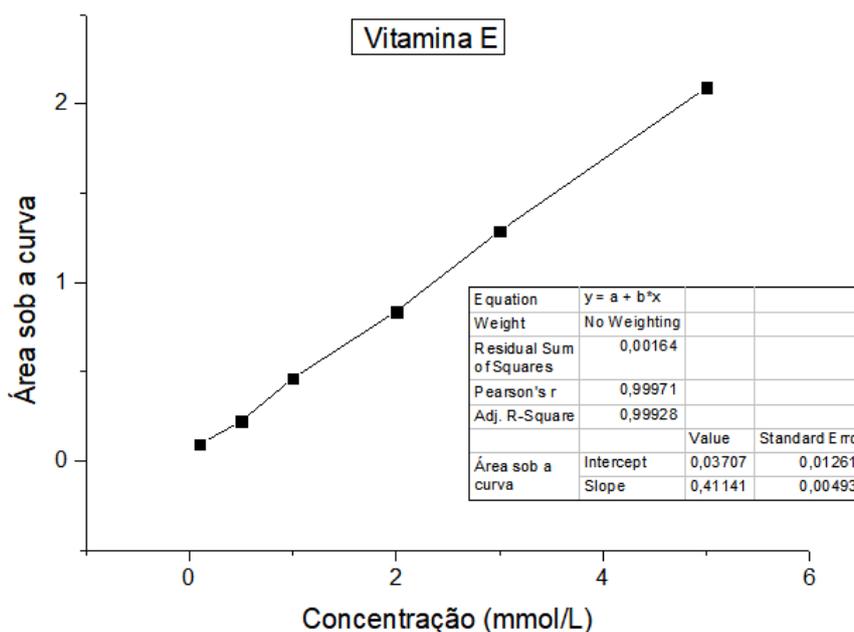


Fonte: Autoria própria, 2022.

Para o cálculo da curva de calibração do padrão analítico da Vitamina E utilizou-se as concentrações de: 0,1 mmol/L, 0,5 mmol/L, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 3 mmol/L e 5 mmol/L. A curva obtida está apresentada na Figura 16, na qual equação da reta é $y = 0,0371 + 0,4114x$ e $R^2 = 0,99669$. A concentração da solução resultante da análise de adsorção foi calculada a partir da área do pico no cromatograma (Figura 16). O cromatograma mostrou um pico com tempo de retenção de 6,65 minutos, em comprimento de onda 280 nm (Figura 16).

De acordo com a curva de calibração, a concentração da solução restante foi de 0 mmol/L. Considerando a concentração da solução inicial como 10 mmol/L, a EE% da vitamina E foi de 100%.

Figura 17 – Curva de calibração da vitamina E fornecida por análise de CLAE.



Fonte: Autoria própria 2022.

Observa-se por esses resultados que houve valores de complexação das vitaminas D e E uma vez que essas moléculas são lipofílicas. Para a vitamina C temos um menor valor. Esse resultado era esperado uma vez que a molécula de vitamina C é hidrossolúvel.

5.5 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DAS VITAMINAS

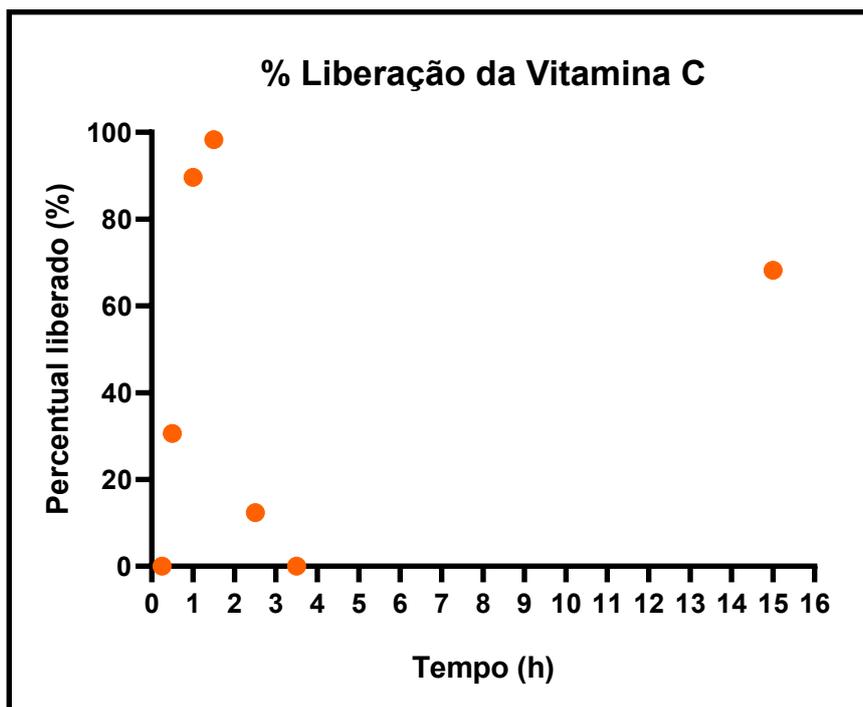
O ensaio de liberação foi realizado para tanto para as vitaminas livres e as vitaminas nano encapsuladas. Foi utilizado célula de Franz para o ensaio de liberação em condições sink. A câmara receptora foi preenchida com uma solução de 15 ml de solução composta por 20% etanol e 80% água destilada. Já no compartimento doador foi colocado a solução das formulações com concentração de 10 mmol (sendo composto por 3,333 mmol de cada vitamina) que serão testadas. A câmara de Franz foi deixada em temperatura ambiente, e a solução do compartimento doador foi mantida sob agitação constante.

Alíquotas da solução receptora foram coletadas em tempos pré-determinados e quantificado por CLAE para realização dos cálculos da porcentagem de liberação de cada vitamina.

Para o cálculo da concentração das alíquotas, utilizou-se a equação da reta, obtida pela curva padrão de cada vitamina. Os valores das concentrações obtidas, foram convertidas para o percentual em relação a solução inicial.

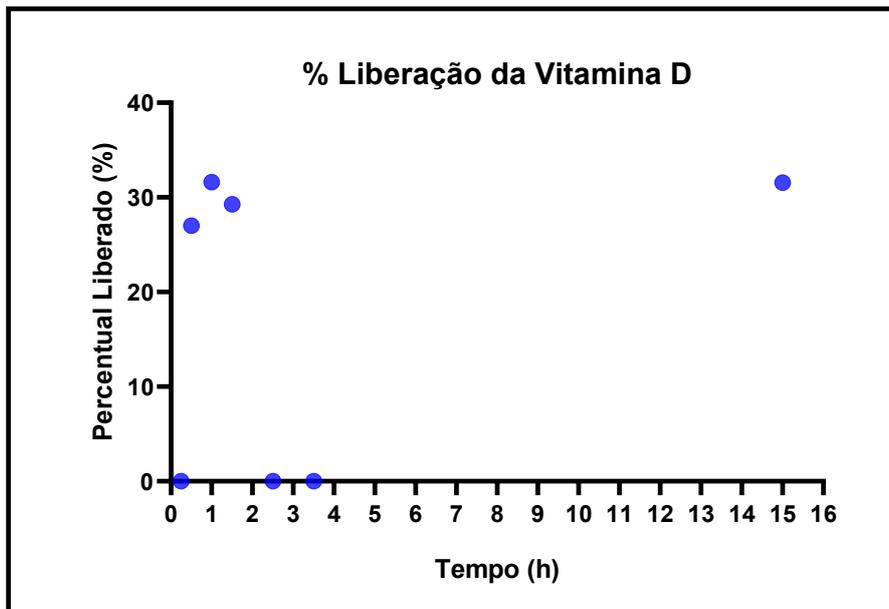
As curvas com o percentual liberação de cada vitamina em relação ao tempo de experimento estão apresentadas abaixo.

Figura 18 - Percentual de vitamina C livre liberado com o tempo.



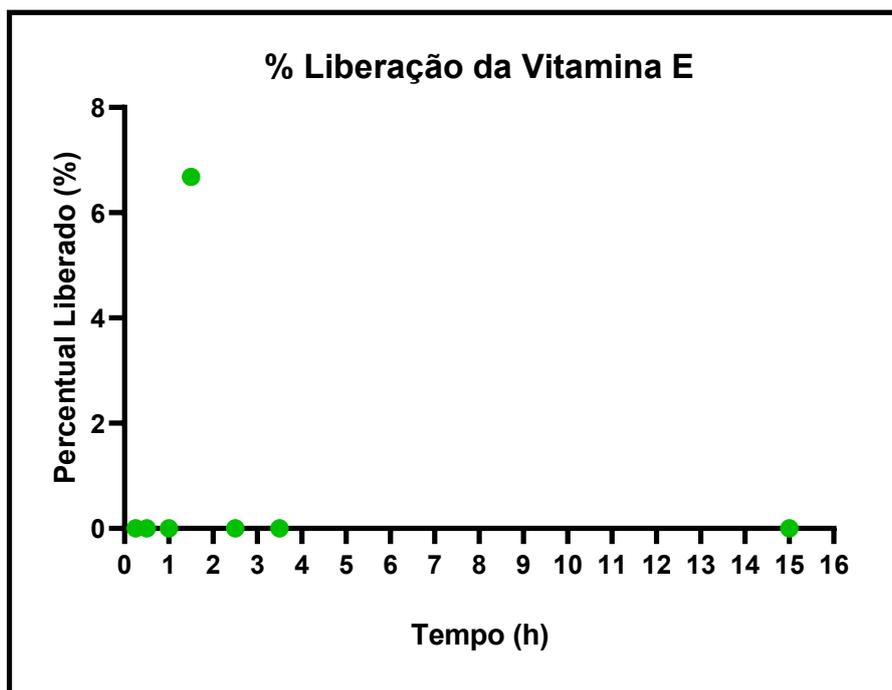
Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 19 – Percentual de vitamina D livre liberado com o tempo.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 20 – Percentual de vitamina E livre liberado com o tempo.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Em virtude da instabilidade das vitaminas a curva de liberação não apresentou uma curva apropriada, com curva exponencial com o passar do tempo até alcançar um platô. Considerações poderiam ser retiradas, como por exemplo: vitamina C livre começa a liberação com um aumento linear até que

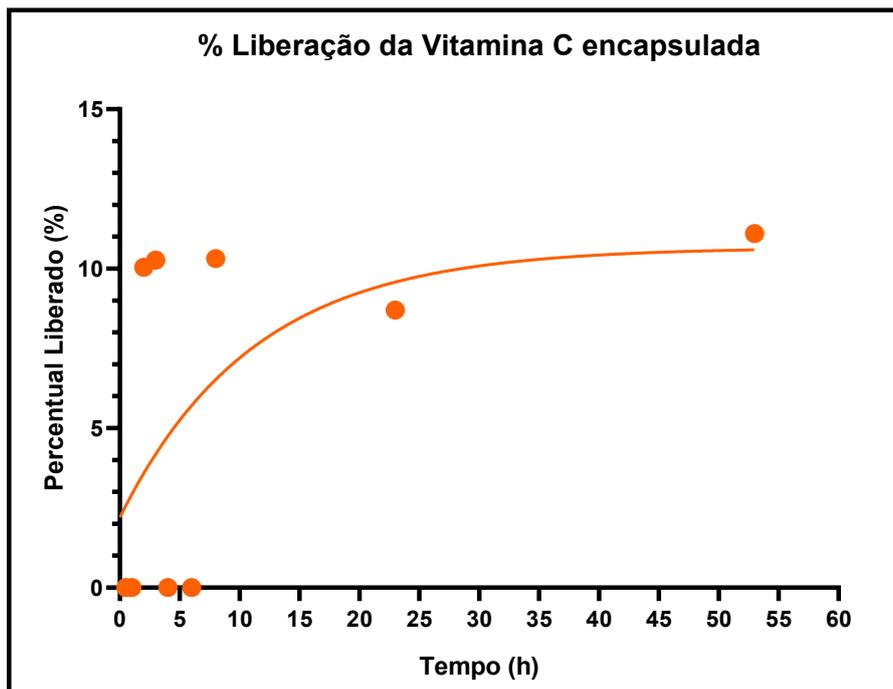
em aproximadamente 1 hora e meia atinge o platô. A vitamina D tem uma pequena liberação nas primeiras 2 horas de ensaio e só volta a liberar com 15 horas de ensaio. Já a vitamina E teve apenas um pico de liberação com 1 hora análise, o com um percentual tão baixo que não podemos considerar que teve uma liberação significativa.

Levando em consideração a liberação das vitaminas encapsuladas em lipossomas os resultados mostram valores mais coerentes. Para as vitaminas C e D encontramos uma tendência exponencial de liberação com o passar do tempo, também foi observado uma liberação mais lenta. Observa-se também que houve valores de liberação depois de 50h para a vitamina C e para vitamina D. Esse resultado mostra que ainda há moléculas dessas vitaminas intactas e protegidas dentro da vesícula lipossomal. A porcentagem de liberação não pode ser considerada, uma vez que as vitaminas podem apresentar uma degradação quando exposta na solução.

Durante o tempo de ensaio não se observou liberação de Vitamina E, isto pode nos indicar que a vitamina E mostrou alta afinidade pelos componentes da nanoestrutura, que resultou em baixa taxa de liberação.

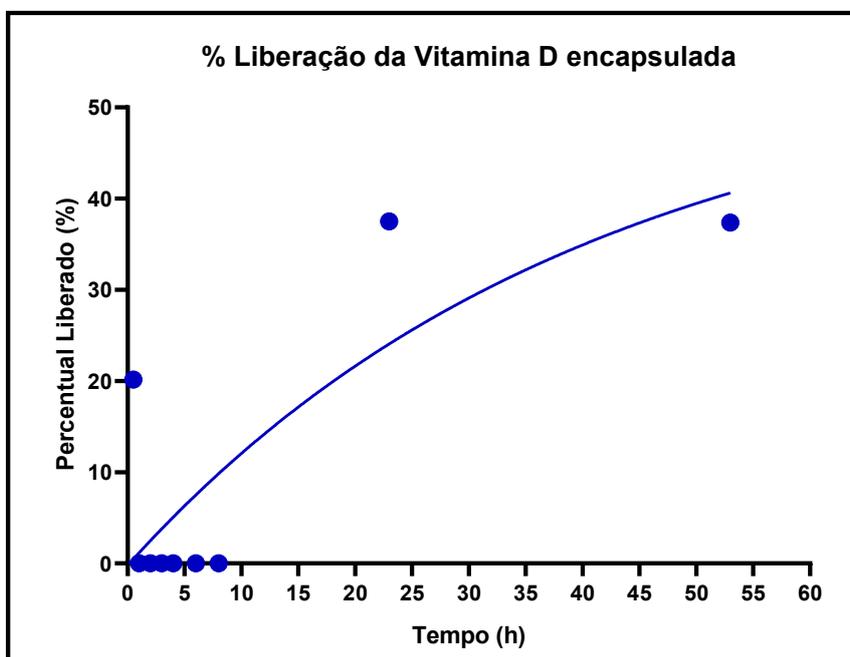
As curvas com o percentual liberação da vitamina C e vitamina D em relação ao tempo de experimento estão apresentadas abaixo.

Figura 21 - Percentual de vitamina C encapsulada liberada com o tempo.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 22 - Percentual de vitamina D livre liberado com o tempo.



Fonte: Autoria própria, 2022.

6 CONCLUSÃO

No desenvolvimento das formulações lipossomais encapsulando a vitamina C, o método que forneceu os melhores resultados para de eficiência de encapsulação (58,87%), diâmetro médio (109 nm) e índice de polidispersividade (0,236), foi a amostra (VCST) que continha Tween-80 e no qual passou pelo processo de sonicação. O tamanho das vesículas está adequado para permeação cutânea, e o PDI está dentro dos parâmetros indicando uma amostra homogênea em termos de tamanho das vesículas.

Para as amostras da formulação lipossomal com vitamina E, a amostra que obteve os melhores resultados foi a VES, que passou pelo processo de sonicação. O tamanho das vesículas (181,54 nm) está adequado para permeação cutânea, e o PDI (0,23) indica uma amostra homogênea. A EE obtida por este método também apresentou os melhores valores (95,01%).

Na formulação lipossomal com a vitamina D foi realizado apenas um método, pois com ele já foi possível se obter resultados excelentes para EE (98,71%), o PDI foi abaixo de 0,3 o que exprime que a amostra é homogênea. O diâmetro médio (265,4) foi dentro do esperado para ocorrer a permeação na pele.

Para a viabilidade do estudo, foi realizada a junção das três vitaminas em solução lipossomal. Onde foram testadas três condições diferentes para obtenção do melhor resultado de EE%, todas sendo obtidas através de filme lipídico e sonicação. A amostra que apresentou os melhores resultados de diâmetro médio (224,3 nm) e PDI (0,267) foi a LVTE, que contém Tween-80 e Etanol. Para análise de EE% da formulação final (Vitaminas C, D e E encapsuladas em lipossomas) foi utilizado experimentos de CLAE. Pelos cálculos obteve-se uma excelente eficiência de encapsulação das vitaminas D e E, sendo 99,09% e 100% respectivamente, enquanto a vitamina C teve uma EE de 53,69%. Isso pode ser explicado pois a vitamina C é hidrofílica e a encapsulação de substâncias hidrofílicas em sistemas nanoestruturados é um desafio, pois o composto hidrofílico tem afinidade pela fase aquosa externa da dispersão e tende a ficar fora da matriz (IQBAL et al., 2015).

Para o teste de liberação em virtude da instabilidade das vitaminas a curva de liberação não apresentou uma curva apropriada. Porém, ao se

comparar a liberação das vitaminas livres com as encapsuladas é possível observar que as vitaminas encapsuladas apresentaram uma liberação mais lenta. Observa-se também que houve valores de liberação depois de 50h para a vitamina C e para vitamina D. Por outro lado, durante o tempo de ensaio não se observou liberação de Vitamina E, o que pode nos indicar que esta vitamina tem alta afinidade pelos componentes da nanoestrutura.

Como pode ser observado o melhor método para obtenção de menores tamanho das vesículas lipossomais foi a sonicação, pois é um método que utiliza o ultrassom como fonte de energia o que possibilite uma maior quebra da vesícula lipossomal e sua formação subsequente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC. Anuário 2019. 2019. Disponível em: <https://abihpec.org.br/anuario-2019/mobile/index.html#p=1>.

AKBARZADEH, Abolfazl; REZAEI-SADABADY, Rogaie; DAVARAN, Soodabeh; JOO, Sang Woo; ZARGHAMI, Nosratollah; HANIFEHPOUR, Younes; SAMIEI, Mohammad; KOUHI, Mohammad; NEJATI-KOSHKI, Kazem. Liposome: classification, preparation, and applications. : classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, [s.l.], v. 8, n. 1, 22 fev. 2013. Springer Science and Business Media LLC.

BARONI, A.; BUOMMINO, E.; DE GREGORIO, V.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V.; WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*, v. 30, p. 257-62, 2012.

BARRY, B.W. *Dermatological formulations: percutâneas absorption*. New York: Marcel Dekker, 1983. 480p. (Drug and the pharmaceutical sciences, v.18).

BATISTA, Cinthia Meireles *et al.* Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, [s.l.], v. 43, n. 2, p. 167-179, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO).

BHUSHAN, B. Nanotribological and nanomechanical properties of skin with and without cream treatment using atomic force microscopy and nanoindentation. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 367, p. 1-33, 2012.

BOTARI, Alexandre; BERNARDO, Luiz di; DANTAS, Angela di Bernardo. Análise e modelação matemática da interação entre partículas na filtração direta utilizando a teoria coloidal. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 81-94, mar. 2012. FapUNIFESP (SciELO).

BRAGA, R.R. Desenvolvimento e Validação de metodologia analítica para determinação de alantoína em lipossomas e formulações tópicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), setembro, 2010

CEVC, G., Blume, G., 1992. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta* 1104, 226–232

CHANG, C.-M. e Yeh, H.-D. : Investigação do transporte de solutos em campos não estacionários de fluxo não saturado, *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 16, 4049-4055.

DESAI, PINAKI; PATLOLLA, RAM R.; SINGH, MANDIP. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. *Molecular Membrane Biology*, [s.l.], v. 27, n. 7, p. 247-259, out. 2010. Informa UK Limited.

DRAKE, Victoria J.. Vitamin D and Skin Health. Oregon State University: Copyright Instituto Linus Pauling 2011-2020, 2011.

FAKHRAVAR Z, EBRAHIMNEJAD P, DARAEI H, AKBARZADEH A (2016) Nanolipossomos: métodos de síntese e aplicações em cosméticos. *J Cosmet Laser Ther* 18 (3): 174–181

GANCEVICIENE, Ruta et al. Skin anti-aging strategies. *Dermato-endocrinology*, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 308-319, jul. 2012. Informa UK Limited.

HALLETT, F. R. Particle size analysis by dynamic light scattering. *Food Research International*, v. 27, n. 2, p. 195–198, 1994.

IQBAL, M. et al. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015.

LOBO, A.M.; LOURENÇO, A.M. *Biossíntese de produtos naturais*. 1 ed. Lisboa: IST Press, 2007, p. 142.

MAIONE-SILVA, L., DE CASTRO, E. G., NASCIMENTO, T. L., CINTRA, E. R., MOREIRA, L. C., CINTRA, B. A. S., VALADARES, M. C., & LIMA, E. M. (2019). Ascorbic acid encapsulated into negatively charged liposomes exhibits increased skin permeation, retention and enhances collagen synthesis by fibroblasts. *Scientific Reports*, 9(1), 522.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, n. 2, p. 103–112, 2001.

MULLER, R. H., IMMING, H. E HOMMOSS, A. (2007) Prolonged release of perfumes by nanolipid carriers (NLC) technology. *Eur Cosmet*, 11.

OLIVEIRA, F., FONSECA, L. G., SILVA, C. v., PIRES, R. F., & MALAGONI, R. A. (2014). SOLUBILIDADE DA VITAMINA E EM MISTURA ETANOL+ÁGUA. *Anais Do X Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 260–265.
<https://doi.org/10.5151/chemeng-cobec-ic-03-ts-083>

PARADA, J., AGUILERA, J.M.J. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72, 21-32.

RAJ, S. , et al. (2012) Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *J Pharm Bioall Sci*, 4, 186-93.

SATO, Mayumi Eliza Otsuka et al. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. *Acta Farm. Bonaerense, Curitiba - Paraná*, v. 23, n. 3, p. 418-424, 05 jun. 2004.

SERCOMBE, L. et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology*, v. 6, p. 1–13, 2015.

SILVA JA. Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados. [Tese] Recife: Departamento Ciências Farmacêuticas, UFPE; 2008.

SKALKO, N., BRANDL, M., BEDIREVID-LADAN, M., FILIPOVID-GREIE, J., & JALSENJAK, I. Liposomes with nifedipine and nifedipinecyclodextrin complex: Calorimetric and plasma stability comparison. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4,359–366, 1996.

TAYLOR, T. M.; WEISS, J.; DAVIDSON, P. M.; BRUCE, B. D. Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Food Science and Nutrition*, v. 45, 587-605, 2005.

VIEIRA, Fabiano Nadson Magacho. Mecanismos Moleculares do Envelhecimento Cutâneo: Dos Cromossomos às Rugas. São Paulo: Artes Médicas, 2007. 92 p.

WEINER, N., F. MARTIN E M. RIAZ. 1989. Liposomes as a drug delivery system. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15 : 1523–1541.

VERMA, D. (2003). Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 258(1–2), 141–151.

ZATZ, J. L. *Skin Permeation - Fundamentals and Application*. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993.

ZHOU, W., LIU, W., ZOU, L., LIU, W., LIU, C., LIANG, R., & CHEN, J. (2014). Storage stability and skin permeation of vitamin C liposomes improved by pectin coating. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 330–337.