



Validação de metodologia analítica para a determinação de benzofenona-3 nanoencapsulada incorporada em creme gel e estudo da estabilidade físico química

Isabel Roggia^{1,*}; Daniel Ferrony¹; Marta Palma Alves¹; Luciane Varini Laporta¹; Milene Friedrich¹; Marcos Roberto dos Santos¹; Alexandre Rubim¹; Sandra Cadore Peixoto¹; Karina Paese²

¹ Laboratório de nanotecnologia, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, Brasil.

² Faculdade de Farmácia, Laboratório 405, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos validar a metodologia analítica para a quantificação de benzofenona-3 (BZ3) por espectrofotometria na região do ultravioleta, realizar estudo de estabilidade e determinar o prazo de validade deste ativo nanoencapsulado e incorporado em um creme gel. O método validado apresentou-se seletivo, linear na faixa de 2 - 20 µg/mL, com coeficiente de correlação ($R^2=0,999993$), preciso (DPR < 2,44%), exato (98,8% - 100,3%) e robusto, podendo ser utilizado na quantificação de BZ3 nanoencapsulada em creme gel. Os cremes géis, contendo BZ3 nanoencapsulada e livre não tiveram alterações significativas com relação à aparência, cor, odor, pH, viscosidade e espalhabilidade, durante 180 dias, expostos a temperatura e umidade controlada de 40 °C e 75% UR. Em ambas as formulações o teor de BZ3 diminuiu, porém, quando na forma livre, o ativo degradou mais rapidamente (30 dias) do que para a forma nanoencapsulada (150 dias), o que nos permite concluir que as nanocápsulas desempenharam um papel de proteção para o ativo. Para o creme gel contendo as nanocápsulas de BZ3 o prazo estimado de validade foi de 125 dias, e para o que continha a BZ3 livre de 69 dias.

Palavras-Chave: Benzofenona-3. Nanocápsulas. Validação.

INTRODUÇÃO

Os filtros solares são substâncias de natureza química ou física com capacidade de refletir ou absorver as radiações solares que atingem a pele, minimizando desta forma, os efeitos causados pelo sol (Salgado et al., 2004; Rai & Srinivas, 2007). Devido à sua estrutura molecular, possuem a capacidade de absorver a radiação ultravioleta em um determinado comprimento de onda, evitando assim, a penetração da radiação através da pele, e transformando-a em calor (Garcia, 2001; Rai & Srinivas, 2007).

Entre os filtros solares químicos, destaca-se a família das benzofenonas, e dentro desta, a benzofenona-3 (BZ3) (Salgado et al., 2004), ilustrada na Figura 1.

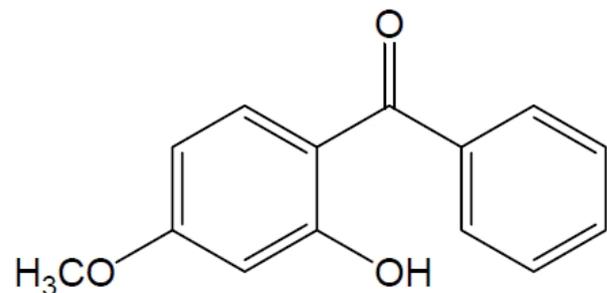


Figura 1. Estrutura química da Benzofenona-3.

A BZ3 é também conhecida como oxibenzona, Eusolex® 4360 e difenilcetona, ou ainda estruturalmente como 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona (Oliveira et al., 2004; Sanad et al., 2010). É um derivado benzofenônico utilizado em aplicações tópicas como filtro solar químico. Possui massa molar de 228,2 g mol⁻¹, ponto de fusão entre 62 e 64 °C, dose letal (DL50) >5g kg⁻¹ (oral) e absorção máxima em comprimento de onda de 288 a 325 nm. É solúvel em acetona, álcool etílico, acetato de etila, álcool isopropílico e insolúvel em água e óleo mineral (Flor et al., 2007).

Quando comparadas a outros filtros, as benzofenonas sofrem ressonância mais facilmente, requerendo menor energia quântica para a transição eletrônica (Ribeiro et al., 2004). O deslocamento por ressonância é acrescido pela presença de um grupamento doador de elétrons nas posições orto e/ou para. O grupamento carbonila participa deste

processo sendo correspondente ao elétron receptor (Shaath et al., 1997). Considerando-se que a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda, os compostos da classe das benzofenonas absorvem a energia com valores correspondentes de comprimento de onda acima de 320 nm (Skoog et al., 2002). Com isso, a BZ3 é considerada como filtro solar de amplo espectro de absorção, tendo a capacidade de absorver os raios ultravioleta A (UVA) e ultravioleta B (UVB), além de apresentar excelente estabilidade química (Oliveira et al., 2004; Sanad et al., 2010).

Vale ressaltar que alguns estudos têm demonstrado que a BZ3 pode apresentar absorção sistêmica (Yesudian & King, 2002; Gonzalez et al., 2006) e agir de forma indesejada no organismo, contribuindo na produção de hormônio sexual feminino. Esse hormônio, quando produzido, pode alterar o ciclo menstrual causando endometriose e crescimento anormal da parede uterina, e nos homens pode causar uma diminuição na quantidade de espermatozoides e atrofia dos testículos (Janjua et al., 2004) além de fotoalergias e dermatites de contato (Oliveira et al., 2004).

Em preparações cosméticas, embora seja importante que o ativo penetre além da superfície da pele, não se deseja que o mesmo seja absorvido pela circulação sistêmica. Tratando-se de um filtro solar, é necessário que a quantidade de filtro solar aplicada na pele permaneça nas camadas mais superficiais da mesma, garantindo desta forma máxima proteção e mínima permeação cutânea (Jiang et al., 1998).

Considerando a constante busca para solução aos possíveis efeitos prejudiciais provocados pelos filtros solares, a evolução da tecnologia tem permitido a produção de formulações cosméticas mais seguras e eficazes (Schaffazick et al., 2003). Um exemplo disto é o desenvolvimento da nanotecnologia, que estuda e desenvolve estruturas na escala nanométrica, diferenciando-se da forma convencional, pois engloba o ativo nestas estruturas, fazendo com que o mesmo seja liberado lentamente, apresentando desta forma maior ação e especificidade e, conseqüentemente, a diminuição dos efeitos colaterais (Mora-Huertas et al., 2010). Algumas vezes essas vantagens se devem ao fato do ativo, quando associado à nanoestrutura, apresentar efeito terapêutico em concentração menor que a usual (Contri et al., 2011).

Os sistemas nanométricos apresentam elevada área superficial, sendo considerado desta forma um bom vetor para a administração de substâncias, principalmente quando se deseja uma resposta terapêutica nos sítios de ação por um período de tempo prolongado (Guterres et al., 2007; Mora-Huertas et al., 2010).

Produtos com a finalidade de fotoproteção podem causar sérios danos à saúde do consumidor se os mesmos perderem a efetividade no decorrer do seu uso (Flor et al., 2007). Neste sentido, a validação da metodologia analítica e o estudo da estabilidade são importantes ferramentas que visam assegurar a eficácia dos cosméticos e nanocosméticos, principalmente por se tratar de sistemas novos com poucos estudos a cerca do seu prazo de validade (Alves et al., 2010).

Geralmente a quantificação do ingrediente ativo em protetores solares químicos é realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), ou da determinação por eletroquímica, ou por espectrofotometria na região do UV/VIS (Liu & Wu, 2011). Entre os

diferentes métodos descritos, a espectrofotometria na região UV do espectro eletromagnético é um dos métodos analíticos mais empregados, em função de robustez e custo relativamente baixo (Galo & Colombo, 2009; Barboza et al., 2010). No presente trabalho escolheu-se trabalhar com a espectrofotometria na região do ultravioleta, por se tratar de um método de fácil operação e apresentar resultados satisfatórios na quantificação da BZ3 em creme gel.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Matérias-primas e reagentes

Benzofenona-3 (BZ3) (Via Farma®- Brasil), poli(ϵ -caprolactona) massa molecular de 65000 (Da) (Sigma Aldrich® - USA), monoestearato de sorbitano (Sigma Aldrich®- USA), polissorbato 80 (Via Farma®- Brasil), triglicerídios do ácido cáprico e caprílico (Via Farma® - Brasil), acetona P.A. (Nuclear® - Brasil), Salcare® SC 940 (Via Farma® - Brasil), diazolinidil ureia (Sigma Aldrich® - USA), água ultrapura, acetonitrila grau CLAE (J.T.Baker® e Synth® - USA) e álcool etílico P.A. (Nuclear® - Brasil).

Métodos

Instrumentação

Utilizou-se neste estudo balança analítica (AX 200 – Shimadzu®), Câmara climatizada (TE 4001 – Tecnal®), Centrífuga (TDL80-2B – Centribio®), Espectrofotômetro UV-VIS (1650 PC – Shimadzu®), Evaporador rotatório (modelo 801 – Fisatom®), Lavadora Ultra-sônica (Unique®), Viscosímetro rotacional (RV DV-1+ Brookfield®).

Preparo das suspensões e formulações semissólidas

As nanocápsulas foram preparadas pelo método de precipitação do polímero pré-formado, descrito por Fessi e colaboradores (1989), seguindo as adaptações preconizadas por Paese (2009). A fase orgânica foi constituída de triglicerídios de ácido cáprico e caprílico (3,3 g), poli(ϵ -caprolactona) (1,0 g), monoestearato de sorbitano (0,766 g), BZ3 (0,5g) e acetona (267 mL). A mesma foi vertida, sob agitação moderada na fase aquosa, constituída de água (533 mL) e polissorbato 80 (0,766 g). A acetona e a água foram removidas até completar um volume final de 100 mL através de evaporador rotatório. A concentração de BZ3 foi de 5 mg/mL de suspensão.

Para o preparo do creme gel contendo nanocápsulas de BZ3, solubilizou-se a diazolinidil ureia (0,3 g) em água destilada (23 mL) para posterior adição na suspensão de BZ3 (75 mL). Esta mistura foi incorporada no Salcare® SC 940 (1,5 g) sobre agitação constante (em torno de 15 minutos), até total homogeneização. A concentração final de BZ3 na formulação foi de 0,375% (Paese, 2009).

Também foram preparadas em triplicatas formulações sem a incorporação de BZ3 (formulação controle) e formulações contendo BZ3 na forma livre, ou seja, sem a presença de suspensão de nanocápsulas.

Validação da metodologia analítica

A validação da metodologia analítica para a determinação do teor de BZ3 foi realizada de acordo

com a Resolução nº 899 e *International Conference on Harmonization* (Brasil, 2003; ICH, 2005). Os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados: seletividade, intervalo e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

Como amostra para o ensaio de validação, utilizou-se as formulações de creme gel contendo BZ3 na forma nanoencapsulada, recentemente preparadas, (após 1 dia de preparação) e mantidas em temperatura ambiente.

Otimização da metodologia analítica

Considerando que a BZ3 é solúvel em acetona, etanol, acetato de etila, e álcool isopropílico, avaliou-se o emprego desses solventes no método proposto, investigando-se o espectro da BZ3, na faixa de 200 nm a 400 nm, a fim de definir o melhor solvente, as bandas de absorção máxima e o comprimento de onda de trabalho.

Preparo da solução estoque de BZ3 SQR

Transferiu-se, analiticamente, 25 mg de BZ3 SQR (substância química de referência) para balão volumétrico de 250 mL, com auxílio de acetonitrila e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se solução estoque na concentração de 100 µg/mL.

Extração da BZ3 do creme gel e preparo da amostra

Pesou-se 200 mg do creme gel de BZ3, transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com acetonitrila (30 µg/mL). As amostras foram submetidas ao aparelho de ultrassom, por 5 minutos e centrifugadas pelo mesmo período de tempo a uma rotação 3500 rpm. Transferiu-se 2,5 mL do sobrenadante para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com etanol (7,5 µg/mL).

Parâmetros avaliados na validação da metodologia analítica

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se os espectros da formulação de creme gel de BZ3, na concentração de 7,5 µg/mL em etanol, com a formulação sem adição de BZ3. Traçou-se o espectro de absorção das soluções na faixa de 200 nm a 400 nm e observou-se a presença de sinais na faixa do analito.

Intervalo e linearidade

Para o estudo do intervalo foram preparadas soluções em triplicata nas concentrações de 2 a 10 µg/mL de BZ3 SQR em etanol. Mediram-se as absorvâncias das soluções em 289 nm, utilizando-se etanol para ajuste do zero. Construiu-se a curva analítica nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e avaliada por Análise de Variância (ANOVA).

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir da curva analítica e calculados pela relação: $3 \times \frac{\sigma}{S}$ e $10 \times \frac{\sigma}{S}$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e S é a inclinação da curva analítica.

Precisão

A repetitividade do método foi determinada pela análise de seis tomadas de ensaio de 200 mg, obtendo-se soluções na concentração final de 7,5 µg/mL, realizadas no mesmo dia e pelo mesmo analista.

A precisão intermediária foi obtida pela análise da amostra em três dias diferentes, por dois analistas diferentes, sendo as mesmas realizadas em triplicata, na concentração de 7,5 µg/mL. As absorvâncias das soluções foram medidas em 289 nm, utilizando-se etanol para ajuste do zero. A partir dos resultados obtidos foram calculados o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR) do ensaio.

Exatidão

A exatidão expressa, em porcentagem, foi avaliada a partir da adição e recuperação de quantidades conhecidas de BZ3 SQR, na amostra. Foram preparadas soluções nas concentrações finais de 6,0; 7,5 e 9 µg/mL. As absorvâncias das soluções foram medidas em 289 nm, utilizando-se etanol para ajuste do zero. A recuperação de 98% a 102% é recomendada para a exatidão do método. O teste foi realizado em triplicata.

Robustez

O estudo da robustez foi realizado utilizando-se como variáveis o comprimento de onda (285; 287; 291 e 293 nm), diferentes marcas dos solventes (etanol e acetonitrila), estabilidade do analito frente à luz ultravioleta (365 nm por 8 horas) e luz ambiente (exposição à luz por 8 horas). A escolha deste tempo de exposição à luz ultravioleta e luz ambiente foi determinada em função do tempo médio de ação dos filtros solares, quando aplicado na pele, que é em torno de 8 horas.

Estudo de estabilidade acelerada

O estudo de estabilidade acelerada foi conduzido segundo o Guia para a Realização de Estudo de Estabilidade (Brasil, 2005). O creme gel contendo BZ3 nanoencapsulada, BZ3 na forma livre e a formulação controle, foram expostas a temperatura de 40 ± 2°C, com umidade relativa de 75 ± 5%, e avaliadas no tempo zero, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, quanto às características físico-químicas; pH; viscosidade; espalhabilidade e teor de ativo.

Características físico-químicas

As características físico-químicas do creme gel, nas diferentes formulações (com BZ3 nanoencapsulada e BZ3 na forma livre), foram avaliadas macroscopicamente em relação a uma amostra padrão, mantida a temperatura ambiente, procurando-se observar a presença de algum sinal de instabilidade, como por exemplo, alteração da cor, odor e aparência.

Determinação de pH

As amostras foram homogeneizadas e o valor do pH foi determinado diretamente no creme gel, com auxílio de potenciômetro previamente calibrado.

Viscosidade

A viscosidade das formulações foi determinada em viscosímetro rotacional Brookfield (modelo RV DV-

1+), utilizando spindle nº 29 e velocidade de 100 rpm, respeitando o intervalo de 1 minuto para estabilizar a amostra, conforme descrito na literatura (Alves, 2006).

Espalhabilidade

A espalhabilidade foi determinada empregando-se a metodologia proposta por Münzel e colaboradores (1959) e Knorst & Borghetti (2006). Realizou-se a medida dos diâmetros abrangidos pela amostra em um sistema formado por uma placa molde circular de vidro e orifício central, sobre uma placa suporte de vidro posicionado sobre uma escala milimetrada, onde os diâmetros abrangidos pela amostra foram verificados de minuto a minuto, e os valores de espalhabilidade foram determinados utilizando a equação:

$$E_i = (d^2 \cdot \pi) / 4$$

Onde: E_i = espalhabilidade da amostra para peso i (mm^2); d = diâmetro médio (mm).

Os valores da espalhabilidade em função dos pesos adicionados foram determinados através de 3 medições, calculando-se a média entre elas.

Teor de BZ3

Para a determinação da concentração de BZ3 presente no creme gel, utilizou-se o método previamente validado. Pesou-se 200 mg do creme gel de BZ3, transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com acetonitrila, constituindo uma solução na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, para o rompimento polimérico e liberação do ativo. As amostras foram submetidas ao aparelho de ultrassom, por 5 minutos e centrifugadas pelo mesmo período de tempo a uma rotação 3500 rpm. Foram transferidos 2,5 mL do sobrenadante para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com etanol. A partir desta solução resultante, as absorbâncias foram medidas em 289 nm, utilizando-se etanol para ajuste do zero.

Estudo do prazo de validade

Os resultados referentes ao teor de BZ3 encontrados nos tempos estudados foram plotados em um gráfico de teor (%) versus tempo (dias) e os dados extrapolados, utilizando-se o limite de confiança de 95%, para assim propor o prazo de validade estimado (Grimm, 1998; Brasil, 2003). Utilizou-se o software Graphpad Prism (versão 4.00), para a confecção dos gráficos e cálculo do limite de confiança.

RESULTADOS

Otimização da metodologia analítica

Na Figura 2 estão descritos os parâmetros espectrofotométricos otimizados para a quantificação de BZ3 em creme gel.

Parâmetros avaliados na validação da metodologia analítica

Seletividade

Na Figura 3 estão apresentados os espectros sobrepostos do creme gel contendo nanocápsulas de BZ3 e da formulação controle (sem BZ3), obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta.

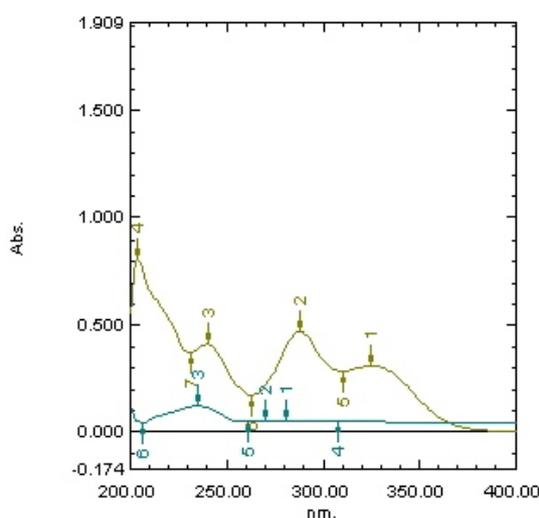


Figura 3. Espectro de varredura da amostra de creme gel contendo nanocápsulas com BZ3(A) e sem BZ3(B) obtido por espectrofotometria UV/VIS.

Intervalo e linearidade

A linearidade do método foi obtida através da curva analítica, através da preparação em triplicata de uma solução de creme gel nas concentrações de 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$, a partir destas leituras, calculou-se a média e o desvio padrão e determinou-se uma curva analítica média, pela qual a equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação, $y = 0,063400x + 0,008133$ e $r^2 = 0,999993$, na faixa de trabalho de 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

Solvente inicial para promover o rompimento das nanocápsulas	acetonitrila
Tempo de centrifugação	5 minutos
Tempo de ultrassom	5 minutos
Solvente final	etanol
Concentração de trabalho	7,5 $\mu\text{g/mL}$
Comprimento de onda	289 nm

Figura 2. Resumo das condições espectrofotométricas escolhidas.

Limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) sendo os valores encontrados 0,47 µg/mL e 1,57 µg/mL, respectivamente.

Precisão

O valor médio encontrado para a repetibilidade foi de 103,46% ± 1,53 %. Os valores experimentais obtidos para as determinações da precisão intermediária da BZ3 encontram-se descritos na Tabela 1.

Exatidão

Os resultados experimentais médios obtidos, para exatidão foram 100%, 101,14% e 100,71% para as concentrações de 6,0; 7,5 e 9,0 µg/mL, respectivamente.

Robustez

Os resultados para o teste de robustez estão descritos na Figura 4.

Tabela 1. Valores experimentais para o ensaio de precisão intermediária da BZ3 incorporada em preparações de creme gel (n=3).

Dia	N	Analista 1 Teor (%)	Analista 2 Teor (%)	Média (%) + desvio padrão (%)	DPR (%)
	1	103,4	108,7		
1	2	103,6	107,2	105,7 ± 2,58	2,44
	3	103,2	108,3		
	1	106,4	108,3		
2	2	105,1	108,7	107,2 ± 1,56	1,45
	3	106,0	108,7		
	1	105,3	108,9		
3	2	102,8	106,8	106,0 ± 2,19	2,07
	3	104,7	107,6		

Estudo de estabilidade acelerada**Características físico-químicas**

Os cremes géis contendo BZ3 nanoencapsulada e BZ3 na forma livre não sofreram alterações em relação à aparência, cor e odor, para as amostras expostas à temperatura de 40 + 2°C com umidade relativa de 75 + 5%, no decorrer de todo o experimento, apresentando condições satisfatórias para todas as amostras.

Determinação de pH

Os valores de pH mantiveram-se entre 6,8 a 7,1, durante os 180 dias de análises, para ambas as formulações.

Determinação da viscosidade

Para a amostra de creme gel contendo nanocápsulas de BZ3, os valores de viscosidade foram respectivamente de 2310,0 (±1027,8) mPa.s e de 2323,3 (±1075,9) mPa.s para avaliação inicial e para a final (após os 180 dias de experimento). O creme gel contendo BZ3 na forma livre apresentou viscosidade inicial e final de 1520,0 (±138,9) mPa.s de 3670,0 (±855,1) mPa.s, respectivamente.

Espalhabilidade

Os valores obtidos no estudo da estabilidade da BZ3, incorporada no creme gel, tanto para a forma nanoencapsulada, como para a forma livre, encontram-se descritos na Tabela 2 e representados graficamente na Figura 5.

Teor de BZ3

Na Tabela 3, estão descritos os valores obtidos no estudo da estabilidade da BZ3, incorporada no creme gel, tanto para a forma nanoencapsulada, como para a forma livre.

Estudo do prazo de validade

As Figuras 6A e 6B, apresentam os gráficos obtidos no estudo do prazo de validade dos cremes géis contendo BZ3 nanoencapsulada e BZ3 na forma livre, respectivamente.

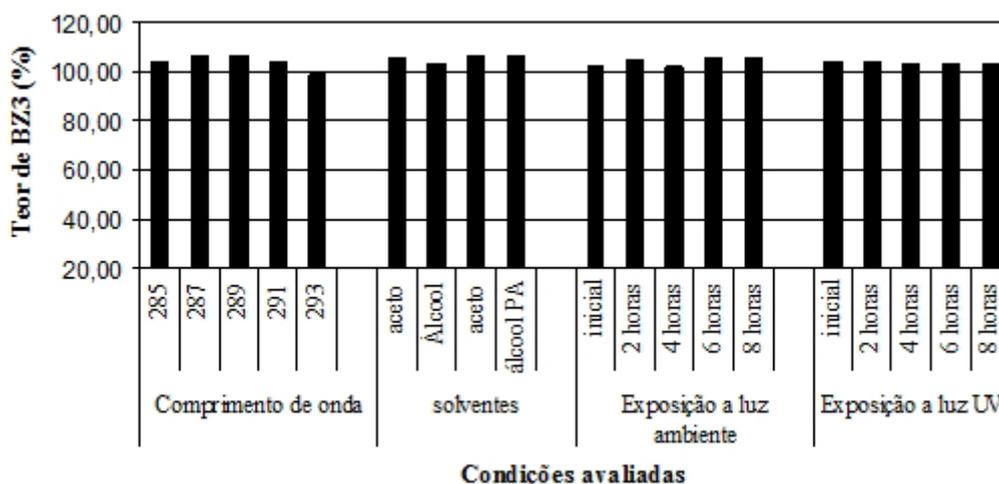


Figura 4. Representação da robustez do método, conforme os parâmetros analisados.

Tabela 2. Valores de espalhabilidade para as amostras de creme gel contendo BZ3 na forma nanoencapsulada e na forma livre (n=3).

Tempo (dias)	Creme gel contendo nanocápsulas de BZ3	Creme gel com a BZ3 na forma livre
	Espalhabilidade mm2 ± DP	Espalhabilidade mm2 ± DP
2	3384,7 ± 597,5	2448,2 ± 127,5
30	3789,5 ± 1581,3	2389,6 ± 89,8
60	3209,4 ± 950,2	2219,8 ± 105,3
90	3720,2 ± 1473,8	2141,5 ± 490,1
120	3951,0 ± 2152,3	2193,5 ± 171,2
150	5376,2 ± 2414,6	2658,1 ± 183,8
180	4242,9 ± 1471,3	2363,6 ± 217,6

Tabela 3. Teor de BZ3 presente no creme gel para a forma nanoencapsulada e para a forma livre, durante os 180 dias de armazenagem em temperatura de 40 ± 2 °C e umidade relativa (UR) de 75 ± 5%.

Tempo	Creme gel contendo BZ3 nanoencapsulada	Creme gel com a BZ3 na forma livre
	Teor (%) DP	Teor (%) DP
48 horas	104,1 ± 1,5	103,9 ± 1,8
30 dias	103,7 ± 1,7	93,6 ± 1,2
60 dias	101,8 ± 1,7	92,0 ± 1,4
90 dias	96,0 ± 1,9	91,2 ± 1,0
120 dias	92,5 ± 1,0	87,5 ± 1,9
150 dias	88,2 ± 0,8	87,5 ± 1,0
180 dias	88,2 ± 0,8	88,1 ± 0,8

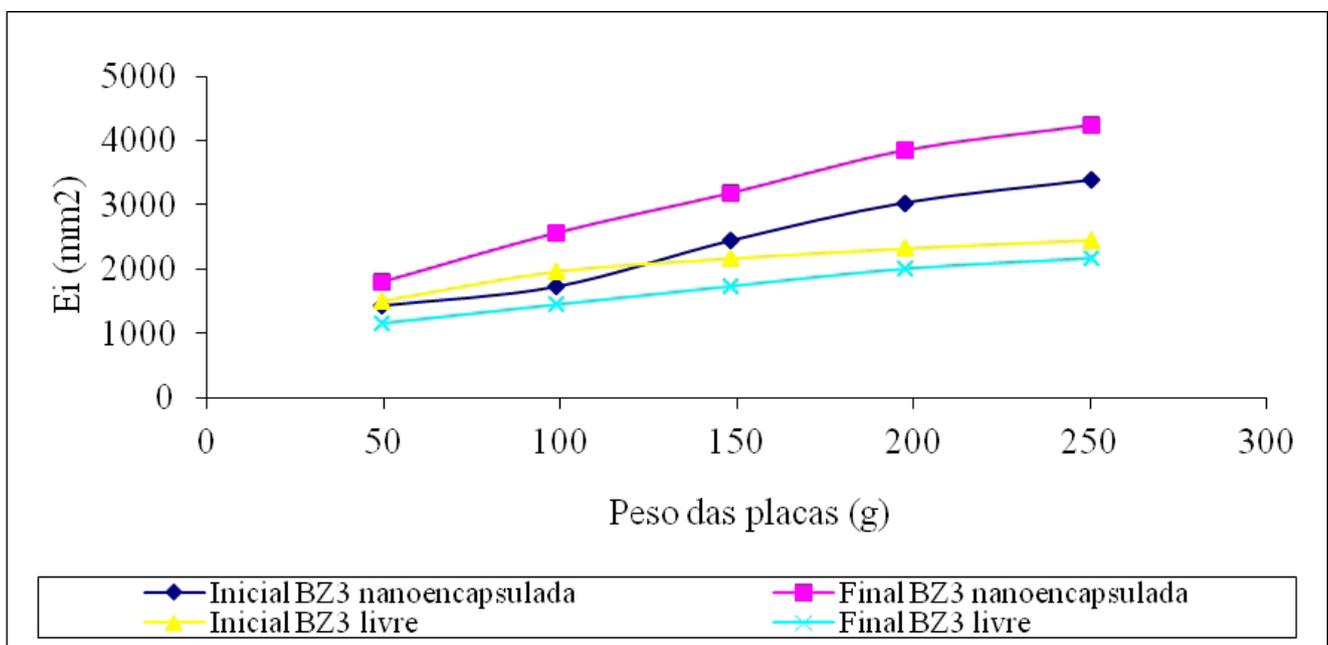
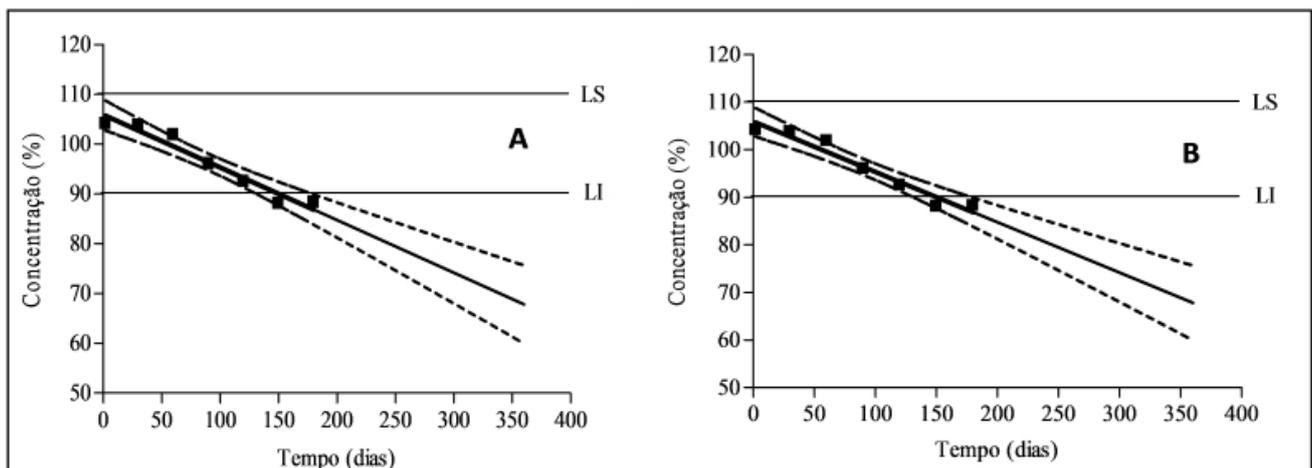


Figura 5. Espalhabilidade do creme gel contendo BZ3 na forma livre e na forma nanoencapsulada, após 6 meses, em função do peso.



Figuras 6 (A e B). Extrapolação da concentração de BZ3 presente no creme gel na forma nanoencapsulada (A) e na forma livre (B).

DISCUSSÃO

As condições espectrofotométricas escolhidas para o desenvolvimento do método analítico estão descritas na Figura 2. Os solventes que apresentaram melhores resultados, em relação à extração do ativo e interferência mínima dos excipientes, foram acetonitrila e etanol.

A seletividade do método foi avaliada através da pesquisa de possíveis interferentes dos excipientes na determinação quantitativa da BZ3. De acordo com os espectros obtidos da amostra de creme gel contendo nanocápsulas de BZ3 e sem BZ3 (formulação controle) (Figura 3), constatou-se que o método foi seletivo, demonstrando não haver interferência significativa dos excipientes no comprimento de onda de máxima absorção que foi de 289 nm.

O intervalo e a linearidade foram obtidos através da elaboração da curva analítica. Segundo a RE 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação é de 0,99, sendo obtido um valor de 0,9997 para o intervalo e de 0,999993 para a curva analítica (Brasil, 2003). A curva obtida, utilizando-se as concentrações de 2 a 10 µg/mL, demonstrou que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito, podendo ser utilizada para a interpolação dos valores obtidos com a solução amostra. O estudo da análise de variância (ANOVA) demonstrou que a mesma apresenta regressão linear significativa, não havendo desvio de linearidade significativo ($p=0,05$), garantindo-se assim a linearidade do método.

A boa sensibilidade do método espectrofotométrico foi confirmada através da determinação dos limites de detecção (LD) (0,47 µg/mL) e limite de quantificação (LQ) (1,57 µg/mL) da BZ3.

A precisão do método analítico determina o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuada várias vezes em uma amostra homogênea. O valor de DPR (%), preconizado para este estudo é de 2%, segundo a *The United States Pharmacopeia* (2012), e de 5%, segundo a resolução RE nº 899/2003 (Brasil, 2003; *The United States Pharmacopeia*, 2012). A repetibilidade foi avaliada em um único dia e pelo mesmo analista, sendo que o valor médio encontrado para esse ensaio foi de 103,46% e desvio padrão relativo de 1,53%. A precisão intermediária foi determinada em três dias diferentes por dois analistas. Os valores experimentais obtidos para a determinação da precisão intermediária da BZ3 encontram-se descritos na Tabela 1. O desvio padrão relativo médio para este ensaio foi de 0,57%.

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre o valor médio obtido em uma série de resultados e o valor aceito como referência, sendo preconizado para este teste, que os valores recuperados estejam dentro dos limites de 98% a 102% (ICH, 2005; *The United States Pharmacopeia*, 2012). Os resultados experimentais obtidos para a exatidão do método foram de 100%, 101,14% e 100,71% de recuperação, o que permite concluir a adequada exatidão do método.

A robustez do método indica sua capacidade em fornecer resultados inalterados quando sujeito a pequenas e deliberadas alterações no método analítico. Os parâmetros analíticos modificados não apresentaram mudanças significativas na quantificação da amostra, sendo que as

variações foram inferiores a 1% do valor médio obtido no estudo de repetitividade (Figura 3), confirmando-se assim a robustez do método analítico, ou seja, o método mostrou-se robusto para a quantificação da BZ3 quando diferentes marcas de solventes foram utilizadas, quando pequenas variações foram efetuadas no comprimento de onda, quando as amostras foram expostas a luz ambiente e a luz ultravioleta, indicando desta forma, que tanto o método de quantificação como amostra mostraram-se estáveis durante todo o processo de experimento.

Sendo assim, o método desenvolvido e validado para quantificação da BZ3 nanoencapsulada e incorporada em um creme gel, através da espectrofotometria na região do ultravioleta mostrou-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto.

As formulações mantiveram-se praticamente sem alterações em relação à aparência, cor e odor durante os 180 dias de análise, tanto para a BZ3 na forma nanoencapsulada como para BZ3 na forma livre, sendo um bom indicativo de estabilidade física. Também observamos que os valores de pH, para as duas formulações, mantiveram-se estáveis e dentro de uma faixa de pH compatível com a pele humana (Rodrigues, 1996; Sznitowska et al., 2001).

A viscosidade é a medida de resistência do sistema em fluir quando submetida a uma força. Desta forma, quanto maior a viscosidade de um produto, maior será essa resistência, influenciando ainda na capacidade do produto em espalhar-se sobre uma superfície (Lahoud & Campos, 2010). Para o creme gel contendo nanocápsulas de BZ3, a viscosidade manteve-se estável ao longo do período (inicial = 2310,0 mPa.s e final = 2323,3 mPa.s), não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p=0,05$). O creme gel contendo BZ3 forma livre apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) da viscosidade no decorrer do estudo (inicial = 1520,0 mPa.s e final = 3670,0 mPa.s). Fato esse que pode estar relacionado à perda de água da formulação, o qual foi observado somente na formulação contendo a BZ3 na forma livre. Provavelmente, na forma nanoencapsulada, esta estabilidade manteve-se devido à interação da rede polimérica do gel com o sistema nanoparticulado, propiciando uma maior retenção de água.

De forma geral, quanto maior a viscosidade de um sistema, menor será a sua espalhabilidade, este conceito normalmente pode ser aplicado para sistemas convencionais (Briceño 2000). No caso de sistemas nanoestruturados deve-se levar em consideração a complexidade destas estruturas em função da área superficial, do potencial de carga da superfície e das interações físico-químicas entre solventes, polímeros e tensoativos.

As características reológicas são importantes para as formulações fotoprotetoras, tanto do ponto de vista sensorial como de eficácia, visto que estão relacionadas com a liberação do ativo do veículo e sua posterior biodisponibilidade na pele. Quando se planeja desenvolver filtros solares, procura-se que o mesmo tenha uma boa espalhabilidade e consequentemente, uma boa aderência na pele para protegê-la por mais tempo e não ser facilmente retirado quando em contato com a água (Gaspar & Maia Campos, 2006).

Na Tabela 2 estão descritos os valores encontrados no teste de espalhabilidade, onde podemos observar que, para ambas as formulações, os resultados permaneceram estáveis durante todo o experimento, não apresentando

diferença significativa ($p > 0,05$). Este comportamento indica que a espalhabilidade do creme gel não foi modificada quando as nanocápsulas foram incorporadas na formulação. Quando relacionamos viscosidade com espalhabilidade podemos observar que o creme gel com BZ3 apresentou menor viscosidade e maior espalhabilidade que o creme gel que continha BZ3 na forma livre, sendo uma característica desejável quando se trata de uma formulação contendo protetor solar.

Em formulações farmacêuticas, o princípio ativo, pode interagir com os excipientes de forma a apresentar mudanças que necessitem de controle. Qualquer ingrediente, seja terapeuticamente ativo ou não, pode afetar a estabilidade de uma formulação (Gil, 2007).

Conforme a Tabela 3 pode-se verificar que para ambas as formulações o teor de BZ3 diminuiu, porém quando a BZ3 está na forma livre, a degradação do ativo é claramente mais rápida (30 dias) do que para a forma nanoencapsulada (150 dias), o que nos permite concluir que as nanocápsulas desempenharam um papel de proteção para o ativo.

A determinação do prazo de validade tornou-se uma preocupação fundamental da tecnologia farmacêutica, tanto pela necessidade de se conhecer o tempo útil para comercialização dos produtos, quanto por questões legais (Gil, 2007). Esse prazo pode ser estimado plotando-se em um gráfico, tempo (no eixo x) versus teor (no eixo y) e, calculando-se o limite de confiança de 95% (Grimm, 1998). Quando a linha referente ao limite de confiança atinge o limite mínimo de ativo permitido na formulação, extrapola-se para o eixo x, determinando-se assim o tempo de estabilidade do produto, ou seja, seu prazo de validade. Para a realização dos cálculos, estimou-se, arbitrariamente, o limite mínimo de, 90% e, o limite máximo de 110% de teor de BZ3.

A Figura 5A, apresenta o gráfico obtido para o creme gel contendo BZ3 nanoencapsulada, e a Figura 5B para o creme gel contendo BZ3 na forma livre, que estimam 125 e 69 dias, respectivamente, de prazo de validade para as referidas formulações. Observa-se através destes dados que a formulação contendo nanocápsulas apresentou um prazo de validade maior em relação à formulação contendo o fármaco na forma livre, indicando desta forma, que as nanocápsulas podem estar exercendo um papel de proteção do ativo por um período mais prolongado.

Através dos dados apresentados neste estudo, podemos concluir que o método foi validado em todos os parâmetros, atendendo as especificações de linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez, indicando confiabilidade dos resultados obtidos para a quantificação do ativo na forma nanoencapsulada, sendo de fundamental importância, uma vez que estes sistemas são inovadores. A partir da quantificação deste ativo, observou-se que quando a BZ3 estava na forma nanoencapsulada na formulação, o ativo demorou mais tempo para degradar-se, e, conseqüentemente, apresenta uma ação por um período de tempo mais prolongado, fato este comprovado pela determinação do prazo de validade estipulado e pelo estudo de estabilidade físico-química das formulações.

Desta forma, nota-se a importância de estudos neste sentido, uma vez que, estes sistemas nanoestruturados são considerados alternativas para carrear ativos que apresentam

efeitos adversos, pois devido as suas características, aumentam a especificidade dos mesmos. No caso dos filtros solares, teoricamente, os sistemas nanoestruturados podem proporcionar uma menor permeação do ativo na pele e um aumento da retenção do mesmo sobre a camada córnea, e, conseqüentemente, um aumento na sua eficácia.

ABSTRACT

Validation of a method to determine content of nanoencapsulated benzophenone-3 incorporated in a gel cream and study of its physical and chemical stability

The aim of this research was to develop and validate an ultraviolet spectrophotometric method for the quantitative analysis of the content of benzophenone-3 (BZ3) nanoencapsulated and incorporated in gel cream and to carry out a study of its stability and determine its shelf life. The validated method was selective and linear in the range 2–20 µg/mL, with a correlation coefficient of (r) of 0.999996, precise (relative SD < 2.44%), exact (98.8% - 100.3%) and robust. It can, therefore be used in the analysis of nanoencapsulated BZ3 gel cream. Gel creams containing nanoencapsulated and free BZ3 showed no significant alterations in appearance, colour, smell, pH, viscosity or spreadability, within the 180 day period during which they were exposed to a controlled temperature of 40 °C and relative humidity of 75%. In both formulations, the BZ3 content fell, but in the free form it was degraded more quickly (30 days) than in the nanoencapsulated form (150 days). This indicates that the nanocapsules protected the active ingredient. For the gel cream containing the BZ3 nanocapsules, the estimated shelf life was 125 days, and for the free BZ3, 69 days.

Keywords: Benzophenone-3. Nanocapsules. Validation.

REFERÊNCIAS

Alves LDS, Rolim LA, Fontes DAF, Rolim-Neto P, Soares MF de La R, Sobrinho JLS. Desenvolvimento de método analítico para quantificação de efavirenz por espectrofotometria no UV-VIS. Quim Nova. 2010;33(9):1967-72.

Alves MP. Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro. [Tese] Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

Barboza FM, Vecchia DD, Pereira AV, Stulzer HK. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. Quím Nova 2010; 33(3):747-9.

Brasil. Resolução nº1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudo de estabilidade. [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf.

- Brasil. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. Poder executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 02 jun 2003. Disponível em: https://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.
- Briceño M.I. Rheology of suspensions and emulsions In: Nielloud F, Marti-Mestres G. (Ed.) Pharmaceutical emulsion and suspensions. 2nd. ed. New York: CRC Press; 2000. p. 557-608.
- Contri RV, Kaiser M, Poletto FS, Pohlmann AR, Guterres SS. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011; 11:2398-2406.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*. 1989;55: R1-R4.
- Flor J, Davolos MR, Correa MA. Protetor Solar. *Quím Nova*. 2007;30(1):153-8.
- Galo AL, Colombo MF. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. *Quím Nova*. 2009;32(2): 488-92.
- Garcia CR. O Farmacêutico e a Proteção solar. *Pharm Bras*. 2001;13(11/12):81-6.
- Gaspar LR, Maia Campos DMBG. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. *Int J Pharm*. 2006;307:123-8.
- Gil ES. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks; 2007:381-402.
- Gonzalez H, Farbroth A, Larko O, Wennerg AM. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. *Photobiology* 2006;154:337-40.
- Grimm W. Extension of the *International Conference on Harmonization* Tripartite Guideline for Stability Testing of New Drug Substances and Products to Countries of Climatic Zones III and IV. *Drug Develop Ind Pharm*. 1998;24:313-25.
- Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *J Drug Target Insights* 2007; 2:147-57.
- International Conference on Harmonization* (ICH). Validation of Analytical procedure: Text and Methodology Q2 (R1), 2005.
- Janjua NR, Mogensen B, Anderson AM, Petersen JH, Henriksen M, Skakkebaek NE, Wulf HC. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *J Invest Dermatol*. 2004;123: 57-61.
- Jiang R, Benzon HAE, Cross SE, Roberts MS. In vitro human epidermal and polyethylene membrane penetration and retention of the sunscreen benzophenone-3 from a range of solvents. *Pharm Res*. 1998;15:1863-8.
- Knorst MT, Borghetti GS. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2006;42(4):531-7.
- Lahoud MH, Campos R. Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. *Visão Acad*. 2010;11(1):65-73.
- Liu T, Wu D. Simultaneous determination of some ultraviolet-absorbing chemicals in sunscreen cosmetics using a high-performance liquid chromatography method. *Int J Cosmet Sci*. 2011;33:408-15.
- Mora-Huertas CEH, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010;385:113-42.
- Münzel K, Buechi J, Schultz OE (Hrsg.). *Galenisches Praktikum*. Stuttgart: Wissenschaftliche; 1959.
- Oliveira DAGC, Dutra EA, Santoro MIRM, Hackmann ERMK. Protetores Solares, Radiações e Pele. *Cosmetics & Toiletries* (Ed. Port.) 2004;16:68-72.
- Paese K, Jaeger A, Poletto FS, Pinto EF Rossi-Bergmann B, Pohlmann AR, Guterres SS. Semisolid Formulation Containing a Nanoencapsulated Sunscreen: Effectiveness, In Vitro Photostability and Immune Response. *J Biomed Nanotechnol*. 2009;5(3):240-6.
- Rai R, Srinivas CR. Photoprotection. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2007; 73(2):73-9.
- Ribeiro RP, Santos VM, Medeiros EC. Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) in vitro de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. *Pharm Bras*. 2004;16(7-8):83-6.
- Rodrigues L. Bioengenharia cutânea: novas perspectivas sobre a fisiologia da pele. *Cosmetics & Toiletries* (Ed. Port.) 1996;8(4):51-5.
- Salgado C, Galante MC, Leonardi GR. Filtros Solares: Mecanismo de ação e metodologias em preparações magistrais. *International Journal of Pharmaceutical Compounding* (Ed. Port.) 2004;6(4):224-36.
- Sanad RA, AbdelMalak NS, elBayoomy TS, Badawi AA. Formulation of a Novel oxybenzone-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs). *Am Assoc Pharma Scient*. 2010;11(4):1684-94.
- Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova*. 2003;26:726-37.
- Shaath NA. Evolution of modern sunscreens. In: Lowe NJ, Shaath MA, Pathak MA. *Sunscreens*

Development, Evaluation, and Regulatory Aspects. New York: Marcel Dekker; 1997:589-600.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Princípios de análise instrumental. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman; 2002.

Sznitowska M, Janicki S, Baczek A. Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. *J Control Release*. 2001;76(3):327-335.

The United States Pharmacopeia. 35th ed., Rockville: United States Pharmacopoeial Convention; 2012.

Yesudian PD, King CM. Severe contact urticaria and anaphylaxis from benzophenone-3 (2-hydroxy 4-methoxy benzophenone). *Contact Dermatitis* 2002;46(1):55-6.

Recebido em 27 de março de 2013.

Aceito em 02 de julho de 2013.