



# Estudo de liberação *in vitro* do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila incluído em lipossoma e $\beta$ -ciclodextrina

Mota, A.C.V.<sup>1\*</sup>; Volpato, N.M.<sup>1</sup>; Freitas, Z.M.F.<sup>1</sup>; Santos, E.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Recebido 19/08/2008 - Aceito 16/12/2008

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar a liberação do *p*-metoxicinamato de octila (MCO) a partir de três formulações em gel. A primeira contendo o MCO livre, a segunda contendo o MCO incluído em  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD/MCO) e a terceira contendo o MCO incluído em lipossoma (lipossoma/MCO). O estudo de liberação foi realizado em células de difusão do tipo Franz usando membrana artificial de acetato de celulose. A concentração de MCO liberada foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os perfis de liberação *in vitro* mostraram que a inclusão do MCO nesses sistemas de liberação reduziu a liberação do MCO para a solução receptora comparando com a formulação de MCO livre. Entre as formulações de  $\beta$ -CD/MCO e lipossoma/MCO, a que liberou menor concentração de MCO para a solução receptora foi a formulação de lipossoma/MCO, mostrando os melhores resultados.

*Palavras-chave:* *p*-metoxicinamato de octila; lipossoma; ciclodextrina; célula de Franz; liberação *in vitro*.

## INTRODUÇÃO

Os efeitos danosos da radiação ultravioleta (UV) proveniente da luz solar, incluindo eritema, fotoenvelhecimento cutâneo, imunossupressão e câncer de pele são bem conhecidos (NIH, 1989; Urbach, 2001). As preparações anti-solares são amplamente recomendadas para evitar os perigos da exposição à luz solar (NIH, 1989; Sarveiya et al., 2004). Os filtros solares orgânicos são as principais substâncias ativas responsáveis pela absorção da luz solar nas formulações anti-solares (Jiang et al., 1996; Sarveiya et al., 2004). Além de absorver a radiação ultravioleta, uma característica essencial de um filtro solar é a fotoestabilidade durante a exposição à luz solar. Adicionalmente, os filtros solares não devem ser irritantes, sensibilizantes, fototóxicos e não devem penetrar na pele (Petrazzuolli, 2000; Nohynek & Schaefer, 2001; Kulavanijaya & Lim, 2005).

Vários filtros solares e seus metabólitos foram encontrados em camadas mais profundas da pele, urina e leite materno após uma única aplicação (Gonzalez et al., 2002; Sarveiya et al., 2004). Muito pouco se sabe sobre a toxicidade crônica dos filtros solares e a sensibilização por fotocontato é muito comum (Gonzalez et al., 2002; Kulavanijaya & Lim, 2005).

O objetivo da inclusão de filtros solares em sistemas de liberação (lipossomas, ciclodextrinas, nanopartículas, nanocápsulas, microsferas) é diminuir a absorção cutânea, aumentar o fator de proteção solar (FPS) e a fotoestabilidade. Responsáveis por aumentarem o tempo de permanência dos filtros solares no estrato córneo tornando as preparações solares mais seguras e eficazes (Perugine et al., 2002; Scalia et al., 2002; Yener et al., 2003; Jimenez et al., 2004).

A finalidade do presente estudo foi caracterizar a liberação *in vitro* de três formulações contendo o filtro anti UVB *p*-metoxicinamato de octila (MCO). A primeira com o MCO incluído em lipossomas (lipossoma/MCO), a segunda com o MCO incluído em  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ -CD/MCO), e a terceira formulação com MCO livre, isto é, não incluído em sistemas de liberação.

As formulações com  $\beta$ -CD (Coelho et al., 2008) e lipossoma (Garcia, 1998) foram desenvolvidas em outros estudos e o objetivo atual foi comparar estas duas formulações entre si e com a formulação com MCO livre.

Experimentos de difusão foram realizados em células de difusão do tipo Franz usando acetato de celulose como barreira não interferente e um fluido receptor. A concentração de MCO liberada foi determinada por CLAE.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais

O filtro anti UVB *p*-metoxicinamato de octila (MCO), grau farmacêutico foi adquirido da Spectrum, a  $\beta$ -ciclodextrina da Wacker, o colesterol da Sigma, a fosfatidilcolina (Phospholipon 90 NG<sup>®</sup>) da Phospholipid, o

\*Autor correspondente: Aline de Carvalho Varjão Mota - Departamento de Medicamentos - Faculdade de Farmácia, CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ - Av. Brigadeiro Trompovsky, Bloco K, 2º andar, Sala 50 - Ilha do Fundão - CEP: 21941-590 - Rio de Janeiro - RJ - Telefone: (21) 2562-6625 - e-mail: alinerjbr@yahoo.com.br

tris[hidroximetil]aminometano da Merk, o Carbomer 940® e o hidroxietilcelulose foram da Galena e o metanol para CLAE foi da Tedia Brazil.

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

O equipamento para CLAE consistiu de um sistema cromatográfico com bomba Waters 510 e detector UV-Visível Waters 486 conectado a uma válvula de injeção com loop de 20 µl. O detector foi ajustado para 308 nm. A aquisição e o processamento dos dados foram executados por um Integrador *Waters Data* modelo 7466, Hamilton 80665. As separações foram realizadas por uma coluna Bondapak C18 (3,9 mm x 150 mm) da *Waters Corporation*, em temperatura ambiente, com a fase móvel metanol: água (80:20 v/v) e a um fluxo de 1,3 ml/min. A identidade do filtro solar foi assegurada por uma co-cromatografia utilizando como padrão secundário o *p*-metoxicinamato de octila da Spectrum. A quantificação foi realizada através da integração das áreas dos picos utilizando o método da padronização interna (Volpato et al., 1999).

### **Estudo de liberação in vitro do filtro solar a partir das formulações – Células de difusão do tipo Franz**

As células verticais de difusão da *Hanson Research* são compostas de um compartimento receptor e um compartimento doador. O meio receptor foi agitado a 900 rpm. Uma membrana de acetato de celulose com diâmetro médio de poro de 0,2 µm foi previamente hidratada e adaptada a cada uma das seis células verticais. Um volume de 7,0 ml de fluido receptor foi adicionado ao compartimento receptor e 600 µl das formulações com MCO (dose infinita) foram aplicadas sobre a membrana (1,77 cm<sup>2</sup> de área superficial) (Freitas et al., 2003). A solução receptora foi composta de tampão fosfato (pH 7,4) a 75% e etanol a 25% (Yener et al., 2003) para garantir condições “*sink*”. Amostras de solução receptora de 0,6 ml foram coletadas com reposição a cada 30 minutos durante três horas e a quantidade de MCO liberada para a solução receptora foi determinada por CLAE. As três formulações testadas continham MCO com concentração em torno de 4% (FDA, 1997; Volpato et al., 1999).

### **Preparação da formulação contendo MCO livre (em gel de carbopol 4% m/m de MCO)**

Foi preparado um gel de carbopol a 0,8% (m/m) contendo 4% (m/m) de MCO livre com o objetivo de comparar a liberação *in vitro* do MCO com outras formulações contendo este filtro incluso em lipossoma e β-ciclodextrina.

Os componentes da formulação e suas respectivas concentrações estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Formulação em gel contendo MCO livre

Componentes	Concentração (% m/m)
carbopol 940®	0,8
ácido bórico	0,2
glicerina	2,5
etanol 96°	25
aminometilpropanol	0,5
MCO	4,0
polissorbato 80	1,17
água destilada qsp	100g

### **Preparação da formulação contendo β-CD/MCO (em gel de carbopol com 4% m/m de MCO).**

O método utilizado para incluir MCO na cavidade da β-CD foi o método “*kneading*” (Duchêne & Wouessidjewe, 1993; Marques, 1994), método utilizado quando a substância a ser incluída é insolúvel em água. Após a pesagem, o MCO e a β-CD foram misturados manualmente em gral e pistilo durante cinco minutos adicionando-se 1 ml de etanol a 70° GL. Posteriormente, a mistura foi transferida para um moinho de bolas constituído de um cilindro de porcelana (11 cm x 8 cm), carregado com 7 g de bolas de porcelana (diâmetro médio de 1,0 cm). A mistura foi mantida no moinho por uma hora (Coelho et al., 2008). O moinho foi então descarregado, o complexo formado foi purificado pela solução metanol/água 50% e então, seco em estufa a 55°C durante 30 minutos.

O complexo de inclusão β-CD/MCO foi incorporado em um gel de carbopol atingindo uma concentração final de 4% m/m de MCO. Os componentes dessa preparação estão listados na Tabela 2, juntamente com as respectivas concentrações. O complexo de inclusão foi incorporado ao gel com auxílio de gral e pistilo.

Tabela 2 - Formulação contendo β-CD/MCO

Componentes	Concentração (% m/m)
carbopol 940®	0,8
ácido bórico	0,2
glicerina	2,5
etanol 96°	25
aminometilpropanol	0,5
MCO (incluso em β-CD)	4,0
água destilada qsp	100g

### **Preparação da formulação contendo lipossoma/MCO (em gel de hidroxietilcelulose com 4% m/m de MCO)**

Os lipossomas foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico (Schieren et al., 1978; Rieger,

1981; Talsma & Crommelin, 1992). Os componentes dessa formulação e suas respectivas concentrações estão listados na Tabela 3 e dividem-se em fase oleosa e fase aquosa. A fase oleosa é composta de Phospholipon 90®, colesterol, e o filtro solar MCO. Esta fase oleosa foi dissolvida em clorofórmio em balão de fundo redondo. A mistura foi evaporada em rotaevaporador por duas horas com banho-maria a 60°C. Deixou-se a fase oleosa descansar por 24 horas sob refrigeração. Após este tempo o balão retornou ao rotaevaporador para garantir a eliminação completa de resíduos de clorofórmio da formulação. Adicionou-se a seguir o tampão TRIS (tris[hidroximetil]aminometano) sob agitação em vortex por 15 minutos até completa suspensão da camada lipídica. Após a agitação a preparação lipossomal foi filtrada em filtro Millipore com membrana de policarbonato de 0,4 µm sob pressão de N<sub>2</sub> para pressionar a passagem do material uniformizando, assim, o tamanho dos lipossomas. Após a preparação dos lipossomas estes foram incorporados em gel cujos componentes estão apresentados na Tabela 4. Esta formulação foi preparada misturando-se os componentes da fase A sob agitação e aquecimento até a formação do gel. As duas fases, foram a seguir misturadas em gral e pistilo. Adicionou-se 3,2 g de MCO livre para completar a concentração final de 4% m/m do filtro solar, pois, segundo Garcia (1998), o rendimento de inclusão do MCO no lipossoma é baixo, portanto, uma parte do MCO está inclusa no lipossoma e outra parte está livre na formulação.

Tabela 3 - Componentes do lipossoma/MCO

Componentes	Concentração (% m/m)
<b>Fase Oleosa</b>	
Phospholipon90®	16,44
colesterol	2,34
MCO	4,0
<b>Fase Aquosa</b>	
tampão TRIS	77,22 mL

Tabela 4 - Formulação contendo lipossoma/MCO

Componentes	Concentração (% m/m)
<b>Fase A</b>	
hidroxietilcelulose	1,0
metilparabeno	0,2
água destilada	20,6 mL
<b>Fase B</b>	
MCO	3,2
lipossoma/MCO	75,0g

## RESULTADOS

### Formulação com MCO livre em gel de carbopol

Os estudos de liberação *in vitro* da formulação contendo MCO livre mostraram grande variabilidade entre as seis células comparadas, como pode-se observar pelos valores obtidos de desvio padrão (Tabela 5). A difusão do MCO para a solução receptora, mostrada na Figura 1, foi irregular e não atingiu o estado estacionário durante o tempo decorrente do experimento, portanto, não foi possível calcular o fluxo de acordo com a primeira lei de Fick. Esta formulação foi a que cedeu a maior concentração de filtro solar para a solução receptora com um valor de  $2,08 \pm 0,68$  µg/cm<sup>2</sup> de MCO em 180 minutos.

Tabela 5 - Comparação entre as concentrações de MCO liberadas por unidade de área entre as três formulações testadas: MCO livre, β-CD/MCO e Lipossoma/MCO.

Tempo (min)	Concentração de MCO liberada por unidade de área (µg/cm <sup>2</sup> )		
	MCO livre	β-CD/MCO	lipossoma/MCO
30	$1,01 \pm 0,51$	$0,49 \pm 0,21$	$0,19 \pm 0,03$
60	$1,39 \pm 0,63$	$0,47 \pm 0,20$	$0,32 \pm 0,03$
90	$0,94 \pm 0,50$	$0,44 \pm 0,20$	$0,48 \pm 0,03$
120	$1,45 \pm 0,82$	$0,56 \pm 0,23$	$0,70 \pm 0,04$
150	$1,86 \pm 0,76$	$0,75 \pm 0,23$	$0,89 \pm 0,03$
180	$2,08 \pm 0,68$	$1,64 \pm 0,31$	$1,14 \pm 0,03$

### Formulação com β-CD/MCO em gel de carbopol.

A formulação contendo o complexo de inclusão β-CD/MCO também apresentou grande variabilidade entre as seis células como pode ser visto devido aos altos valores obtidos de desvio padrão (Tabela 5). Pode-se perceber que a ciclodextrina dificulta a difusão do MCO para a solução receptora quando compara-se esta formulação com aquela contendo o MCO livre, visto que nos primeiros 150 minutos percebe-se que a elevação na concentração de MCO na solução receptora é pequena. A difusão do MCO, mostrada na Figura 1, foi irregular e não atingiu o estado estacionário durante o tempo do experimento, portanto, não foi possível calcular o fluxo de acordo com a primeira lei de Fick. Após os 180 minutos, a concentração de MCO liberada da formulação β-CD/MCO foi de  $1,64 \pm 0,31$  µg/cm<sup>2</sup>, menor que a concentração cedida pela formulação contendo MCO livre.

### Formulação com lipossoma/MCO em gel de hidroxietilcelulose.

Esta formulação foi a que apresentou taxa de liberação mais regular, já que a concentração de MCO

na solução receptora é sempre crescente; além de menor variabilidade entre as células o que é observado através dos baixos valores de desvio padrão (Tabela 5). Após um pequeno “lag time” inicial, foi observado um perfil de liberação linear com o tempo permitindo o cálculo do fluxo no estado estacionário. Os fluxos foram calculados para cada célula por regressão linear a partir do tempo de 90 minutos, partindo da premissa que deste ponto em diante o equilíbrio já estaria alcançado. O valor do fluxo encontrado foi de  $0,43 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  e a quantidade de MCO liberada nos 180 minutos foi de  $1,14 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Portanto, de acordo com a Figura 1, esta formulação foi a que cedeu a menor concentração de MCO e mais lentamente durante todo o tempo do experimento.

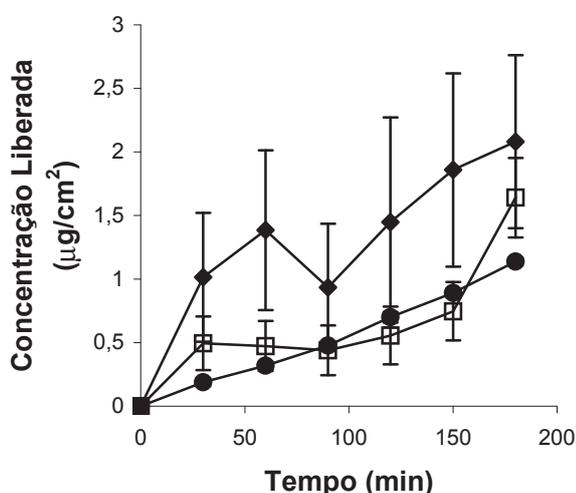


Figura 1. Perfis de liberação comparados (◆) MCO livre, (□) β-CD/MCO e (●) lipossoma/MCO

## DISCUSSÃO

De acordo com os resultados pode-se verificar que a formulação que liberou maior concentração de filtro solar MCO foi aquela com o MCO livre. A formulação com β-CD/MCO e a com lipossoma/MCO liberaram menor concentração de MCO pois este filtro estava retido dentro da β-CD e do lipossoma o que dificultou a liberação do MCO retendo-o por mais tempo na formulação.

Comparando as formulações β-CD/MCO e lipossoma/MCO, pode-se verificar que a formulação lipossoma/MCO foi a que liberou menor concentração de MCO sendo capaz de reter o filtro solar por mais tempo no interior da formulação. Isto deve-se, provavelmente, à grande afinidade entre a molécula lipofílica de MCO e os componentes oleosos do lipossoma (colesterol e fosfatidilcolina) o que não ocorre no incluso β-CD/MCO. Além disso, a formulação com β-CD/MCO contém 25% de etanol 96°GL o que pode favorecer o deslocamento do MCO da cavidade da β-CD para o seio do gel, pois o MCO é solúvel em etanol.

Também pode-se observar que a liberação do MCO nas formulações com MCO livre e com β-CD/MCO foi irregular não apresentando “lag time” impossibilitando, desta forma, o cálculo do fluxo diferentemente do que ocorre na formulação lipossoma/MCO. Este fato ocorre, possivelmente, devido às diferenças entre as bases utilizadas, já que, as formulações com MCO livre e com β-CD/MCO foram preparadas em gel de carbopol e a formulação com lipossoma/MCO foi preparada em gel de hidroxietilcelulose.

É importante ainda salientar que não se pode comparar isoladamente os dois inclusos (β-CD/MCO e lipossoma/MCO), visto que a formulação com β-CD/MCO é um gel de carbopol e a formulação com lipossoma/MCO é um gel de hidroxietilcelulose. Portanto, as formulações foram comparadas como um todo e não se comparou somente os inclusos, pois para isso, eles deveriam ser veiculados numa formulação idêntica, anulando assim, os possíveis interferentes.

Portanto, pode-se concluir que formulações contendo MCO incluso em sistemas de liberação como ciclodextrinas e lipossomas são capazes de reter o MCO, quando comparadas com formulações contendo MCO livre, liberando o filtro solar mais lentamente e em menor concentração. A formulação contendo lipossoma/MCO mostrou os melhores resultados quando comparada com as formulações contendo o filtro livre e contendo o complexo β-CD/MCO, liberando para o compartimento doador a menor concentração de MCO e apresentando o melhor perfil e liberação com boa repetibilidade e boa linearidade.

Formulações contendo filtros solares inclusos em sistemas de liberação são inovações promissoras podendo proporcionar mais segurança e eficácia às formulações anti-solares possibilitando a diminuição da absorção percutânea e maior proteção contra a radiação solar.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa concedida

## ABSTRACT

*In vitro release study of 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate included in liposome and β-cyclodextrin.*

**The aim of this study was to compare the release of the UV filter 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate (EHMC) from three gel formulations. The first contained free EHMC, the second an EHMC/β-cyclodextrin inclusion complex (β-CD/EHMC) and in the last, EHMC was included in liposomes (liposome/EHMC). The release tests were carried out in Franz type diffusion cells with an artificial membrane of cellulose acetate. The**

**concentration of released EHMC was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). Release profiles showed that the inclusion of EHMC in these delivery systems reduced the rate of EHMC release into the receptor solution, relative to the free EHMC formulation. Comparing liposome/EHMC and  $\beta$ -CD/EHMC formulations, liposome/EHMC was found to release a smaller sunscreen concentration during the test, thus providing the best result.**

**Keywords:** 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate; liposome; cyclodextrin; Franz cell; *in vitro* release.

## REFERÊNCIAS

- Coelho GLN, Dornelas CB, Soares KCS, Santos EP, Vergnanini AL, Santos TC, Rodrigues CR, Castro HC, Dias LRS, Cabral LM. Preparation and evaluation of inclusion complexes of commercial sunscreens in cyclodextrins and montmorillonites. *Drug Dev Ind Pharm* 2008; 34:536-46.
- Duchéne D, Wouessidjewe D. New possibilities for the pharmaceutical use of cyclodextrins and their derivatives. *Chim Oggi* 1993; 1:17-24.
- FDA. Food and Drug Administration. Center for drug evaluation research. Guidance for: nonsterile semisolid dosage forms, scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; *in vitro* release testing & *in vivo* bioequivalence documentation, 1997. Disponível em URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/1447fnl.pdf>. [29 set 2004].
- Freitas ZMF, Bemvindo C, Santos EP, Storpirtis S, Volpato NM. Avaliação da cedência de cetoconazol de formulações tópicas empregando células de Franz e membrana artificial. 3.ed. Rio de Janeiro: Riopharma; 2003.
- Garcia S. *Lipossomas com filtro solar*: preparação e controle de qualidade. [Tese] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; 1998
- Gonzalez HG, Farbot A, Larkö O. Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27:691-4.
- Jiang R, Hayden CG, Prankend RJ, Roberts MS, Benson HAE. High performance liquid chromatographic assay for common sunscreens agents in cosmetic products, bovine serum albumin solution and human plasma. *J Chromatogr B* 1996; 682:137-45.
- Jimenez MM, Pelletier J, Bobin MF, Martini MC. Influence of encapsulation on the *in vitro* percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *Int J Pharm* 2004; 272:45-55.
- Kulavanijaya P, Lim H. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52(6):937-58.
- Marques HMC. Preparation of complexes: evidence for complex formation. *Rev Port Farm* 1994; 44(4):157-63.
- NIH. National Institute of Health. Consensus Statement Online, Sunlight, Ultraviolet Radiation, and the skin. 1989; 7:1-29.
- Nohynek GJ, Schaefer H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regul Toxicol Pharmacol* 2001; 33:285-99.
- Perugine P, Simeoni S, Scalia S, Genta I, Modena T, Conti B, Pavanetto F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *Int J Pharm* 2002; 246:34-45.
- Petrazzuoli M. Advances in sunscreens. *Curr Prob Dermatol* 2000; 12(6):287-90.
- Rieger MM. Current aspects of cosmetics sciences III. Liposomes and their uses. *Cosmet Toiletries* 1981; 96(8):35-8.
- Sarveiya V, Risk S, Benson HAE. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to *in vivo* assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. *J Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 803(2):225-31
- Schieren H, Rudolph S, Finkelstein M, Coleman P, Weissmanni G. Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1978; 542:137-53.
- Scalia S, Casolari A, Iaconinoto A, Simeoni S. Comparative studies of the influence of cyclodextrins on the stability of the sunscreen agent 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 30(4):1181-9.
- Talsma H, Crommelin DJA. Liposomes as drug delivery systems. Part I: Preparation. *Pharm Technol Int* 1992: 24-36.
- Urbach F. The historical aspects of sunscreens. *J Photochem Photobiol B* 2001; 64:99-104.
- Volpato NM, Garcia S, Gonçalves JCO, Sales WDR, Santos EP. Evaluation of skin permeation of octyl methoxycinnamate in liposomes. *Proceedings of the IV Pharmatec: New perspectives in drug delivery systems*; 1999 Ago, Natal, Rio Grande do Norte. Brasil, pág. 67.
- Yener G, Incegül T, Yener N. Importance of using solid lipid microspheres as carriers for UV filters on the example octyl methoxycinnamate. *Int J Pharm* 2003; 258:203-7.