



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LORENA MAIONE SILVA

**ENCAPSULAÇÃO DA VITAMINA C EM LIPOSSOMAS PARA O
TRATAMENTO DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO:
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, ANALÍTICO E
AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE BIOLÓGICA *IN VITRO* EM
MODELOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA E EM LINHAGENS
CELULARES DE QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS**

Goiânia
2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Lorena Maione Silva

Título do trabalho: Encapsulação da vitamina C em lipossomas para o tratamento do envelhecimento cutâneo: desenvolvimento tecnológico, analítico e avaliação da performance biológica *in vitro* em modelos de permeação cutânea e em linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Lorena Maione Silva

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 06 / 09 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

LORENA MAIONE SILVA

**ENCAPSULAÇÃO DA VITAMINA C EM LIPOSSOMAS PARA O
TRATAMENTO DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO:
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, ANALÍTICO E
AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE BIOLÓGICA *IN VITRO* EM
MODELOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA E EM LINHAGENS
CELULARES DE QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima

**Goiânia
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Maione Silva, Lorena

Encapsulação da vitamina C em lipossomas para o tratamento do envelhecimento cutâneo: desenvolvimento tecnológico, analítico e avaliação da performance biológica in vitro em modelos de permeação cutânea e em linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos [manuscrito] / Lorena Maione Silva. - 2016.

CII, 102 f.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Martins Lima.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. ácido ascórbico. 2. promotores de permeação. 3. penetração cutânea. 4. biossíntese de colágeno. 5. 1,2-distearoil-sn-glicero-3 fosfoglicerol. I. Martins Lima, Eliana, orient. II. Título.

CDU 615.1

Ata de Defesa de Tese de Doutorado realizada por **Lorena Maione Silva**. Aos vinte e nove dias do mês de Fevereiro do ano de 2016 às 08:30 hs, reuniu-se na Sala de Pós-Graduação – Faculdade de Farmácia/UFG a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da defesa de Tese intitulada: “**Encapsulação da vitamina C em lipossomas para o tratamento do envelhecimento cutâneo: desenvolvimento tecnológico, analítico e avaliação da performance biológica in vitro em modelos de permeação cutânea e em linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos**”, como parte de requisitos necessários à obtenção do título de Doutor, área de concentração **Patologia, Clínica e Tratamento das Doenças Humanas**. A Presidente da Comissão julgadora, **Profa. Dra. Eliana Martins Lima**, iniciando os trabalhos concedeu a palavra a candidata, para exposição em até **50** minutos do seu trabalho. A seguir, a Senhora Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente aos Examinadores, os quais passaram a arguir a candidata durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata aprovada(o) ou reprovada(o).

Banca Examinadora

Profa. Dra. Eliana Martins Lima - Presidente
Profa. Dra. Lidia Andreu Guillo - Membro
Profa. Dra. Ieda Maria Sapateiro Torres - Membro
Prof. Dr. Jorge Luiz Vieira - Membro
Profa. Dra. Danielle Guimarães Almeida Diniz - Membro
Profa. Dra. Thaís Leite Nascimento - Suplente
Profa. Dra. Elisandra Gava de Castro – Suplente

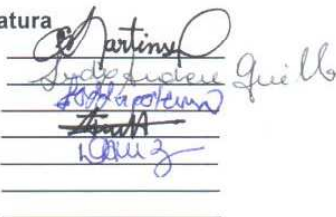
Aprovado(a)/Reprovado(a)

~~APROVADA~~
APROVADA
APROVADA
Aprovada
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou a candidata **Lorena Maione Silva** Habilitada(o) (✗) Não habilitada(o) (). Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Eliana Martins Lima**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada

Profa. Dra. Eliana Martins Lima - Presidente
Profa. Dra. Lidia Andreu Guillo - Membro
Profa. Dra. Ieda Maria Sapateiro Torres - Membro
Prof. Dr. Jorge Luiz Vieira - Membro
Profa. Dra. Danielle Guimarães Almeida Diniz - Membro
Profa. Dra. Thaís Leite Nascimento - Suplente
Profa. Dra. Elisandra Gava de Castro – Suplente

Assinatura



A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:


Discente: Lorena Maione Silva

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: Lorena Maione Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima

2. Prof^a. Dr^a. Lidia Andreu Guillo

3. Prof^a. Dr^a. Ieda Maria Sapateiro Torres

4. Prof. Dr. Jorge Luiz Vieira dos Anjos

5. Prof^a. Dr^a. Danielle Guimarães Almeida Diniz

Data: 29/02/2016

A Deus, meus pais, irmão, avós e Renato, por fazerem os dias mais ensolarados.

SUMÁRIO

FIGURAS.....	viii
TABELAS.....	x
SIGLAS E ABREVIações.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 PELE: ANATOMIA E FUNÇÕES	18
1.2 APLICAÇÃO CUTÂNEA E A ENTRADA DE MOLÉCULAS NA PELE	20
1.3 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	23
1.4 LIPOSSOMAS	24
1.4.1 Lipossomas e promoção de permeação cutânea	26
1.5 VITAMINA C.....	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3 PUBLICAÇÕES	32
3.1 ARTIGO 1	33
3.2 ARTIGO 2	52
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
REFERÊNCIAS.....	92

FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático demonstrando as camadas da pele e seus principais componentes.....	18
Figura 2	Esquema contendo corte histológico da pele demonstrando as camadas da epiderme e a derme, além da organização e composição principal do estrato córneo.....	19
Figura 3	Vias de transporte do fármaco através da pele: via transcelular (a), via intercelular (b) e via apêndices (c).....	21
Figura 4	Célula de fluxo estático tipo Franz utilizadas para estudos de permeação cutânea e liberação.....	23
Figura 5	Estrutura, classificação dos lipossomas e representação das possíveis formas de organização de substâncias encapsuladas com base em sua polaridade.....	25
Figura 6	Esquema representativo da obtenção de lipossomas pela técnica de <i>dehydration-rehydration vesicles</i> (DRV).....	26
Figura 7	Esquema representativo da oxidação da vitamina C (a) em ácido dehidroascórbico (b) e ácido dicetogulônico (c).....	28
 Artigo 1		
Figura 1	Estabilidade da VC em diferentes condições com avaliação do ajuste de pH, adição de metanol e utilização de antioxidantes.....	42
Figura 2	Cromatogramas obtidos a partir da análise de soluções do diluente (a), padrão de VC (b), comprimido de liberação retardada (c), comprimido efervescente (d), solução oral (e) e creme (f)	47
 Artigo 2		
Figura 1	Cromatogramas obtidos a partir da análise da VC (10 µg/mL), diluente e epiderme e derme de pele de orelha de porco.	66
Figura 2	Retenção da VC na epiderme e derme resultante da aplicação de lipossomas e em sua forma livre (FL) após 6 (a) e 24 horas (b). Quantidade acumulada de VC permeada através da pele por cm ² durante 24 horas (c). Cálculo do fluxo de permeação da VC (d).....	67
Figura 3	Internalização celular dos lipossomas marcados com cumarina pelos queratinócitos (I) e fibroblastos (II).	72

Figura 4	Internalização celular dos lipossomas marcados com rodamina pelos queratinócitos (III) e fibroblastos (IV).....	73
Figura 5	Análise morfológica obtida por MET da dispersão lipossomal do DRV5 após reidratação controlada.....	76
Figura 6	Viabilidade celular de queratinócitos tratados com VC em três concentrações diferentes (62,5, 125 e 250 μ M) na forma livre (FL) ou em lipossomas (DRV5) e sem tratamento (CNT), após exposição à radiação UVA (UV+) e sem exposição à radiação UVA (UV-).....	77
Figura 7	Imunolocalização de colágeno tipo I em fibroblastos.....	79
Figura 8	Imunolocalização de colágeno tipo I em fibroblastos tratados com DRV5.....	81

TABELAS

Artigo 1

Tabela 1	Estabilidade da VC armazenada a 4°C, 25°C e 40°C no diluente com e sem a adição de EDTA e tiosulfato de sódio.....	44
Tabela 2	Precisão intracorrída e interdia do método analítico para quantificação da VC.....	45
Tabela 3	Exatidão/recuperação da VC de formulações farmacêuticas e cosmética comerciais.....	46
Tabela 4	Teor de VC nas formulações farmacêuticas e cosmética comerciais.	48

Artigo 2

Tabela 1	Composição, tamanho médio, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE) e número de partículas dos lipossomas desenvolvidos.....	62
Tabela 2	Coeficientes de correlação linear obtidos nos três modelos cinéticos (Primeira ordem, Higuchi e Ordem zero) para os perfis de permeação da VC em 24 h.....	70
Tabela 3	Estabilidade dos lipossomas contendo VC durante estudo de estabilidade de 30 dias a 4°C e 25°C.....	75

SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ADH	Ácido Dehidroascórbico
As	Assimetria
Col	Colesterol
D	Derme
DAPI	4,6-Diamidino-2-fenilindol
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOTAP	1,2-Dioleoil-3-trimetilamônio-propano
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRV	<i>Dehydration-Rehydration Vesicles</i>
DSPG	1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EE	Eficiência de Encapsulação
EP	Ediperme
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FL	Fármaco livre
FT	Fármaco Total
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detector de Arranjo de Diodos
HPPC	Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
HSTBA	Hidrogenossulfato de Tetrabutylamônio
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
k'	Fator de Capacidade

LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LUV	Vesículas Lipídicas Unilamelares Grandes
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
MLV	Vesículas Lipídicas Multilamelares
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio
NPT	Número de Pratos Teóricos
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
PC	Fosfatidilcolina
PdI	Índice de Polidispersão
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
SUV	Vesículas Lipídicas Unilamelares Pequenas
TS	Tiosulfato de sódio
ULV	Vesículas Lipídicas Unilamelares
UV	Ultravioleta
VC	Vitamina C

RESUMO

O envelhecimento da pele envolve eventos que levam à redução da integridade estrutural e perda das suas funções biológicas. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são potencialmente capazes de gerar danos teciduais e estão relacionadas com o fotoenvelhecimento cutâneo. Moléculas antioxidantes como a vitamina C (VC) são capazes de combater estes compostos. Além disso, a VC atua na síntese de colágeno na pele, proteína fundamental à sua sustentação. No entanto, efeitos benéficos cutâneos só são obtidos quando a VC é aplicada topicamente. Neste trabalho, foram desenvolvidos e caracterizados lipossomas contendo VC para a aplicação tópica. Para a quantificação da VC em diferentes matrizes, incluindo produtos farmacêuticos, cosméticos e pele de orelha de porco, foi desenvolvido e validado um método quantitativo por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) por pareamento iônico em fase reversa. O método analítico desenvolvido foi capaz de quantificar a VC sem sofrer interferência dos diversos componentes das formulações farmacêuticas e dos compostos endógenos da matriz biológica. O diluente escolhido para extrair e diluir a VC foi a mistura contendo água e metanol (4:1, v/v) acidificada com ácido fosfórico para pH 3,0 com a adição de 0,02% de tiosulfato de sódio. Este diluente foi o mais eficaz na estabilização da VC, comparando-se com outras condições de pH e composição, com a manutenção da quantidade de VC próximo a 100% depois de 10 dias a 4°C. Desta forma, foi desenvolvido um método de quantificação da VC que pode ser amplamente utilizado por indústrias farmacêuticas e laboratórios de pesquisa, uma vez que foi preciso e exato na avaliação do teor da VC em matriz biológica e em diferentes preparações farmacêuticas. Os lipossomas contendo VC foram produzidos pela técnica de *dehydration-rehydration vesicles* (DRV). Foram produzidos lipossomas contendo fosfatidilcolina (PC) ou mistura de PC com colesterol e outros lipídeos eletricamente carregados, obtendo-se assim lipossomas com carga elétrica neutra, positiva ou negativa. Todas as formulações apresentaram tamanho médio inferior a 200 nm e baixo índice de polidispersão (< 0,2). A eficiência de encapsulação da VC foi diretamente influenciada pela quantidade de lipossomas formados. Nos estudos de permeação cutânea, a associação da VC aos lipossomas só permitiu maior retenção na derme quando foram utilizados os lipossomas carregados negativamente. Após 6 horas, a aplicação desta formulação proporcionou alta retenção cutânea da VC, com acúmulo de $37,19 \pm 12,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $73,95 \pm 23,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ na epiderme e derme, respectivamente. Os lipossomas foram capazes de aumentar o fluxo de VC através da pele. A presença de colesterol e carga superficial negativa nos lipossomas provocaram aumento do fluxo de VC de 4 e 7 vezes, respectivamente, em relação ao fármaco livre (FL). A interação dos lipossomas com membranas biológicas vivas foi simulada em linhagens de queratinócitos (HaCat) e fibroblastos (3T3) através da análise da internalização celular dos lipossomas. Neste caso, durante o preparo dos lipossomas foram adicionados marcadores de membrana lipídica fluorescentes (rodamina e cumarina). Após tratamento, os grupos que receberam formulação lipossomal com carga superficial negativa apresentaram fluorescência superior aos grupos tratados com as outras formulações e o controle, sugerindo maior interação entre os lipossomas negativos e os queratinócitos e fibroblastos. Assim, a formulação com carga negativa foi comparada com a VC livre na regeneração celular de

queratinócitos após exposição à radiação UVA e na produção de colágeno tipo I em fibroblastos. Nos dois casos, os efeitos benéficos só foram observados com a encapsulação da VC nos lipossomas. Desta forma, o desenvolvimento tecnológico de uma formulação lipossomal contendo VC, permitiu a obtenção de uma formulação com estabilidade de pelo menos 30 dias e com características que favoreceram sua retenção e fluxo cutâneo. Além disso, a encapsulação da VC em lipossomas negativos proporcionou aumento da sua eficácia na regeneração de queratinócitos e na síntese de colágeno em fibroblastos.

Palavras-chave: Ácido ascórbico. Estrato córneo. Promotores de permeação. Penetração cutânea. Atividade antioxidante. 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol.

ABSTRACT

Skin aging involves events that lead to the reduction of its structural integrity and loss of biological functions. The reactive oxygen species (ROS) are potentially able to generate damage of tissues and are related with the cutaneous photoaging. Antioxidant molecules like vitamin C (VC) are capable of fighting these ROS. Besides, VC acts in the synthesis of collagen in the skin, the primary protein responsible for supporting its connective tissues. However, beneficial skin effects are only obtained when the VC is applied topically. In this work, liposomes containing VC for topical administration were developed and characterized. For quantification of VC in different matrixes, including pharmaceutical products, cosmetics, and porcine ear skin, a quantitative analytical method was developed and validated by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) using ion-pair reversed phase. The developed analytical method was capable of quantifying VC without the interference of the various components of the pharmaceutical formulations and the endogenous compounds of the biological matrix. The diluent chosen to extract and dilute VC was a mixture of water and methanol (4:1, v/v) acidified to pH 3.0 with phosphoric acid, with additional 0.02% sodium thiosulfate. This diluent was the most efficient to stabilize VC compared with other pH conditions and compositions, maintaining the amount of VC close to 100% after 10 days at 4°C. In this way, a method for quantification of VC that could be widely used by pharmaceutical companies and research laboratories was developed. It was precise and accurate in the evaluation of the content of VC in biological matrixes and different pharmaceutical formulations, making it advantageous towards other methods. Liposomes with VC were prepared by dehydration-rehydration vesicles method (DRV). Liposomes containing phosphatidylcholine (PC) or a mixture of PC and cholesterol and other electrically charged lipids were prepared, and liposomes with positive, negative and neutral charges were obtained. All formulations presented mean size inferior to 200 nm and low polydispersity index (<0.2). Encapsulation efficiency of VC was directly influenced by the amount of liposomes that were formed. In skin permeation studies, the association of VC in the liposomes only allowed greater retention in the dermis when negatively charged liposomes were used. After 6 hours, the application of this formulation promoted high skin retention of VC, with an accumulation of $37.9 \pm 12.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $73.95 \pm 23.23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the epidermis and dermis, respectively. Liposomes were capable of increasing the flow of VC through the skin. The presence of cholesterol and negative charge in the liposomes promoted an increase in VC flow of 4 and 7 times, respectively, when compared to free drug (FD). The interaction of liposomes with live biological membranes was simulated in keratinocytes (HaCat) and fibroblasts (3T3) through the analysis of cell internalization of liposomes. For this assay, during the preparation of liposomes, fluorescent lipids were used to label the lipid membrane (coumarin and rhodamine). After treatment, the groups treated with negatively charged liposomal formulation presented superior fluorescence than the groups treated with other formulations and control, suggesting a higher interaction between the negatively charged liposomes and keratinocytes and fibroblasts. Thus, this negatively charged formulation was compared with free VC in the cell regeneration of keratinocytes after exposure to UVA radiation and in the production of collagen type I in fibroblasts. In both cases, the beneficial effect was only observed when VC was encapsulated in the

liposomes. Therefore, the technological development of a liposomal formulation containing VC generated a formulation with a stability of at least 30 days and with characteristics that favored its retention and skin flow. Besides, the encapsulation of VC in negatively charged liposomes promoted an enhancement in the efficacy of regeneration of keratinocytes and the synthesis of collagen in fibroblasts.

Keywords: Ascorbic acid. Stratum corneum. Permeation enhancers. Skin permeation. Antioxidant activity. 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol.

1 INTRODUÇÃO

Os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são preparações de uso externo utilizadas nas diversas partes do corpo humano (pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral), com o objetivo de limpar, perfumar, alterar sua aparência, corrigir odores corporais, proteger ou manter em bom estado (BRASIL, 2005).

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), em 2015 o mercado mundial de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC) totalizou US\$ 467 bilhões em vendas. O Brasil ocupa posição de destaque, constituindo-se o terceiro maior mercado consumidor de produtos de HPPC do mundo (US\$ 43,5 bilhões), estando atrás apenas dos EUA (US\$ 76,3 bilhões) e China (US\$ 47,8 bilhões). Assim, representando 9,4% da participação mundial, o Brasil está à frente de importantes mercados como Japão (US\$ 37,1 bilhões), Alemanha (US\$ 19,2 bilhões) e França (US\$ 16,8 bilhões) (ABIHPEC, 2015).

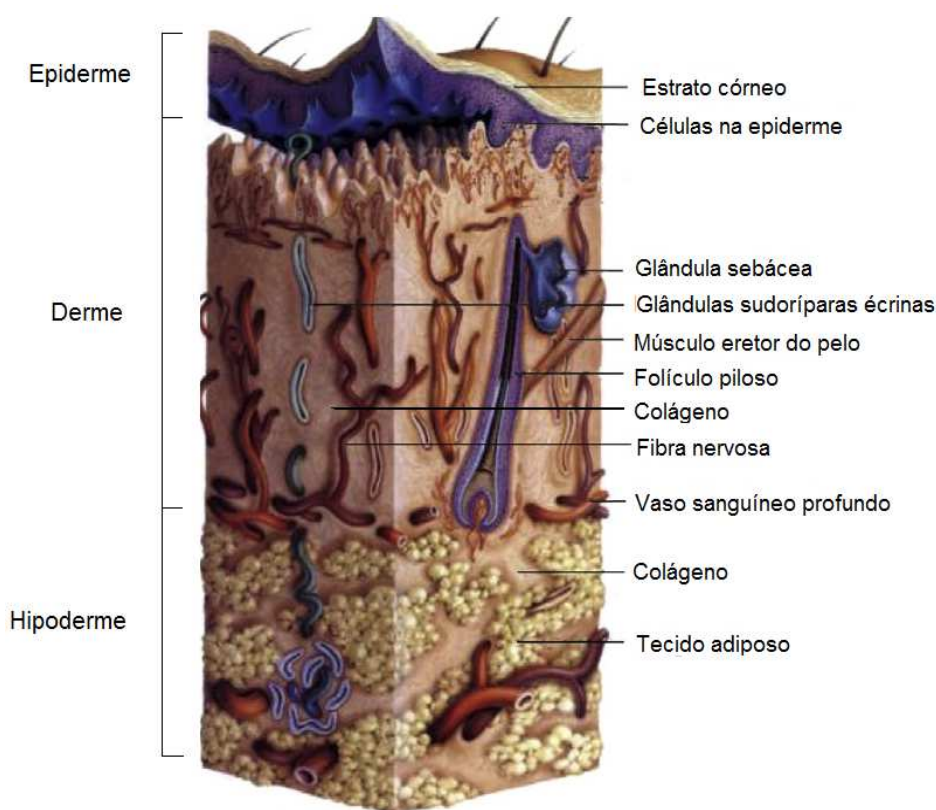
Entre os diversos produtos cosméticos disponíveis, os *anti-aging* recebem bastante destaque. Estes produtos atuam de diferentes formas combatendo ou retardando o envelhecimento cutâneo. Uma das moléculas mais usadas para este propósito é o ácido ascórbico (FARRIS, 2005). Também conhecida como vitamina C (VC), esta molécula é capaz de atuar contra o envelhecimento cutâneo combatendo os radicais livres (COLVEN; PINNELL, 1996; PADAYATTY et al., 2003; WINTERGERST; MAGGINI; HORNIG, 2006) e estimulando a síntese de colágeno (KISHIMOTO et al., 2013; NUSGENS et al., 2002).

Apesar dos vários efeitos benéficos oferecidos à pele, o desenvolvimento de formulações contendo VC, que sejam eficientes na sua entrega e estabilização, é um desafio (STAMFORD, 2012). Durante o delineamento de novas formulações é necessário entender as particularidades da permeação de moléculas como a VC na pele e a influência do veículo na promoção da permeação cutânea.

1.1 PELE: ANATOMIA E FUNÇÕES

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. É na pele que estão inseridos os pelos e as glândulas sebáceas e sudoríparas, denominados de apêndices cutâneos. Além disto, é dividida em três camadas: epiderme, derme e hipoderme (figura 1) (BOLZINGER et al., 2012).

Figura 1. Desenho esquemático demonstrando as camadas da pele e seus principais componentes.



Fonte: Adaptado de Bhushan et al, 2012.

A hipoderme é a camada mais interna da pele, sendo composta principalmente por adipócitos. As principais funções desta camada são proteção mecânica e isolamento térmico (BARONI et al., 2012).

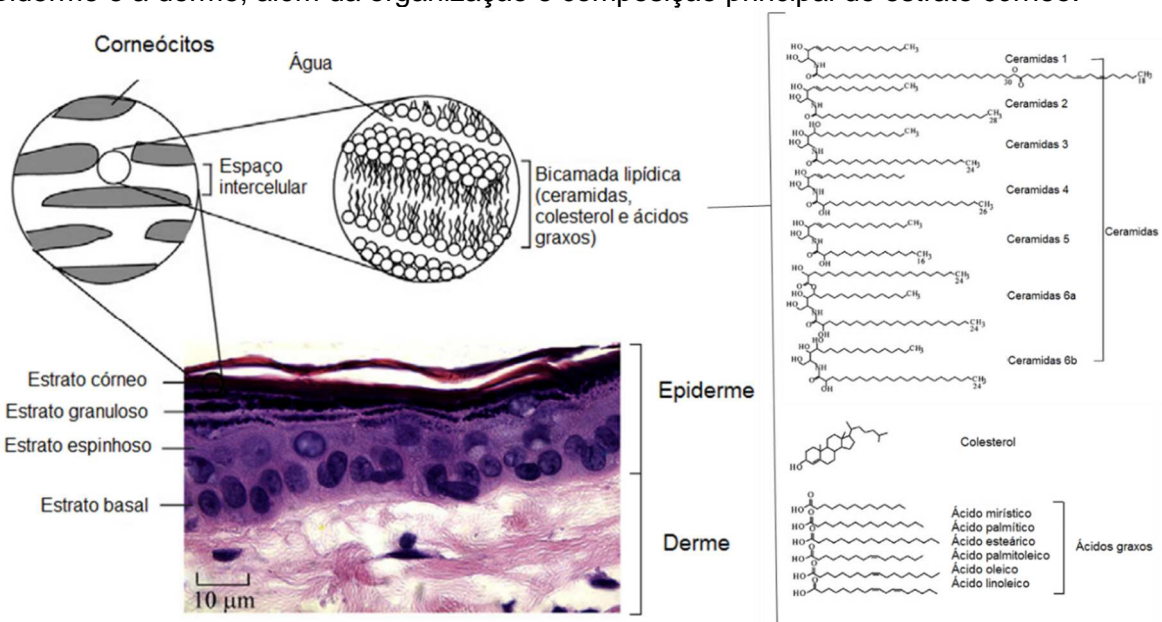
Em contato com a hipoderme está a derme. Esta camada é altamente vascularizada, contém vasos linfáticos e alguns tipos celulares como os fibroblastos, que são células capazes de sintetizar e renovar a matriz extracelular. Esta matriz é composta por tecido conjuntivo, incluindo as fibras elásticas e de colágeno (BARONI et al., 2012; BHUSHAN, 2012). As fibras elásticas presentes na derme são

constituídas por elastina e estão dispostas perpendicularmente à superfície da pele, intercaladas na junção epiderme-derme, conferindo elasticidade ao tecido conjuntivo. As fibras de colágeno são mais grossas, resistentes e estão dispostas paralelamente à superfície cutânea, proporcionando resistência mecânica e sustentação à pele. Estima-se que cerca de 70% da derme é composta por colágeno (CEVC; VIERL, 2010).

O tipo de colágeno predominante na matriz extracelular é o tipo I (85-90%) e o tipo III (10-15%). Os colágenos são sintetizados pelos fibroblastos da derme como α -pró-colágeno. Logo após, ocorre a hidroxilação dos grupos hidroxil-lisina seguida pela formação de uma tríplice hélice. O colágeno tipo I é composto por duas cadeias α -1 e uma cadeia α -2, enquanto que o colágeno tipo III contém 3 cadeias α -1. Esta estrutura de tríplice hélice é excretada para o espaço extracelular, onde proteinases clivam o domínio terminal e finalmente as moléculas de colágeno se organizam para formar as fibras de colágeno (CHUNG et al., 1997; LUCEY; GOLDBERG, 2014).

A epiderme é subdividida em estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo (figura 2) (BHUSHAN, 2012; MENON, 2002). As células predominantes nesta camada são os queratinócitos, sendo estes capazes de sintetizar diferentes lipídeos e proteínas estruturais. Com exceção do estrato córneo, todas as demais camadas da epiderme possuem células metabolicamente ativas (BARONI et al., 2012).

Figura 2. Esquema contendo corte histológico da pele demonstrando as camadas da epiderme e a derme, além da organização e composição principal do estrato córneo.



Fonte: Adaptado de Bhushan et al, 2012.

As células do estrato basal são as responsáveis pela contínua renovação da epiderme. A diferenciação dos queratinócitos se inicia nesta camada e prossegue em direção à camada mais externa da pele, o estrato córneo. No entanto, apenas 15% das células da camada basal estão envolvidas neste processo (BLANPAIN; FUCHS, 2006). As demais células se mantêm em um estado de quiescência, tornando-se ativas apenas quando a proliferação é requisitada, como por exemplo, quando ocorrem lesões ou em intervenções médicas direcionadas ao rejuvenescimento da pele (BARONI et al., 2012).

A etapa final da diferenciação dos queratinócitos está relacionada com mudanças extensas na sua estrutura, transformando-os em células achatadas e anucleadas denominadas corneócitos (BHUSHAN, 2012; CEVC; VIERL, 2010). Estas células são constituídas principalmente por filamentos de queratina envolvidos por um envelope cornificado composto por proteínas como a filagrina, loricrina e involucrina e uma camada de lipídeos ligados covalentemente a este envelope. Os corneócitos estão ligados entre si através dos corneodermossomos (HAFTEK, 2015).

O estrato córneo é composto pelos corneócitos dispostos em várias camadas (18-20 camadas) e embebidos em uma matriz lipídica (figura 2) (MENON; CLEARY; LANE, 2012). O espaço intercelular é formado por camadas lipídicas lamelares e é constituído principalmente por colesterol, ceramidas e ácidos graxos, sendo composto apenas por 15 a 30% de água (CASPERS et al., 2000).

A composição dos corneócitos e sua disposição em camadas na matriz extracelular, assim como a própria constituição e organização da matriz extracelular, faz com que o estrato córneo seja a principal barreira contra a entrada de substâncias através da pele, incluindo os fármacos (BARONI et al., 2012; DANKIK; BIGLIARDI; BIGLIARDI-QI, 2015; TROMMER; NEUBERT, 2006).

1.2 APLICAÇÃO CUTÂNEA E A ENTRADA DE MOLÉCULAS NA PELE

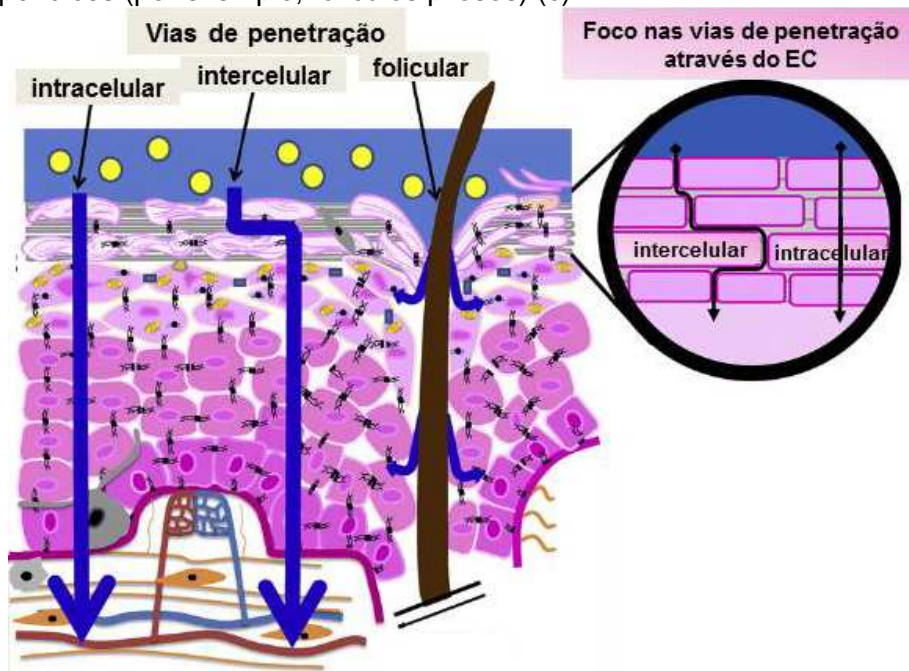
Além dos aspectos metabólicos e fisiológicos, a pele possui um papel importante na administração tópica e transdérmica de medicamentos e cosméticos (BOLZINGER et al., 2012; TROMMER; NEUBERT, 2006).

Embora tanto as formulações tópicas quanto as transdérmicas sejam aplicadas na pele, a região de ação é diferente entre elas. Na aplicação tópica espera-se ação local na própria pele, com manutenção da substância de interesse na superfície

cutânea (exemplo, repelentes e protetores solares) ou com a entrada da substância nas demais camadas da pele, incluindo as regiões mais profundas. A chegada da substância até a derme pode possibilitar certa absorção sistêmica, no entanto, geralmente ocorre em concentrações que não causam eventos adversos. Já as formulações transdérmicas não têm a pele como órgão alvo, utilizando a via percutânea apenas como via de entrada, com subsequente distribuição sistêmica (TROMMER; NEUBERT, 2006).

O transporte de substâncias através da pele pode acontecer a partir de três vias: transcelular, intercelular e via apêndices cutâneos (figura 3) (JEPPS et al., 2013). As duas primeiras vias estão relacionadas à entrada das substâncias através do estrato córneo. Na via transcelular, o fármaco atravessa os corneócitos e a matriz lipídica, particionando-se entre eles. A via intercelular consiste na entrada de moléculas via matriz lipídica, contornando os corneócitos. Supõe-se que a influência da via apêndices cutâneos não é muito significativa, visto a pequena área corporal que ocupam (0,1%). No entanto, esta via tem sido relacionada ao transporte de íons e moléculas grandes (BOLZINGER et al., 2012; PROW et al., 2011; TROMMER; NEUBERT, 2006).

Figura 3. Vias de transporte do fármaco através da pele: via transcelular (através dos corneócitos e da matriz lipídica) (a), via intercelular (entre os corneócitos, pela matriz lipídica) (b) e via apêndices (por exemplo, folículos pilosos) (c).



Fonte: Adaptado de Bolzinger et al, 2012.

A via de entrada de uma molécula depende das suas características como sua lipofilicidade. De modo geral, moléculas lipofílicas preferem a via intercelular e moléculas hidrofílicas a via transcelular. No entanto, acredita-se que mesmo as moléculas hidrofílicas possam entrar na pele via intercelular, através dos espaços aquosos formados entre as lamelas lipídicas. De fato, a entrada de moléculas na pele pode ocorrer pela combinação das três vias (BOLZINGER et al., 2012; CEVC; VIERL, 2010; EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

A passagem de substâncias pela pele é um processo que pode ser dividido em três etapas: a) penetração, que é a entrada de uma substância em uma camada específica, como exemplo a entrada no estrato córneo; b) permeação, que consiste na penetração de uma camada para outra e c) absorção, quando há entrada da molécula para o sistema vascular (BOLZINGER et al., 2012; JEPPS et al., 2013).

O fluxo (J) em que a molécula atravessa passivamente o estrato córneo pode ser descrito simplificadaamente pela 1ª Lei de Fick (Equação I) (HIGUCHI, 1960).

$$J = \frac{D_m C_{s,m}}{L} \cdot \frac{C_v}{C_{s,v}} \quad \text{Equação I}$$

Onde:

D_m = coeficiente de difusão do fármaco na membrana;

$C_{s,m}$ = solubilidade do fármaco na membrana;

$C_{s,v}$ = solubilidade do fármaco no veículo;

C_v = concentração do fármaco no veículo;

L = espessura da membrana.

O aumento do fluxo de substâncias através da pele pode ocorrer utilizando-se três estratégias, sendo elas: 1) aumentando a razão $C_v/C_{s,v}$, através da saturação do substância no veículo, 2) aumentando o D_m , pela associação da molécula à veículos capazes de desorganizar o estrato córneo e 3) aumentando a $C_{s,m}$, utilizando veículos capazes de aumentar a solubilidade da substância no estrato córneo (CEVC; VIERL, 2010; MOSER et al., 2001; RAI et al., 2010). A utilização destas estratégias pode ajudar no desenvolvimento de formulações com desempenho cutâneo superior (MORGANTI et al., 2001).

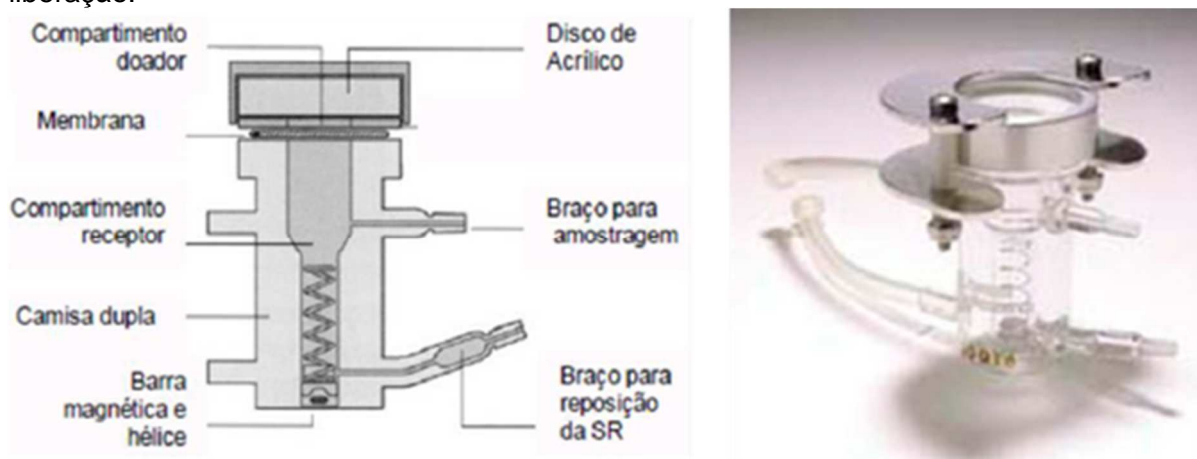
1.3 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Os estudos de permeação cutânea podem ser realizados em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Os métodos *in vivo* fornecem informações farmacocinéticas, enquanto que os métodos *in vitro* têm sido utilizados para avaliar a penetração e permeação de fármacos na pele (OECD, 2004;2011).

Nos testes de permeação *in vitro* são utilizados sistemas de difusão e membranas biológicas como a pele humana ou de animais como porco, rato e cobra. A pele humana, obtida de cirurgia plástica, não é utilizada com frequência pois apresenta alta variabilidade (por exemplo, pigmentação, região do corpo e presença de imperfeições como estrias) e pouca disponibilidade. A pele de porco é o modelo mais empregado devido sua semelhança com a pele humana, como densidade de folículos pilosos, espessura do estrato córneo e composição lipídica (GODIN; TOUITOU, 2007).

Células de difusão do tipo Franz (figura 4) são frequentemente utilizadas nos estudos de permeação cutânea. Estes dispositivos são constituídos por um compartimento doador, onde as formulações contendo o fármaco são inseridas, e outro compartimento denominado receptor, que contém uma solução na qual a substância é extensivamente solúvel. A formulação é colocada em contato direto com a pele, sob uma área difusional delimitada, de modo que possa ocorrer a difusão das moléculas do compartimento doador em direção ao compartimento receptor. Temperatura e agitação podem ser controladas (RAI et al., 2010).

Figura 4. Célula de fluxo estático tipo Franz utilizadas para estudos de permeação cutânea e liberação.



Fonte: Adaptado do manual Microette, Hanson Research.

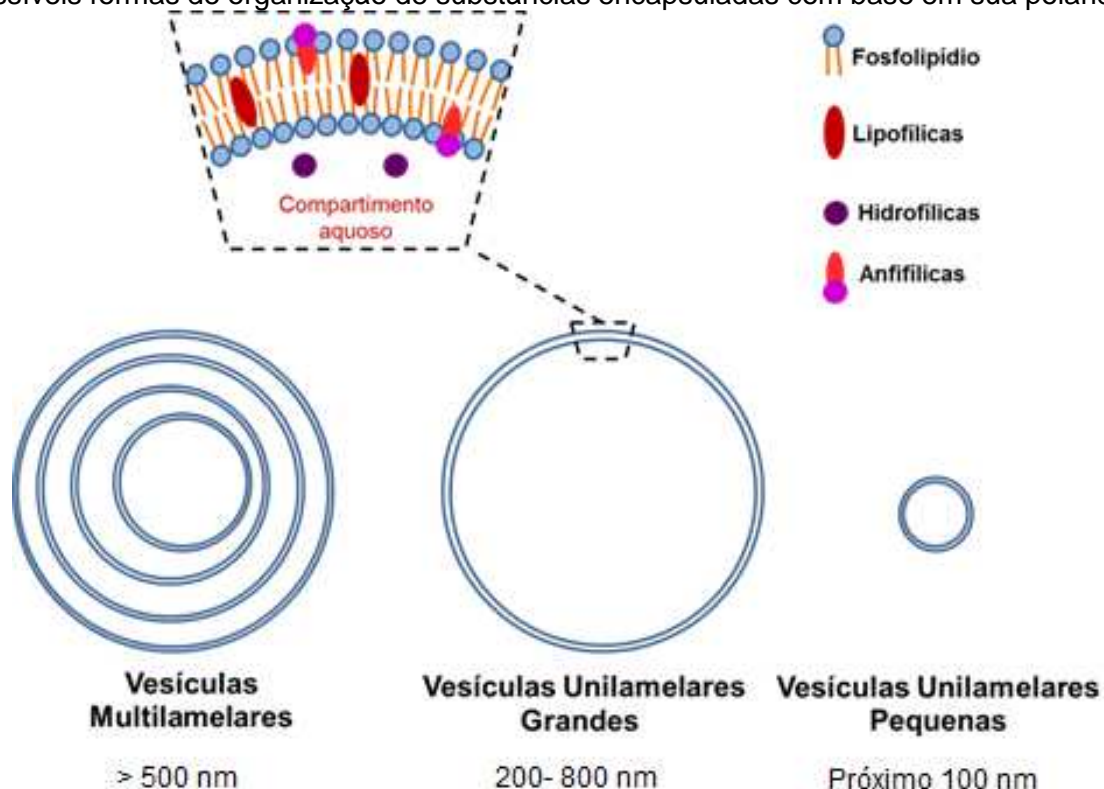
Entre os vários dados que podem ser obtidos nos estudos de permeação cutânea (análises microscópicas, histológicas, perda de água transepidermal, etc), destaca-se a possibilidade de quantificar o fármaco retido nas diferentes camadas da pele. A separação em camadas pode ser realizada por diferentes técnicas, destacando-se a retirada do estrato córneo pela técnica de *tape stripping* e a separação entre epiderme e derme, através de calor. Além da quantidade de fármaco retido na pele, também é possível avaliar a quantidade que chegou no meio receptor e calcular o fluxo da molécula através da pele (BARTOSOVA; BAJGAR, 2012; MOSER et al., 2001).

Desta forma, por meio de estudos de permeação é possível avaliar a influência dos promotores de permeação cutânea na entrada de substâncias na pele (LANE, 2013; MOSER et al., 2001). Exemplos de promotores de permeação bastante utilizados são os nanocarreadores, tendo como exemplo importante os lipossomas (DESAI; PATLOLLA; SINGH, 2010; HONEYWELL-NGUYEN; BOUWSTRA, 2005; MORGANTI et al., 2001).

1.4 LIPOSSOMAS

Os lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas que encapsulam um núcleo aquoso. São biocompatíveis e biodegradáveis e podem ser constituídos por lipídeos sintéticos ou naturais (AKBARZADEH et al., 2013). Este nanocarreador pode ser classificado quanto ao número de bicamadas lipídicas em vesículas multilamelares (MLV) ou unilamelares (ULV); ou classificados quanto ao seu tamanho em vesículas unilamelares grandes (LUV) (200-800 nm) ou vesículas unilamelares pequenas (SUV) (próximo a 100 nm) (TORCHILIN, 2010). A figura 5 contém desenho esquemático da estrutura e classificação dos lipossomas.

Figura 5. Constituição, estrutura e classificação dos lipossomas e representação das possíveis formas de organização de substâncias encapsuladas com base em sua polaridade.



Fonte: Adaptado de Gaeti et al, 2015.

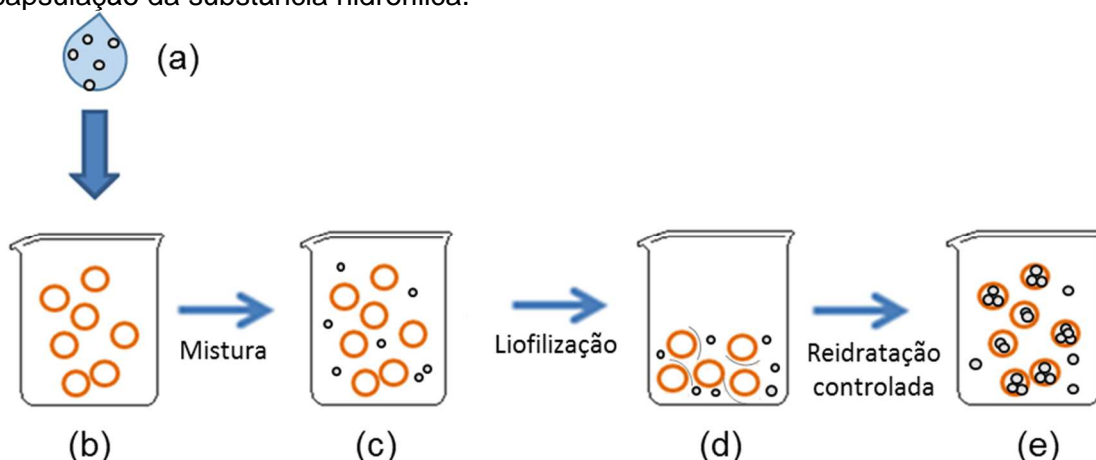
Os lipossomas são compostos essencialmente por fosfolopídeos, que são moléculas com característica anfifílica, com uma cabeça polar e uma cauda apolar contendo duas cadeias de ácidos graxos. Em presença de soluções aquosas se organizam espontaneamente em bicamadas, semelhante às membranas biológicas, com a parte hidrofóbica voltada para o interior da membrana e a cabeça hidrofílica orientada para o exterior aquoso (PURI et al., 2009; SHARMA; SHARMA, 1997).

Devido à sua composição, os lipossomas possuem a habilidade de encapsular tanto moléculas hidrofílicas quanto lipofílicas, permitindo que uma grande variedade de substâncias sejam encapsuladas nestas vesículas. Moléculas lipofílicas ficam inseridas na membrana lipídica e as hidrofílicas ficam encapsuladas no compartimento aquoso (MUFAMADI et al., 2011).

Existem vários métodos de preparo de lipossomas, dentre eles: hidratação do filme lipídico, extrusão, sonicação, injeção de etanol e evaporação de fase reversa (AKBARZADEH et al., 2013). As técnicas de preparo mais tradicionais geralmente resultam em baixa eficiência de encapsulação de substâncias hidrofílicas. Para tanto,

Kirby & Gregoriadis (1984) propuseram uma técnica denominada de *dehydration-rehydration vesicles* (DRV), capaz de aumentar a eficiência de encapsulação de fármacos hidrofílicos. Nesta técnica, lipossomas vazios são produzidos e liofilizados juntos com o fármaco. No processo de reidratação, realizado em etapas, o fármaco é forçado a entrar para o compartimento aquoso (figura 6).

Figura 6. Esquema representativo da obtenção de lipossomas pela técnica de *dehydration-rehydration vesicles* (DRV). A solução contendo a substância hidrofílica (a) é adicionada aos lipossomas vazios, previamente produzidos, contendo crioprotetor (b). A mistura é congelada e liofilizada para obtenção do pó liofilizado (d) que será reidratado em etapas (e) para a encapsulação da substância hidrofílica.



Fonte: próprio autor.

1.4.1 Lipossomas e promoção de permeação

A utilização de lipossomas na encapsulação de moléculas para aplicação tópica tem sido reportada desde 1980 (MEZEI; GULASEKHARAM, 1980). Vários fatores podem influenciar na permeação de moléculas através da pele, entre eles as propriedades físico-químicas da molécula como peso molecular e lipofilicidade e características dos lipossomas como lamelaridade, carga superficial, tamanho, concentração e tipo de lipídeo (RAI et al., 2010; SINICO et al., 2005; WEINER et al., 1989). A presença de colesterol ou de carga superficial positiva ou negativa na composição dos lipossomas, por exemplo, tem sido relacionada ao aumento da permeação e do fluxo cutâneo (CODERCH et al., 2000; MANOSROI; KONGKANERAMIT; MANOSROI, 2004; SINICO et al., 2005; TIWARI et al., 2011).

A capacidade dos lipossomas de aumentar a permeação de moléculas na pele envolve diferentes mecanismos de ação. Primeiramente, acredita-se que a aplicação

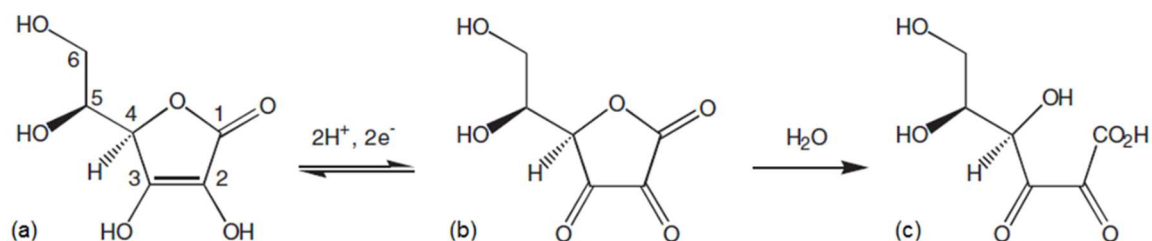
destas vesículas topicamente favoreça a formação de um filme lipídico oclusivo capaz de aumentar a retenção de água no estrato córneo (DESAI et al., 2010). Em condições normais, o estrato córneo possui cerca de 15 µm de espessura, já quando hidratado pode chegar a 40 µm (WARNER; STONE; BOISSY, 2003). O aumento da quantidade de água na cabeça polar dos lipídeos intercelulares pode provocar a ocorrência de 'pools' que favorecem a permeação de substâncias, principalmente das substâncias hidrofílicas. Ainda, o aumento da água intercelular pode promover desagregação dos lipídeos intercelulares e provocar certa ruptura na camada córnea (TROMMER; NEUBERT, 2006).

O outro mecanismo em que os lipossomas atuam na promoção de permeação de moléculas envolve mudanças da estrutura do estrato córneo. Após a aplicação na pele, os lipossomas se desintegram ou se fundem à sua superfície, de modo que, os lipídeos dos lipossomas se misturam com os lipídeos intercelulares do estrato córneo, provocando desorganização nesta camada. A adição de lipídeos pode mudar a temperatura de transição de fase, e conseqüentemente, alterar a fluidez das bicamadas do estrato córneo, facilitando a entrada de moléculas (DESAI et al., 2010; EL MAGHRABY et al., 2008). Os lipossomas são capazes de interagir tanto com os lipídeos mais superficiais quanto com os lipídeos mais profundos da pele, dependendo da composição da vesícula, influenciando na permeação das moléculas (BOUWSTRA et al., 2003; HONEYWELL-NGUYEN; BOUWSTRA, 2005).

1.5 VITAMINA C

A vitamina C (VC), ou ácido ascórbico, é uma vitamina hidrossolúvel amplamente presente nas frutas e vegetais. A forma biologicamente ativa é o isômero L-ácido ascórbico. A VC é oxidada através de uma reação reversível para ácido dehidroascórbico (ADH), que também possui atividade biológica. No entanto, o ADH pode se converter irreversivelmente em uma molécula sem atividade biológica, o ácido dicetogulônico (figura 7) (LINSTER; VAN SCHAFTINGEN, 2007). A VC sofre oxidação quando exposta ao estresse oxidativo, luz, pH alto, aumento de temperatura e na presença de determinadas enzimas e íons metálicos (NOVÁKOVÁ; SOLICH; SOLICHOVÁ, 2008).

Figura 7. Esquema representativo da oxidação da vitamina C (a) em ácido dehidroascórbico (b) e ácido dicetogulônico (c).



Estudos demonstram a eficácia da VC no combate e tratamento do envelhecimento cutâneo (HUMBERT et al., 2003a; NUSGENS et al., 2002; TRAIKOVICH, 1999). As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão relacionados com o fotoenvelhecimento e são formados tanto por processos endógenos (exemplo, processos isquêmicos), quanto por agentes externos como a radiação ultravioleta (UV) e poluentes. Estes compostos são capazes de provocar graves danos no DNA, membrana lipídica e proteínas como o colágeno. Como antioxidante, a VC cede elétrons aos radicais intra e extracelulares, neutralizando-os e protegendo os tecidos contra o dano oxidativo. Ainda, é capaz de potencializar a atividade antioxidante da vitamina E, uma vez que regenera a forma oxidada desta vitamina (ARRIGONI; DE TULLIO, 2002; KOHEN; NYSKA, 2002).

Outra propriedade importante está relacionada com a síntese de colágeno. Primeiramente, a VC atua como cofator das enzimas prolil e lisil oxidase, ambas necessárias em processos pós-translacionais do colágeno tipo I e tipo III. Além disso, é capaz de aumentar os níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) do colágeno tipo I e III, aumentando a quantidade de colágeno produzido. Ainda, promove o aumento da síntese de inibidores de metaloproteinases, enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, diminuindo a degradação do colágeno já existente (FARRIS, 2005).

Em estudo clínico, a aplicação da VC (5%) em comparação ao controle proporcionou melhora nas características gerais da pele, com diminuição das rugas finas, irregularidades táteis e flacidez (TRAIKOVICH, 1999). No estudo desenvolvido por Humbert e colaboradores (2003), a VC (5%) aplicada topicamente durante seis meses também proporcionou efeitos benéficos à região tratada, com melhora significativa da profundidade dos sulcos da pele. Além disso, a VC ainda demonstrou possuir atividade anti-inflamatória (CARCAMO et al., 2002), com diminuição do

eritema pós-tratamento com laser de dióxido de carbono (ALSTER; WEST, 1998) e ação despigmentante (PANICH et al., 2011).

No entanto, os seres humanos são incapazes de sintetizar a VC devido à falta da enzima gulonolactona oxidase, enzima primordial na sua biossíntese (NISHIKIMI et al., 1994). A suplementação da VC pode ocorrer via alimentar por meio da ingestão de alimentos ricos nesta vitamina, como as frutas cítricas. Quando insuficiente pela alimentação, pode ser ingerida na forma de preparações farmacêuticas como os comprimidos e soluções orais. No entanto, mesmo com a suplementação via oral, quantidades adequadas de VC na pele só podem ser alcançadas com a sua aplicação tópica (FARRIS, 2005; MANELA-AZULAY; BAGATIN, 2009).

O desenvolvimento de formulações tópicas de VC requer cuidados especiais devido à sua pouca estabilidade sob diferentes condições e sua característica hidrofílica em contraste à hidrofocidade do estrato córneo (STAMFORD, 2012).

Diante do que já foi exposto, fica claro que a encapsulação da VC em lipossomas pode melhorar a sua permeação cutânea. A quantidade de VC presente na formulação pode influenciar diretamente na sua retenção cutânea. Maiores quantidades de VC na formulação estão relacionadas com melhor retenção na pele, com ótimos resultados nas concentrações de 5 a 20% (PINNELL et al., 2001).

Lipossomas contendo VC (0,15%) para aplicação tópica foram produzidos por Zhou e colaboradores (2014). Apesar dos lipossomas terem aumentado o fluxo *in vitro* da VC através da pele de rato, os autores não realizaram a quantificação da VC retida na pele. Estudos adicionais são necessários para avaliar o perfil de entrada e acúmulo de VC na pele após a aplicação tópica de lipossomas contendo VC, preferencialmente em pele de orelha de porco, que tem permeabilidade mais semelhante à pele humana que a pele de rato (TOUITOU et al., 1996).

Frente aos vários benefícios biológicos associados à VC e à ausência de estudos detalhados da encapsulação da VC em lipossomas para aplicação tópica, é interessante o desenvolvimento de uma formulação lipossomal de alto desempenho, com avaliação da influência dos componentes da formulação na interação com membranas biológicas e na promoção da permeação cutânea e eficácia da VC.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar lipossomas contendo vitamina C para uso tópico e avaliar o seu desempenho *in vitro* por meio de estudos de permeação cutânea, bem como na síntese de colágeno por fibroblastos e capacidade de regeneração celular de queratinócitos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a estabilidade analítica da vitamina C frente à temperatura, composição e pH do diluente.
- Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação da vitamina C por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) por pareamento iônico em fase reversa.
- Avaliar a capacidade do método analítico proposto em quantificar a vitamina C em diferentes formas farmacêuticas.
- Desenvolver lipossomas contendo vitamina C.
- Caracterizar os lipossomas desenvolvidos quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão, carga superficial, eficiência de encapsulação e contagem do número de partículas.
- Realizar análise morfológica de lipossomas contendo VC após a etapa de reidratação por meio de microscopia eletrônica de transmissão.
- Acompanhar a estabilidade da dispersão lipossomal contendo VC durante 30 dias.

- Avaliar o desempenho dos lipossomas desenvolvidos em testes de permeação cutânea *in vitro*.
- Verificar a influência da composição lipídica dos lipossomas na internalização celular em fibroblastos e queratinócitos.
- Avaliar *in vitro* a capacidade da VC em solução e lipossomal em estimular a síntese de colágeno tipo I.
- Avaliar *in vitro* a influência da VC em solução e lipossomal na regeneração de queratinócitos.

3 PUBLICAÇÕES

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho foram organizados para a construção de dois artigos. No primeiro artigo, foi desenvolvido e validado um método analítico para quantificar a VC. Em virtude da instabilidade físico-química desta molécula, também foram estabelecidas condições para assegurar sua estabilidade analítica e devida quantificação. O método desenvolvido foi utilizado para quantificar a VC em diferentes preparações farmacêuticas, incluindo três medicamentos e um produto dermatológico. A VC está presente nestas preparações devido as suas várias funções biológicas. No produto dermatológico destaca-se seus efeitos benéficos às células da pele, como na síntese de colágeno e ação antioxidante. No entanto, a entrada desta molécula na pele é dificultada devido à sua característica hidrofílica, uma vez que o estrato córneo, a principal barreira cutânea, é hidrofóbico. Assim, no segundo artigo, foi realizado um estudo para avaliar a influência da composição lipídica de lipossomas na encapsulação da VC. Ainda, foram realizados estudos *in vitro* para avaliar o desempenho cutâneo da VC, bem como a promoção de efeitos benéficos às células da pele.

Artigo 1 – Quantificação da vitamina C em produtos farmacêuticos e cosméticos: estabilidade analítica, desenvolvimento e validação de um método analítico por pareamento iônico HPLC-DAD em fase reversa

Artigo 2 – A new formulation of an old drug: Ascorbic acid in liposomes brings life to the skin

Quantificação da vitamina C em produtos farmacêuticos e cosméticos: estabilidade analítica, desenvolvimento e validação de um método para determinação quantitativa em HPLC-DAD por pareamento iônico em fase reversa

Resumo

O principal desafio na quantificação da vitamina C (VC) por HPLC é desenvolver um método que seja simples, seletivo e confiável, com parâmetros cromatográficos adequados. Neste trabalho, a utilização do hidrogenossulfato de tetrabutylamônio como pareador iônico na fase móvel permitiu a eluição adequada da VC em HPLC-DAD em fase reversa. Para a escolha do diluente avaliou-se a interferência de vários fatores na estabilidade analítica da VC como o pH (3,0 e 6,8), adição de solvente orgânico (metanol) e agentes antioxidantes (biossulfato de sódio, tiossulfato de sódio e EDTA) e a influência da temperatura (4, 25 e 40°C). O diluente que possibilitou as melhores condições de estabilização da VC foi a mistura de água e metanol (4:1 v/v) com adição de 0,02% de tiossulfato de sódio com ajuste de pH para 3,0 com ácido fosfórico. O método apresentou linearidade na faixa de concentração de 5 a 100 µg/mL. Os valores de precisão intracorrída e interdia, representados pelo DPR% foram menores que 2%. A exatidão/recuperação ficou entre 98 e 104%. O método foi utilizado na quantificação da VC em comprimidos de liberação retardada, comprimidos efervescentes, solução oral e em um creme cosmético. Os valores de teor ficaram dentro do especificado, entre 90-110%. Mesmo com a complexa composição das formas farmacêuticas avaliadas, o método foi capaz de quantificar a VC sem interferência dos excipientes, mostrando-se seletivo. Assim, o novo método desenvolvido apresenta potencial para ser utilizado em laboratórios analíticos para a quantificação da VC, uma vez que foi linear, preciso, exato e seletivo, com estabilização da VC por pelo menos 5 dias a 25°C, garantindo sua estabilidade analítica e favorecendo as condições de trabalho.

Palavras chave: Ácido ascórbico. Estabilidade. Pareador iônico. Validação. Preparações farmacêuticas/cosméticas.

A new formulation of an old drug: Ascorbic acid in liposomes brings life to the skin

Resumo

A vitamina C (VC) é amplamente utilizada em formulações cosméticas devido à sua capacidade de aumentar a síntese de colágeno e sua propriedade antioxidante. Neste estudo, a VC foi encapsulada em lipossomas com composições lipídicas diferentes e produzidos pela técnica de *dehydration-rehydration vesicles* (DRV). Foi avaliada a influência da quantidade de lipídeo, presença de colesterol e de carga elétrica superficial na eficiência de encapsulação, permeação cutânea e interação com queratinócitos e fibroblastos *in vitro*. As formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e número de partículas formadas. Foram realizados testes de estabilidade e avaliação *in vitro* de eficácia com a formulação com características mais adequadas à aplicação tópica. Em todos os casos, os lipossomas produzidos apresentaram tamanho médio inferior a 200 nm e baixos valores de índice de polidispersão ($< 0,18$). A eficiência de encapsulação da VC apresentou uma relação direta com o número de lipossomas formados. Durante os estudos de permeação cutânea, a presença de carga negativa nos lipossomas favoreceu a retenção da VC na pele, com acúmulo de $37,19 \pm 12,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $73,95 \pm 23,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ na epiderme e derme, respectivamente, após 6 horas. O fluxo, isto é, a quantidade de VC que atravessou a pele, foi influenciado pela composição da formulação. Tanto a presença de colesterol quanto a carga negativa superficial nos lipossomas foram capazes de aumentar a quantidade de VC que atravessou a pele. A formulação lipossomal com carga negativa apresentou estabilidade superior a 30 dias e promoveu aumento no fluxo de 7 vezes em comparação à VC livre. Ainda, os lipossomas carregados negativamente foram capazes de interagir melhor com a membrana celular dos queratinócitos e fibroblastos. Estudos *in vitro* de eficácia demonstraram que a associação da VC ao lipossoma com carga negativa proporcionou aumento da eficácia da VC na síntese de colágeno tipo I em fibroblastos e na regeneração dos danos causados pela radiação UVA em queratinócitos. Sendo assim, foram produzidos lipossomas promotores de permeação cutânea da VC, capazes de aumentar a retenção e fluxo desta molécula na pele. Estes lipossomas também promoveram aumento da eficácia da VC, podendo potencializar sua ação no tratamento do envelhecimento cutâneo.

Palavras-chave: Ácido ascórbico. Composição lipídica. Estudos de permeação cutânea. Internalização celular. Colágeno tipo I. Atividade antioxidante.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram estabelecidas condições analíticas adequadas para a estabilização da vitamina C. A adição de solvente orgânico, pH ácido, e a presença de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) proporcionaram boa estabilidade à VC a 4°C e 25°C, por tempo adequado para aplicação na rotina analítica.
- Foi desenvolvido e validado um método analítico para quantificação da vitamina C por HPLC, com aplicação na quantificação deste analito em amostras comerciais de comprimidos de desintegração lenta, comprimidos efervescentes, solução oral (gotas) e em uma formulação cosmética.
- Foram produzidas cinco formulações lipossomais com composição lipídica diferente, com tamanho e índice de polidispersão satisfatórios.
- Foi possível traçar uma relação direta entre o número de partículas formadas e a eficiência de encapsulação da vitamina C.
- A formulação contendo PC, Col e DSPG em dispersão aquosa apresentou estabilidade por, no mínimo 30 dias, tanto em geladeira quanto a 25°C, com manutenção da quantidade de vitamina C superior a 90% e sem alteração no tamanho e Pdl dos lipossomas. As imagens obtidas por TEM desta formulação mostraram lipossomas com tamanho médio semelhante ao obtido por DLS.
- Entre os lipossomas desenvolvidos, o lipossoma com carga superficial negativa apresentou maior retenção e fluxo de VC através da pele de orelha de porco. A encapsulação nos lipossomas negativos proporcionou retenção cutânea de VC superior a 97 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e fluxo de VC através de pele de $2,19 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.
- Os lipossomas com carga superficial negativa apresentaram maior interação com a membrana celular de linhagens de queratinócitos e fibroblastos em cultura celular, com maior internalização destes lipossomas.

- A associação da VC aos lipossomas foi capaz de aumentar a síntese de colágeno tipo I intra e extracelular em comparação ao grupo tratado com a VC não formulada.
- Os lipossomas aumentaram também a capacidade da VC de recuperar os danos causados pela radiação UVA em queratinócitos.
- A análise conjunta de todos os dados gerados *in vitro* podem ajudar a prever o comportamento da formulação lipossomal *in vivo*, reduzindo possivelmente a necessidade de testes em animais para avaliar a eficácia do produto cosmético.
- Desta forma, considerando-se os danos causados pelo envelhecimento cutâneo ocorridos em função da oxidação e perda de colágeno na pele, a vitamina C associada aos lipossomas com carga negativa apresentam-se como uma alternativa viável de formulação cosmética de alto desempenho.

REFERÊNCIAS

ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. <https://www.abihpec.org.br>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2016.

AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABADY, R.; DAVARAN, S.; JOO, S. W.; ZARGHAMI, N.; HANIFEHPOUR, Y.; SAMIEI, M.; KOUHI, M.; NEJATI-KOSHKI, K. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, p. 102-102, 2013.

ALSTER, T. S.; WEST, T. B. Effect of topical vitamin C on postoperative carbon dioxide laser resurfacing erythema. **Dermatol Surg**, v. 24, p. 331-4, 1998.

ARRIGONI, O.; DE TULLIO, M. C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1569, p. 1-9, 2002.

BAKKIALAKSHMI, S.; SELVARANI, P.; CHENTHAMARAI, S. Fluorescence quenching of Rhodamine B base by two amines. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 105, p. 557-562, 2013.

BANERJEE, D.; KAUL, D. Combined inhalational and oral supplementation of ascorbic acid may prevent influenza pandemic emergency: A hypothesis. **Nutrition**, v. 26, p. 128-132, 2010.

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.

BARTOSOVA, L.; BAJGAR, J. Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. **Curr Med Chem**, v. 19, p. 4671-7, 2012.

BHOWMICK, S.; MAZUMDAR, T.; SINHA, R.; ALI, N. Comparison of liposome based antigen delivery systems for protection against *Leishmania donovani*. **J Control Release**, v. 141, p. 199-207, 2010.

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.

BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal Stem Cells of the Skin. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 339-373, 2006.

BOLZINGER, M.-A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 156-165, 2012.

BONNEKOH, B.; RODING, J.; KRUEGER, G. R.; GHYCZY, M.; MAHRLE, G. Increase of lipid fluidity and suppression of proliferation resulting from liposome uptake by human keratinocytes in vitro. **Br J Dermatol**, v. 124, p. 333-40, 1991.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; GOORIS, G. S.; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Prog Lipid Res**, v. 42, p. 1-36, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 211, de 14 de julho de 2005**. Estabelece a Definição e a Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, conforme Anexo I e II desta Resolução e dá outras definições. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/legis/especifica_registro.htm. Acesso em: 20 fevereiro de 2016.

CARCAMO, J. M.; PEDRAZA, A.; BORQUEZ-OJEDA, O.; GOLDE, D. W. Vitamin C suppresses TNF alpha-induced NF kappa B activation by inhibiting I kappa B alpha phosphorylation. **Biochemistry**, v. 41, p. 12995-3002, 2002.

CASPERS, P. J.; LUCASSEN, G. W.; BRUINING, H. A.; PUPPELS, G. J. Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration profiles in human skin. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 31, p. 813-818, 2000.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, p. 277-299, 2010.

CHAUDHURY, A.; DAS, S.; LEE, R. F. S.; TAN, K.-B.; NG, W.-K.; TAN, R. B. H.; CHIU, G. N. C. Lyophilization of cholesterol-free PEGylated liposomes and its impact on drug loading by passive equilibration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, p. 167-175, 2012.

CHEBROLU, K. K.; JAYAPRAKASHA, G. K.; YOO, K. S.; JIFON, J. L.; PATIL, B. S. An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, p. 443-449, 2012.

CHEN, M.; GUPTA, V.; ANSELMO, A. C.; MURASKI, J. A.; MITRAGOTRI, S. Topical delivery of hyaluronic acid into skin using SPACE-peptide carriers. **J Control Release**, v. 173, p. 67-74, 2014.

CHORACHOO, J.; AMNUAIKIT, T.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Liposomal encapsulated rhodomyrtone: a novel antiacne drug. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

CHUNG, J. H.; YOUN, S. H.; KWON, O. S.; CHO, K. H.; YOUN, J. I.; EUN, H. C. Regulations of collagen synthesis by ascorbic acid, transforming growth factor-beta and interferon-gamma in human dermal fibroblasts cultured in three-dimensional

collagen gel are photoaging- and aging-independent. **J Dermatol Sci**, v. 15, p. 188-200, 1997.

CODERCH, L.; FONOLLOSA, J.; DE PERA, M.; ESTELRICH, J.; DE LA MAZA, A.; PARRA, J. L. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. **J Control Release**, v. 68, p. 85-95, 2000.

COLVEN, R. M.; PINNELL, S. R. Topical vitamin C in aging. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 227-234, 1996.

COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal**, v. 17, p. 1195-1214, 2003.

DANCIK, Y.; BIGLIARDI, P. L.; BIGLIARDI-QI, M. What happens in the skin? Integrating skin permeation kinetics into studies of developmental and reproductive toxicity following topical exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 252-281, 2015.

DESAI, P.; PATLOLLA, R. R.; SINGH, M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. **Molecular membrane biology**, v. 27, p. 247-259, 2010.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. **Eur J Pharm Sci**, v. 34, p. 203-22, 2008.

ELOY, J. O.; CLARO DE SOUZA, M.; PETRILLI, R.; BARCELLOS, J. P.; LEE, R. J.; MARCHETTI, J. M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 123, p. 345-63, 2014.

FARRIS, P. K. Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions. **Dermatol Surg**, v. 31, p. 814-7; discussion 818, 2005.

FDA. Food and Drug Administration. **Validation of Chromatographic Methods**. 1994. Disponível em: www.fda.gov. Acesso em: 19 de fevereiro de 2016.

FERIN, R.; PAVÃO, M. L.; BAPTISTA, J. Rapid, sensitive and simultaneous determination of ascorbic and uric acids in human plasma by ion-exclusion HPLC-UV. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 665-669, 2013.

FISHER, G. J.; VARANI, J.; VOORHEES, J. J. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. **Arch Dermatol**, v. 144, p. 666-72, 2008.

GAETIL, M. P.; BENFICA, P. L.; MENDES, L. P.; VIEIRA, M. S.; ANJOS, J. L.; ALONSO, A.; REZENDE, K. R.; VALADARES, M. C.; LIMA, E. M. Liposomal Entrapment of 4-Nerolidylcatechol: Impact on Phospholipid Dynamics, Drug Stability and Bioactivity. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 15, p. 838-47, 2015.

GILLET, A.; COMPERE, P.; LECOMTE, F.; HUBERT, P.; DUCAT, E.; EVRARD, B.; PIEL, G. Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour. **Int J Pharm**, v. 411, p. 223-31, 2011.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1152-1161, 2007.

GOLUBITSKII, G. B.; BUDKO, E. V.; BASOVA, E. M.; KOSTARNOI, A. V.; IVANOV, V. M. Stability of ascorbic acid in aqueous and aqueous-organic solutions for quantitative determination. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 62, p. 742-747, 2007.

GONZALEZ-RODRÍGUEZ, M. L.; CÓZAR-BERNAL, M. J.; FINI, A.; RABASCO, A. M. **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement**. Springer US, 2015. Disponível em: <http://www.springer.com/la/book/9783662450123>. Acesso em: 15 de janeiro de 2016.

GORTON, H. C.; JARVIS, K. The effectiveness of vitamin C in preventing and relieving the symptoms of virus-induced respiratory infections. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**, v. 22, p. 530-533, 1999.

GRANT, G. J.; BARENHOLZ, Y.; PISKOUN, B.; BANSINATH, M.; TURNDORF, H.; BOLOTIN, E. M. DRV liposomal bupivacaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation in mice. **Pharm Res**, v. 18, p. 336-43, 2001.

GREGORIADIS, G.; DA SILVA, H.; FLORENCE, A. T. A procedure for the efficient entrapment of drugs in dehydration-rehydration liposomes (DRVs). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 65, p. 235-242, 1990.

GUPTA, V. K.; JAIN, R.; RADHAPYARI, K.; JADON, N.; AGARWAL, S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals - A review. **Analytical Biochemistry**, v. 408, p. 179-196, 2011.

HAFTEK, M. Epidermal barrier disorders and corneodesmosome defects. **Cell Tissue Res**, v. 360, p. 483-90, 2015.

HAN, H.-K.; SHIN, H.-J.; HA, D. H. Improved oral bioavailability of alendronate via the mucoadhesive liposomal delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 500-507, 2012.

HASANOVIC, A.; HOLLICK, C.; FISCHINGER, K.; VALENTA, C. Improvement in physicochemical parameters of DPPC liposomes and increase in skin permeation of aciclovir and minoxidil by the addition of cationic polymers. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 75, p. 148-53, 2010.

HEINO, J.; KÄHÄRI, V.-M.; JAAKKOLA, S.; PELTONEN, J. Collagen in the Extracellular Matrix of Cultured Scleroderma Skin Fibroblasts: Changes Related to Ascorbic Acid-Treatment. **Matrix**, v. 9, p. 34-39, 1989.

HERCBERG, S.; GALAN, P.; PREZIOSI, P.; ET AL. The su.vi.max study: A randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, p. 2335-2342, 2004.

HIGUCHI, T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v. 11, p. 85-97, 1960.

HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; BOUWSTRA, J. A. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 2, p. 67-74, 2005.

HU, L.; LI, L.; LUO, Z.; YANG, J.; LIU, W. Determination of Trace Vitamin C by Ion-Pair HPLC with UV Detection in Calcium Gluconate and Vitamin C Compound Oral Solution. *Journal of Chromatographic Science*, v. 50, p. 102-107, 2012.

HUMBERT, P. G.; HAFTEK, M.; CREIDI, P.; LAPIERE, C.; NUSGENS, B.; RICHARD, A.; SCHMITT, D.; ROUGIER, A.; ZAHOUANI, H. Topical ascorbic acid on photoaged skin. Clinical, topographical and ultrastructural evaluation: double-blind study vs. placebo. *Experimental Dermatology*, v. 12, 2003a.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. 2005. Disponível em: <http://www.ich.org> 2005. Acesso em: 23 de fevereiro de 2016.

IOELE, G.; TAVANO, L.; DE LUCA, M.; RAGNO, G.; PICCI, N.; MUZZALUPO, R. Photostability and ex-vivo permeation studies on diclofenac in topical niosomal formulations. *Int J Pharm*, v. 494, p. 490-7, 2015.

JEPPE, O. G.; DANCİK, Y.; ANISSIMOV, Y. G.; ROBERTS, M. S. Modeling the human skin barrier--towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 65, p. 152-68, 2013.

KALL, M. A.; ANDERSEN, C. Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 730, p. 101-111, 1999.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*, v. 21, p. 16-29, 2015.

KANG, S. N.; HONG, S.-S.; KIM, S.-Y.; OH, H.; LEE, M.-K.; LIM, S.-J. Enhancement of liposomal stability and cellular drug uptake by incorporating tributyrin into celecoxib-loaded liposomes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, p. 128-133, 2013.

KAPUR, A.; HASKOVIĆ, A.; ČOPRA-JANIĆIJEVIĆ, A.; KLEPO, L.; TOPČAGIĆ, A.; TAHIROVIĆ, I.; SOFIĆ, E. Spectrophotometric analysis of total ascorbic acid content in various fruits and vegetables. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, v. 38, p. 39-42 2012.

KAWANO, K.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T.; MAITANI, Y. Preparation and pharmacokinetics of pirarubicin loaded dehydration-rehydration vesicles. *Int J Pharm*, v. 252, p. 73-9, 2003.

KIRBY, C.; GREGORIADIS, G. Dehydration-Rehydration Vesicles: A Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes. **Nat Biotech**, v. 2, p. 979-984, 1984.

KISHIMOTO, Y.; SAITO, N.; KURITA, K.; SHIMOKADO, K.; MARUYAMA, N.; ISHIGAMI, A. Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, p. 579-584, 2013.

KLIMCZAK, I.; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. **Food Chemistry**, v. 175, p. 100-105, 2015.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol**, v. 30, p. 620-50, 2002.

KWAKYE, J. K. The use of stabilizers in the UV assay of ascorbic acid. **Talanta**, v. 51, p. 197-200, 2000.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, p. 12-21, 2013.

LIAN, T.; HO, R. J. Trends and developments in liposome drug delivery systems. **J Pharm Sci**, v. 90, p. 667-80, 2001.

LINSTER, C. L.; VAN SCHAFTINGEN, E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. **Febs j**, v. 274, p. 1-22, 2007.

LUCEY, P.; GOLDBERG, D. J. Complications of collagen fillers. **Facial Plast Surg**, v. 30, p. 615-22, 2014.

LYNCH, S.; GAZIANO, J. M.; FREI, B. Ascorbic Acid and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. In: HARRIS, J. R. (Ed.). **Subcellular Biochemistry**: Springer US, v.25, 1996. cap. 17, p.331-367. (Subcellular Biochemistry). ISBN 978-1-4613-7998-0.

MAIA, A. M.; BABY, A. R.; PINTO, C. A. S. O.; YASAKA, W. J.; SUENAGA, E.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Influence of sodium metabisulfite and glutathione on the stability of vitamin C in O/W emulsion and extemporaneous aqueous gel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 322, p. 130-135, 2006.

MANDL, J.; SZARKA, A.; BANHEGYI, G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. **Br J Pharmacol**, v. 157, p. 1097-110, 2009.

MANELA-AZULAY, M.; BAGATIN, E. Cosmeceuticals vitamins. **Clin Dermatol**, v. 27, p. 469-74, 2009.

MANOSROI, A.; KONGKANERAMIT, L.; MANOSROI, J. Stability and transdermal absorption of topical amphotericin B liposome formulations. **Int J Pharm**, v. 270, p. 279-86, 2004.

MATEI, N.; RADU, G.-L.; TRUICA, G.; EREMIA, S.; DOBRINAS, S.; STANCIU, G.; POPESCU, A. Rapid HPLC method for the determination of ascorbic acid in grape samples. **Analytical Methods**, v. 5, p. 4675-4679, 2013.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54 Suppl 1, p. S3-17, 2002.

MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **Int J Pharm**, v. 435, p. 3-9, 2012.

MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration I. Lotion dosage form. **Life Sciences**, v. 26, p. 1473-1477, 1980.

MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clin Dermatol**, v. 19, p. 489-501, 2001.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 52, p. 103-12, 2001.

MUFAMADI, M. S.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E.; DU TOIT, L. C.; MODI, G.; NAIDOO, D.; NDESENDO, V. M. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. **J Drug Deliv**, v. 2011, p. 1-19, 2011.

MUGABE, C.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, p. 269-71, 2005.

MUGABE, C.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide antibiotics. **Int J Pharm**, v. 307, p. 244-50, 2006.

MUPPIDI, K.; PUMERANTZ, A. S.; WANG, J.; BETAGERI, G. Development and stability studies of novel liposomal vancomycin formulations. **ISRN Pharm**, v. 2012, p. 636743, 2012.

NISHIKIMI, M.; FUKUYAMA, R.; MINOSHIMA, S.; SHIMIZU, N.; YAGI, K. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. **J Biol Chem**, v. 269, p. 13685-8, 1994.

NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P.; SOLICHOVÁ, D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 942-958, 2008.

NOVÁKOVÁ, L.; SOLICHOVÁ, D.; PAVLOVIČOVÁ, S.; SOLICH, P. Hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic acid. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 1634-1644, 2008.

NUSGENS, B. V.; HUMBERT, P.; ROUGIER, A.; COLIGE, A. C.; HAFTEK, M.; LAMBERT, C. A.; RICHARD, A.; CREIDI, P.; LAPIERE, C. M. Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. **J Invest Dermatol**, v. 116, p. 853-9, 2001.

NUSGENS, B. V.; HUMBERT, P.; ROUGIER, A.; RICHARD, A.; LAPIERE, C. M. Stimulation of collagen biosynthesis by topically applied vitamin C. **European Journal of Dermatology**, v. 12, p. 32-34, 2002.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method**. 2004. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org>. Acesso em: 5 de janeiro de 2016.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guidance notes on dermal absorption**. 2011. Disponível em: <http://www.oecd.org>. Acesso em: 16 de janeiro de 2016.

OGISO, T.; YAMAGUCHI, T.; IWAKI, M.; TANINO, T.; MIYAKE, Y. Effect of positively and negatively charged liposomes on skin permeation of drugs. **J Drug Target**, v. 9, p. 49-59, 2001.

OHNO, S.; OHNO, Y.; SUZUKI, N.; SOMA, G.-I.; INOUE, M. High-dose Vitamin C (Ascorbic Acid) Therapy in the Treatment of Patients with Advanced Cancer. **Anticancer Research**, v. 29, p. 809-815, 2009.

PADAYATTY, S. J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J. H.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S. K.; LEVINE, M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **J Am Coll Nutr**, v. 22, p. 18-35, 2003.

PANICH, U.; TANGSUPA-A-NAN, V.; ONKOKSOONG, T.; KONGTAPHAN, K.; KASETSINSOMBAT, K.; AKARASEREENONT, P.; WONGKAJORN SILP, A. Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system. **Arch Pharm Res**, v. 34, p. 811-20, 2011.

PHILLIPS, C. L.; COMBS, S. B.; PINNELL, S. R. Effects of ascorbic acid on proliferation and collagen synthesis in relation to the donor age of human dermal fibroblasts. **J Invest Dermatol**, v. 103, p. 228-32, 1994.

PHILLIPS, C. L.; TAJIMA, S.; PINNELL, S. R. Ascorbic acid and transforming growth factor-beta 1 increase collagen biosynthesis via different mechanisms: coordinate regulation of pro alpha 1(I) and Pro alpha 1(III) collagens. **Arch Biochem Biophys**, v. 295, p. 397-403, 1992.

PINNELL, S. R.; YANG, H.; OMAR, M.; MONTEIRO-RIVIERE, N.; DEBUYS, H. V.; WALKER, L. C.; WANG, Y.; LEVINE, M. Topical L-ascorbic acid: percutaneous absorption studies. **Dermatol Surg**, v. 27, p. 137-42, 2001.

PISOSCHI, A. M.; DANET, A. F.; KALINOWSKI, S. Ascorbic Acid Determination in Commercial Fruit Juice Samples by Cyclic Voltammetry. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, v. 2008, p. 1-8, 2008.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, p. 470-91, 2011.

PURI, A.; LOOMIS, K.; SMITH, B.; LEE, J.-H.; YAVLOVICH, A.; HELDMAN, E.; BLUMENTHAL, R. Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 26, p. 523-580, 2009.

RAGHU, V.; PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Comparison of ascorbic acid content of *Emblica officinalis* fruits determined by different analytical methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 529-533, 2007.

RAI, V.; GHOSH, I.; BOSE, S.; SILVA, S. M. C.; CHANDRA, P.; MICHNIAK-KOHN, B. A transdermal review on permeation of drug formulations, modifier compounds and delivery methods. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 20, p. 75-88, 2010.

REBOUCHE, C. J. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 1147S-1152S, 1991.

ROSA, J. S. D.; GODOY, R. L. D. O.; OIANO NETO, J.; CAMPOS, R. D. S.; MATTA, V. M. D.; FREIRE, C. A.; SILVA, A. S. D.; SOUZA, R. S. D. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 27, p. 837-846, 2007.

SANTIS, A. K.; DE FREITAS, Z. M.; RICCI-JUNIOR, E.; DE BRITO-GITIRANA, L.; FONSECA, L. B.; SANTOS, E. P. Nifedipine in semi-solid formulations for topical use in peripheral vascular disease: preparation, characterization, and permeation assay. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 39, p. 1098-106, 2013.

SAUERMAN, K.; JASPERS, S.; KOOP, U.; WENCK, H. Topically applied vitamin C increases the density of dermal papillae in aged human skin. **BMC Dermatology**, v. 4, p. 1-6, 2004.

SCHNEIDER, T.; SACHSE, A.; RÖBLING, G.; BRANDL, M. Generation of contrast-carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 117, p. 1-12, 1995.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 123-140, 1997.

SHRIVAS, K.; AGRAWAL, K.; PATEL, D. K. A Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 52, p. 503-506, 2005.

SILVA, F. O. Total ascorbic acid determination in fresh squeezed orange juice by gas chromatography. **Food Control**, v. 16, p. 55-58, 2005.

SINICO, C.; MANCONI, M.; PEPPI, M.; LAI, F.; VALENTI, D.; FADDA, A. M. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle–skin interaction. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 123-136, 2005.

SMITH, L. T.; HOLBROOK, K. A.; MADRI, J. A. Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. **Am J Anat**, v. 175, p. 507-21, 1986.

STAMFORD, N. P. Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. **J Cosmet Dermatol**, v. 11, p. 310-7, 2012.

TAJIMA, S.; PINNELL, S. R. Ascorbic acid preferentially enhances type I and III collagen gene transcription in human skin fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v. 11, p. 250-253, 1996.

TEUCHER; OLIVARES; CORI. Enhancers of Iron Absorption: Ascorbic Acid and other Organic Acids. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 74, p. 403-419, 2004.

TIWARI, S.; VERMA, S. K.; AGRAWAL, G. P.; VYAS, S. P. Viral protein complexed liposomes for intranasal delivery of hepatitis B surface antigen. **Int J Pharm**, v. 413, p. 211-9, 2011.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, p. 145-60, 2005.

TORCHILIN, V. P. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. **Handb Exp Pharmacol**, p. 3-53, 2010.

TOUITOU, E.; ALKABES, M.; MEMOLI, A.; ALHAIQUE, F. Glutathione stabilizes ascorbic acid in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 133, p. 85-88, 1996.

TRAIKOVICH, S. S. Use of topical ascorbic acid and its effects on photodamaged skin topography. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 125, p. 1091-8, 1999.

TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 19, p. 106-21, 2006.

UCHINO, T.; LEFEBER, F.; GOORIS, G.; BOUWSTRA, J. Characterization and skin permeation of ketoprofen-loaded vesicular systems. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 86, p. 156-66, 2014.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin:

a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 55, p. 271-7, 2003.

VERMEIR, S.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; SCHENK, A.; BEULLENS, K.; NICOLAÏ, B. M.; LAMMERTYN, J. Evaluation and optimization of high-throughput enzymatic assays for fast l-ascorbic acid quantification in fruit and vegetables. **Analytica Chimica Acta**, v. 618, p. 94-101, 2008.

WARNER, R. R.; STONE, K. J.; BOISSY, Y. L. Hydration Disrupts Human Stratum Corneum Ultrastructure. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, p. 275-284, 2003.

WEINER, N.; WILLIAMS, N.; BIRCH, G.; RAMACHANDRAN, C.; SHIPMAN, C.; FLYNN, G. Topical delivery of liposomally encapsulated interferon evaluated in a cutaneous herpes guinea pig model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 1217-1221, 1989.

WHITE, P. J.; FOGARTY, R. D.; MCKEAN, S. C.; VENABLES, D. J.; WERTHER, G. A.; WRAIGHT, C. J. Oligonucleotide uptake in cultured keratinocytes: influence of confluence, cationic liposomes, and keratinocyte cell type. **J Invest Dermatol**, v. 112, p. 699-705, 1999.

WINTERGERST, E. S.; MAGGINI, S.; HORNIG, D. H. Immune-Enhancing Role of Vitamin C and Zinc and Effect on Clinical Conditions. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 50, p. 85-94, 2006.

XU, X.; KHAN, M. A.; BURGESS, D. J. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: II. Screening of critical variables, and establishment of design space at laboratory scale. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 543-553, 2012.

YAN, K. S.; YAN, T. X.; GUO, H.; LI, J. Z.; WEI, L. L.; WANG, C.; NIE, S. F.; PAN, W. S. Evaluation of transdermal permeability of pentoxifylline gel: in vitro skin permeation and in vivo microdialysis using Wistar rats. **Drug Discov Ther**, v. 1, p. 78-83, 2007.

ZADI, B.; GREGORIADIS, G. A Novel Method for High-Yield Entrapment of Solutes into Small Liposomes. **Journal of Liposome Research**, v. 10, p. 73-80, 2000.

ZHOU, W.; LIU, W.; ZOU, L.; LIU, W.; LIU, C.; LIANG, R.; CHEN, J. Storage stability and skin permeation of vitamin C liposomes improved by pectin coating. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 117, p. 330-7, 2014.