

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Pedro Paulo Soldati

**Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando manteiga natural para
aplicação tópica**

**Juiz de Fora
2015**

Pedro Paulo Soldati

Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando manteiga natural para aplicação tópica

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Saúde.

Orientadora: Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo
Co-orientador: Dr. Frederico Pittella Silva

Juiz de Fora
2015

Pedro Paulo Soldati

Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando manteiga natural para aplicação tópica

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Saúde.

Aprovada em ___ de _____ de 2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo – Orientadora/ Presidente da Banca
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Adny Henrique Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Àquelas que me tem em prosa, poesia e verso: Elenir, Laura e Sarah.

AGRADECIMENTOS

Expresso meus mais sinceros e profundos agradecimentos à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, por me receber como aluno e aprovar a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, essencial para a dedicação exclusiva a este trabalho.

À professora orientadora Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo, que me iniciou na carreira científica e sempre me inspirou como exemplo de dedicação e sabedoria. Agradeço pelo aceite em me orientar, pela amizade, ensinamentos e confiança em mim depositada e por todo o apoio na realização deste sonho.

Ao professor co-orientador Dr. Frederico Pittella, pela amizade, ensinamentos e toda a convivência. Por sempre ser solícito às minhas dúvidas e por toda a orientação nos experimentos realizados. Muito obrigado pela ajuda!

Ao professor Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão e aos membros da Ortofarma, parceira científica que, na figura do MSc. Anderson Oliveira, colaboraram com a etapa analítica por cromatografia líquida deste trabalho.

Ao Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas da Universidade Federal de Santa Catarina, na figura da professora Dra. Tânia Pasa, pelo apoio na realização deste projeto. A Milene, Gabriela e Tatiane pela ajuda nos experimentos com cultura celular, e ao Jelder, pela realização das análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Aos amigos e colegas (que já passaram e que permanecem) do Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), que fizeram parte de minha rotina desde os tempos de iniciação científica. Em especial, ao Hudson Polonini, por ser um grande amigo e sempre me auxiliar e orientar nos experimentos realizados; a Camila Quinetti, pela amizade, convivência e pelos ensinamentos de cultura celular; aos alunos Alexandre, Bárbara, Bruna, Carolina e Paula por todo auxílio nos experimentos com o preparo e caracterização das nanopartículas e com os estudos em cultura celular; a Priscila Almeida, companheira de mestrado, pela paciência e suporte nas corridas cromatográficas. E mais aqueles que contribuíram de alguma forma no desenvolvimento do projeto: César, Edilene, Francislene, Michele, Jordana, Hanny, Kézia, Renata, Samara, Stephane.

Aos colegas e amigos que conquistei durante a minha vivência na Faculdade de Farmácia da UFJF, que tornaram a realização deste trabalho mais agradável e que de alguma forma cooperaram com os meus objetivos. Camila, Felipe, Lucas, Luiz Fernando, Pedro Pôssa, Pillar, Samuel, apesar dos caminhos da vida nos distanciarem um pouco, a amizade e o carinho sempre continuam.

Aos colegas do setor de Tecnologia Cosmética Avançada da Natura: Ana Paula, Carla, Daniela, Luciana, Fabiola, Juliana, Fernanda e Tuanny por todo auxílio, conhecimento, incentivo e agradável convivência.

Aos meus irmãos Laura, Eliana e Gil e, sobretudo, à minha mãe, Elenir, que me incentivaram e batalharam espartanamente para que eu lutasse pelos meus sonhos e concretizasse este trabalho, contribuindo sempre com recursos tangíveis e intangíveis. Ao meu anjo da guarda, papai Cleber, por cuidar de mim e estar presente em todos os momentos da minha vida. Saber que sempre poderia contar com vocês foi o que me manteve focado neste projeto.

À Sarah, pelo carinho, paciência e incentivo singular. Por entender toda a dedicação e me apoiar na realização deste sonho. Obrigado por estar sempre presente e pelo grande amor!

“...Ouça: ‘A maioria dos homens não quer nadar antes que o possa fazer’.
Não é engraçado? Naturalmente, não querem nadar.
Nasceram para andar na terra e não para a água.
E, naturalmente, não querem pensar: foram criados para viver e não para pensar! Isto mesmo!
E quem pensa, quem faz do pensamento sua principal atividade,
pode chegar muito longe com isso...”

Hermann Hesse

RESUMO

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram preparadas utilizando como fração lipídica a manteiga natural extraída das sementes de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) para a liberação controlada de resveratrol visando a aplicação tópica. A manteiga natural foi avaliada por cromatografia gasosa para a identificação e quantificação dos principais componentes lipídicos, mostrando equilibrada composição entre ácidos graxos saturados e insaturados. As NLS foram preparadas pela técnica de homogeneização por alto cisalhamento e apresentaram tamanho de partícula na escala manométrica, com uma distribuição homogênea da dispersão, confirmada pelas técnicas de espalhamento dinâmico de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Suas características físico-químicas, como carga superficial negativa, tamanho e índice de polidispersão, mantiveram-se inalteradas durante 30 dias, indicando boa estabilidade coloidal. O estudo de liberação *in vitro* utilizando células de difusão de Franz demonstraram uma liberação controlada do ativo, apresentando uma cinética de liberação controlada pela difusão do núcleo lipídico, de acordo com o modelo de Higuchi. A NLS contendo o resveratrol (R-NLS) apresentou um aumento de 20% na atividade antioxidante em comparação com a solução etanólica de resveratrol (SER). O estudo de penetração cutânea, utilizando pele humana proveniente de abdominoplastia, indicou que a R-NLS aumentou a penetração e retenção do ativo nas camadas mais externas da pele, com um acréscimo de 2 vezes no estrato córneo quando comparado com a SER. Além disso, a NLS desenvolvida mostrou-se segura, visto que não apresentou citotoxicidade em linhagem de queratinócitos humanos. Por isso, o sistema de NLS preparado utilizando manteiga natural é capaz de promover uma liberação segura e controlada do ativo na pele, sendo promissor para sua utilização em formulações tópicas.

Unitermos: Resveratrol, antioxidante, manteiga natural, liberação controlada, nanopartículas lipídicas sólidas.

ABSTRACT

Solid lipid nanoparticles (SLN) based on natural seed butter extracted from Amazon tree *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) were prepared for the topical controlled release of resveratrol, a well-known lipophilic antioxidant. The natural butter was assessed by gas chromatography for the identification and quantification of the lipids, showing saturated and unsaturated fatty acids as the major constituents. Nanoparticles were then prepared by high shear homogenization and presented small particle size, with narrow size distribution, which was confirmed by dynamic light scattering measurements and transmission electronic microscopy images. The negative surface charge, size and polydispersity index remained unaltered for 30 days, indicating good colloidal stability. Moreover, the controlled release kinetics revealed a burst release followed by a sustained drug release from SLNs containing resveratrol (R-SLN), which fitted the Higuchi mathematical model, indicating that the releasing profile from the lipid core is diffusion-controlled. R-SLN showed an increased antioxidant activity in 20% compared to resveratrol ethanolic solution (RES). When applied to human skin, R-SLN increased the permeation and retention of resveratrol in the human skin, raising the amount of resveratrol over than 2-fold in stratum corneum compared to RES. In addition, there was no cytotoxicity of the SLN to human keratinocytes at tested conditions. This new SLN prepared with natural seed butter was able to permeate and deliver hydrophobic actives to the skin in a controlled manner, having the potential to ultimately be used in formulations that request topical delivery.

Keywords: Resveratrol, antioxidant, natural seed butter, controlled release, solid lipid nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da pele e seus componentes.....	17
Figura 2 – Estrutura da epiderme.....	19
Figura 3 – Rota biossintética do resveratrol.....	24
Figura 4 – Isômeros estruturais do resveratrol.....	25
Figura 5 – Descrição gráfica das publicações relacionadas ao resveratrol entre os anos de 1940 a 2014.....	26
Figura 6 – Locais para a entrega de princípios ativos por meio de nanopartículas através da pele.....	31
Figura 7 – Representação esquemática de diferentes sistemas carreadores de ativos.....	33
Figura 8 – Estrutura do Pluronic® F-127.....	34
Figura 9 – Formação do filme oclusivo de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) na pele.....	39
Figura 10 – Fruto e polpa de <i>Theobroma grandiflorum</i> (cupuaçu).....	40
Figura 11 – Capacidade de retenção de água.....	41
Figura 12 – Preparo das nanopartículas lipídicas sólidas por meio da técnica de homogeneização à quente empregando alto cisalhamento.....	46
Figura 13 – Perfil cromatográfico da manteiga de <i>Theobroma grandiflorum</i> (cupuaçu).....	55
Figura 14 – Cromatogramas obtidos para o resveratrol, utilizando-se o método previamente desenvolvido para quantificação do mesmo, evidenciando sua especificidade e a não interferência no método dos componentes da nanopartícula lipídica sólida.....	58
Figura 15 – Aspecto visual e histogramas de intensidade do tamanho de partícula das nanopartículas lipídicas sólidas.....	59
Figura 16 – Representação esquemática e microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula lipídica sólida (NLS) desenvolvida.....	61
Gráfico 1 – Atividade antioxidante de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) utilizando o método do DPPH.....	64
Gráfico 2 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> do resveratrol.....	66
Gráfico 3 – Penetração cutânea <i>ex vivo</i> do resveratrol.....	69

Gráfico 4 – Viabilidade <i>in vitro</i> de queratinócitos humanos após tratamento com resveratrol e nanopartículas lipídicas sólidas.....	71
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Patentes encontradas na quais constam a incorporação do resveratrol em formulações.....	29
Tabela 2 – Composição das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo resveratrol.....	46
Tabela 3 – Composição do meio receptor biorelevante utilizado para estudos de cinética de liberação <i>in vitro</i> do resveratrol.....	49
Tabela 4 – Composição química da manteiga de <i>Theobroma grandiflorum</i> (cupuaçu).....	56
Tabela 5 – Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).....	60
Tabela 6 – Avaliação da estabilidade a curto prazo das nanopartículas lipídicas sólidas controle (C-NLS) e contendo resveratrol (R-NLS), armazenadas a 4 °C por 0, 7, 15 e 30 dias.....	63
Tabela 7 – Modelos matemáticos utilizados para a determinação do perfil de cinética de liberação <i>in vitro</i> do resveratrol das nanopartículas lipídicas sólidas (R-NLS).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquídico
ACN	Acetonitrila
AE	Ácido esteárico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	Ácido oléico
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i> (Câncer de mama 1)
CG-AR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
C-NLS	Nanopartícula lipídica sólida controle
CE ₅₀	Concentração efetiva que inibe 50%
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Meio de Cultura Eagle's Modificado)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento dinâmico de luz)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC	Estrato Córneo
EE	Eficiência de encapsulação
EP + D	Epiderme viável + Derme
EROs	Espécies reativa de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organização Internacional para Padronização)
J _s	Fluxo em estado estacionário
LQ	Limite de Quantificação
T _L	Tempo de Latência
M	Molar
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NIQUA	Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica
NLS	Nanopartícula lipídica sólida
Nrf2	<i>Nuclear factor-like2</i> (Fator nuclear – tipo 2)

PdI	<i>Polidispersion Index</i> (Índice de Polidispersão)
PZ	Potencial zeta
RE	Resolução
R-NLS	Nanopartícula lipídica sólida contendo resveratrol
RUV	Radiação ultravioleta
SER	Solução etanólica de resveratrol
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i> (Sirtuina 1)
TP	Tamanho de partícula
t _R	Tempo de retenção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	155
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 ESTRUTURA DA PELE	17
2.1.1 Epiderme.....	18
2.1.2 Derme	20
2.1.3 Hipoderme	21
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO	21
2.2.1 Radicais livres	21
2.2.2 Estresse oxidativo e agentes antioxidantes	22
2.3 RESVERATROL.....	23
2.4 NANOTECNOLOGIA.....	30
2.4.1 Nanopartículas lipídicas sólidas	32
2.4.2 Técnicas de preparo de nanopartículas lipídicas sólidas	34
2.4.2.1 Homogeneização por alta pressão	35
2.4.2.2 Microemulsão	35
2.4.2.3 Ultrassonicação.....	35
2.4.3 Métodos para caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas	36
2.4.3.1 Tamanho de partícula	36
2.4.3.2 Potencial zeta.....	37
2.4.3.3 Avaliação morfológica	38
2.4.3.4 Eficiência de encapsulação	38
2.4.4 Nanopartículas lipídicas sólidas para aplicação tópica.....	39
2.5 THEOBROMA GRANDIFLORUM	39
3 HIPÓTESE.....	42
4 OBJETIVOS	43
4.1 Geral	43
4.2 Específicos	43
5 MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1 REAGENTES E MATERIAIS.....	44
5.2 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	44
5.2.1 Cromatografia gasosa	44
5.2.2 Quantificação do resveratrol por CLAE.....	45
5.3 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	45
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	47
5.4.1 Caracterização físico-química	47
5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	47
5.4.3 Eficiência de encapsulação	47
5.4.4 Estudo de estabilidade	48
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	48
5.6 PERFIL E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	49
5.7 PENETRAÇÃO CUTÂNEA <i>EX VIVO</i>	51
5.7.1 Pele humana.....	51
5.7.2 Estudo de penetração cutânea <i>ex vivo</i>	51
5.7.3 Retenção do resveratrol na pele.....	52

5.8 CULTIVO CELULAR	52
5.8.1 Ensaio de viabilidade celular.....	53
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	55
6.1.1 Composição química da manteiga de cupuaçu.....	55
6.1.2 Quantificação do resveratrol por CLAE.....	57
6.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	58
6.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	61
6.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE	62
6.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	64
6.6 ESTUDOS DE PERFIL E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	65
6.7 ESTUDOS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA <i>EX VIVO</i>	68
6.8 VIABILIDADE CELULAR	70
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	90
APÊNDICE A – Produção científica	92
APÊNDICE B – Resumo publicado em Anais de eventos	97
APÊNDICE C – Trabalho apresentado	98

1 INTRODUÇÃO

O metabolismo celular gera espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o processo oxidativo, desencadeado pela cadeia respiratória de elétrons. Porém, o excesso de EROs causa danos em estruturas celulares, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, envolvendo-se em diversas condições patológicas, incluindo aquelas que acometem a pele (PACKER; CADENAS, 2007). Além disso, processos externos podem causar agressões à pele, ocasionando o estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos em estruturas dérmicas. Como um mecanismo de defesa, o corpo gera antioxidantes endógenos para conter e prevenir tais danos e antioxidantes exógenos são comumente administrados pela via oral ou tópica para reforçar a proteção ao organismo (NDIAYE et al., 2011; NATARAJAN et al., 2014).

O resveratrol é um composto polifenólico encontrado principalmente em uvas, amendoins e outras frutas presentes na dieta humana (AMRI et al., 2012). É uma molécula lipofílica e instável, com atividades antioxidante, anti-inflamatória e cardioprotetora (BAUR; SINCLAIR, 2006). Quando aplicado topicamente, o resveratrol apresenta outras propriedades importantes, como: i) efeito quimiopreventivo contra o câncer de pele (AZIZ; AFAQ; AHMAD, 2005), ii) protege a pele contra o estresse oxidativo e exposição à radiação ultravioleta (RUV) (IDO et al., 2015; POLONINI et al., 2013); e iii) efeitos antibacterianos (CHAN, 2002). No entanto, em virtude de sua instabilidade, seu emprego em formas farmacêuticas é limitada, necessitando do desenvolvimento de sistemas inovadores para a proteção do ativo (RODRÍGUEZ-CABO et al., 2015).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), devido às suas propriedades físico-químicas e biológicas, como pequeno tamanho e biocompatibilidade, são capazes de proteger ativos da degradação e, ao mesmo tempo, controlar sua liberação no sítio de ação, aumentando a eficácia dos mesmos (WANG et al., 2015). Conceitualmente, NLS são dispersões coloidais preparadas com lipídeos sólidos (0,1% a 30,0%, m/ m) dispersos em um meio aquoso e estabilizados por surfactantes (0,5% a 5,0%, m/ m), podendo ser produzidas em larga escala sem a utilização de solventes orgânicos (HOU et al., 2003; JESUS; ZUHORN, 2015).

Como principal classe de lipídeos utilizada no preparo de NLS para o desenvolvimento de sistemas tópicos, os ácidos graxos são capazes de alterar a fluidez da pele, permitindo a penetração das nanopartículas (NP) em sítios específicos da pele (ZHAI; ZHAI, 2014). Como alternativa ao uso de lipídeos sintéticos, manteigas naturais apresentam uma alternativa inovadora e atrativa para o preparo de NLS (MANDAWGADE; PATRAVALE, 2008; SODDU et al., 2014). Por apresentarem uma composição balanceada de lipídeos, as

manteigas naturais são capazes de produzir núcleos com a estrutura cristalina imperfeita, que auxilia numa maior encapsulação do ativo (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012).

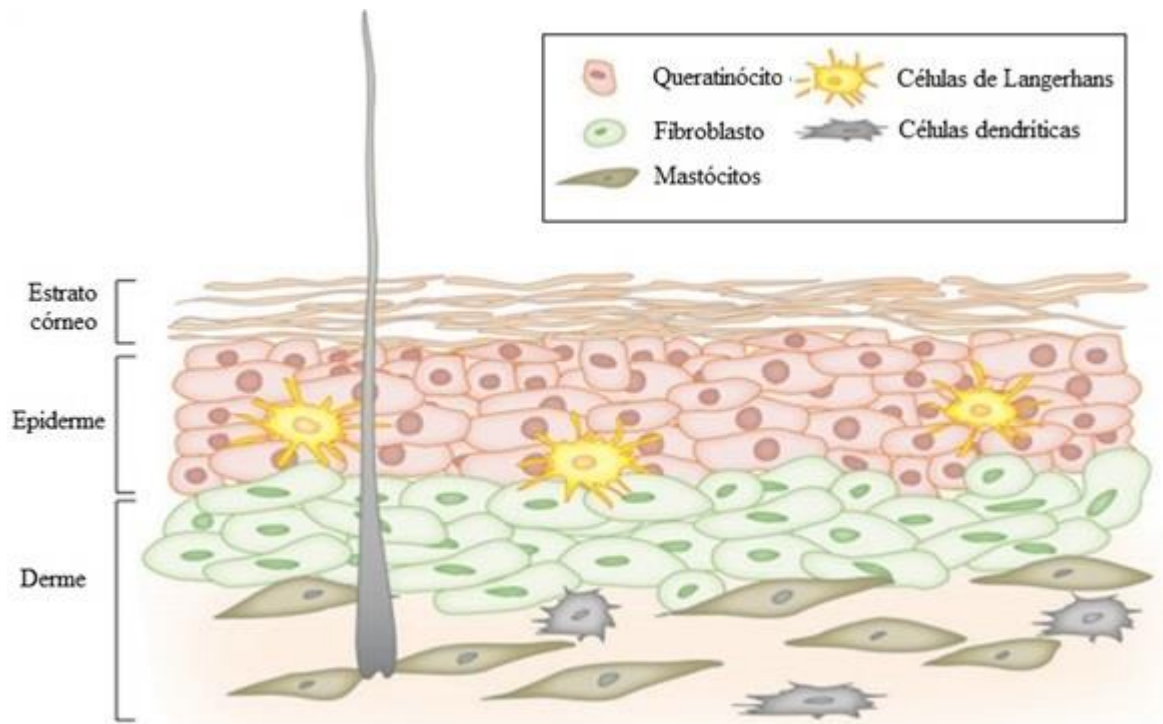
No presente trabalho, desenvolveu-se sistemas inovadores baseados em NLS contendo manteiga natural como a fração lipídica para o encapsulamento de resveratrol, a fim de promover uma liberação controlada do mesmo na pele, aumentando sua penetração neste local e potencializando sua atividade antioxidante. Para tanto, utilizou-se como sistema lipídico a manteiga de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) para o desenvolvimento desse novo sistema. Os componentes da manteiga foram analisados previamente ao preparo da NLS, a fim de padronizar o material utilizado. NLS contendo resveratrol (R-NLS) e a NLS controle (C-NLS), sem ativo, foram preparadas pela técnica de homogeneização à quente utilizando alto cisalhamento e ultrassom e caracterizadas quanto ao seu tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia e estabilidade a curto prazo. A cinética de liberação do resveratrol a partir da R-NLS, sua atividade antioxidante, penetração na pele humana *ex vivo* e o estudo de viabilidade celular foram realizados para predizer a eficácia e segurança do nanocarreador desenvolvido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRUTURA DA PELE

A pele recobre as superfícies corporais e constitui o maior e mais acessível órgão do corpo humano – com uma área superficial de aproximadamente 1,2 m² e espessura menor do que 2 mm, representando 16% do peso corporal. Por essas dimensões, proporciona uma excelente e desafiadora interface para a administração de fármacos (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004; THOMAS; FINNIN, 2004). Apesar de sua espessura variar de acordo com as diferentes partes do corpo, a estrutura fundamental da pele é basicamente a mesma (Figura 1). Anatomicamente, a pele é formada pela epiderme, de origem ectodérmica, e derme, de origem mesodérmica. Em contato com a derme encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo, que não faz parte da pele propriamente dita, apenas a une aos órgãos subjacentes. Complementando sua formação, há os folículos pilosos, unhas e glândulas, que são chamados de anexos (KANIKATIS, 2002).

Figura 1 – Estrutura da pele e seus componentes.



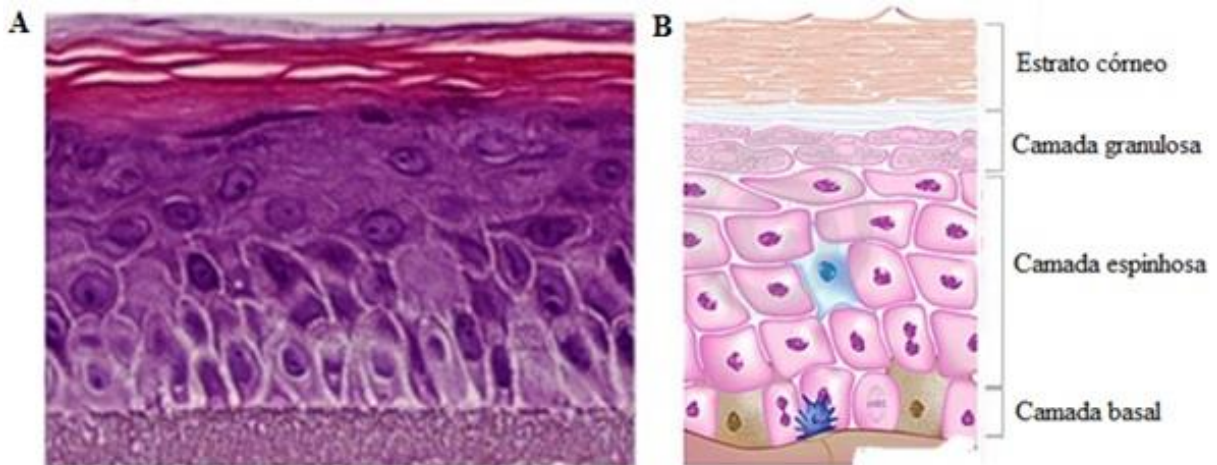
Fonte: adaptado de KARANDE; MITRAGOTRI, 2010.

As funções desempenhadas pela pele são múltiplas, sendo a principal a de proteção contra o atrito e a perda de água. Isso significa que a pele naturalmente apresenta uma baixa permeabilidade para a penetração de moléculas externas, protegendo os tecidos subjacentes de infecções, desidratação e estresse físico e químico (KWON et al., 2015). Ela também participa de outras funções no organismo, como: i) participa da termorregulação do organismo por meio de seus capilares sanguíneos, tecido adiposo e glândulas; ii) colabora na excreção de substâncias pelo suor; iii) protege contra os raios ultra-violeta, devido à melanina produzida localmente; iv) aliada à radiação solar, transforma precursores sintetizados no organismo em vitamina D₃; e v) envia informações sensoriais sobre o ambiente para o sistema nervoso central (BARUA; MITRAGOTRI, 2014; BARRY, 2001; VILLARINO, LANDONI, 2006).

2.1.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa da pele, da porção mais interna à superfície; divide-se em subcamadas, sendo: camada basal, estrato espinhoso, granuloso e córneo (Figura 2). É constituída histologicamente por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e sua principal função é a produção de queratina, proteína responsável pela impermeabilidade da pele e prevenção da evaporação de água da superfície corporal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). As células que a compõem podem ser divididas em corneócitos, também chamados de queratinócitos, e não-corneócitos. Os não-corneócitos são: os melanócitos, que produzem o pigmento melanina, que dá cor à pele; as células de Langerhans, que fazem parte do sistema imunológico na função de células apresentadoras de antígenos, tendo papel relevante nas reações imunológicas locais, além de conterem a proliferação dos corneócitos; e as células de Merkel, que funcionam como nociceptores, sendo responsáveis pelo tato e pela transmissão de impulsos nervosos de dor através de sua ligação com fibras nervosas (VILLARINO; LANDONI, 2006). Os corneócitos, por sua vez, são células achatadas, mortas, sem núcleo e que possuem citoplasma rico em queratina, que é uma proteína do filamento intermediário e amorfa que confere à epiderme sua grande resistência e impermeabilidade. De fato, eles são assim chamados por serem células que se diferenciaram com a função única de sintetizar queratina (JOHANSSON; HEADON, 2014).

Figura 2 – Estrutura da epiderme.



(A) Epiderme humana reconstituída e (B) imagem ilustrativa das camadas celulares correspondentes.

Fonte: adaptado de BARUA; MITRAGOTRI, 2014.

A camada basal apresenta intensa atividade mitótica, sendo responsável pela constante renovação da epiderme, por meio de um deslocamento celular permanente e repetido, que ocorre entre 20 a 30 dias. As células produzidas nesta camada se diferenciam à medida que avançam para a superfície, apresentando um acúmulo gradual de filamentos intermediários de queratina. Em média, um queratinócito basal leva duas semanas para se tornar um queratinócito córneo; o mesmo período de tempo é utilizado para que o mesmo se desprenda da pele em um processo de descamação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A camada espinhosa é constituída por células poligonais cubóides ou ligeiramente achatadas que apresentam expansões citoplasmáticas. Estes prolongamentos citoplasmáticos se aproximam e mantêm as células unidas por meio de desmossomos, estruturas com função importante na manutenção da coesão das células da epiderme e na sua resistência ao atrito (KANIKATIS, 2002).

A camada granulosa é caracterizada pela presença de células poligonais achatadas, que produzem grânulos de querato-hialina e grânulos envolvidos por membrana de substância fosfolipídica associada à glicosaminoglicanas, o que confere a esta camada impermeabilidade à água e outras substâncias, prevenindo a desidratação das camadas subjacentes da epiderme (BAUMANN, 2004). A camada mais superficial da epiderme é o EC, a principal barreira para a passagem de substâncias químicas para o interior do organismo. Ele é constituído por uma estrutura hierárquica composta de 10 a 15 camadas de corneócitos embebidos em uma matriz rica de lipídeos intercelulares. Um modelo proposto para elucidar sua estrutura é chamado de “modelo dos tijolos e cimento”, pois histologicamente esta camada assemelha-se a um muro.

Neste modelo, os tijolos seriam os corneócitos e o cimento seria a chamada bicamada lipídica intercelular, que é composta por ceramidas, ácidos graxos, colesterol e ésteres de colesterol (CEVC, 2004; PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004; ZHAI; ZHAI, 2014). Além desta bicamada, há ainda os corneodesmossomos, que unem os corneócitos e proporcionam estabilidade estrutural. Isto confere enorme força de coesão à estrutura, o que inviabiliza que a maior parte das moléculas, independentemente de seu tipo, a atravesse (BARRY, 2001; PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004; VILLARINO; LANDONI, 2006).

Esta camada constitui o principal empecilho para a penetração efetiva de fármacos pela via tópica e/ ou transdérmica, visto que a tortuosidade de suas células e sua adesão são obstáculos de difícil transposição (PANDO et al., 2015). Além disso, este é um estrato que é continuamente renovado, devido à grande quantidade de células-tronco epiteliais na camada basal da epiderme, que provê queratinócitos substitutos num período de duas a quatro semanas (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004; VILLARINO; LANDONI, 2006).

2.1.2 Derme

A derme é composta de tecido conjuntivo e serve de apoio para a epiderme, atuando como elo entre esta e a hipoderme. A presença de colágeno proporciona características de durabilidade e elasticidade à pele e as fibras de elastina conferem propriedades de recuo elástico. Ela é ricamente vascularizada e inervada e, ainda, possui grande quantidade de vasos linfáticos. Além destas estruturas, é na derme que se encontram os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, apesar de estes serem considerados anexos epidérmicos, por terem a mesma origem embriológica (BAUMANN, 2004; VILLARINO; LANDONI, 2006).

Os folículos pilosos são formados de uma invaginação da epiderme e são onde se inserem os pêlos, que se projetam para a superfície externa do corpo. As glândulas sebáceas são glândulas holócrinas, ou seja, a formação da secreção advém da morte de suas células constituintes. Elas têm ductos que desembocam nos folículos pilosos e secretam uma mistura de lipídeos que contém triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e ésteres de colesterol. Já as glândulas sudoríparas são merócrinas, ou seja, liberam grânulos sem perda de outro material celular, e secretam a parte aquosa do suor, que contém também sódio, potássio, cloreto, uréia, amônia, ácido úrico e uma ínfima parte de proteína. Os ductos destas glândulas desembocam na superfície da pele (ZIMMERMAN; BAI; GINTY, 2014).

Por proverem uma comunicação entre a derme e a superfície corporal, evitando a transposição do estrato córneo, estes três anexos são considerados como vias alternativas para

a absorção de fármacos transdérmicos (BARRY, 2001; PRAUSNITZ, MITRAGOTRI e LANGER, 2004; VILLARINO; LANDONI, 2006).

2.1.3 Hipoderme

A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo e é responsável pela união entre a derme e os tecidos e órgãos subjacentes, ainda que de maneira pouco firme. Por essa razão, permite certo deslizamento entre a pele e as estruturas nas quais ela se apóia. Por ser rica em tecido adiposo, dependendo da região do corpo em que se encontra, fornece proteção contra o frio e choques mecânicos, além de modelar o corpo de acordo com a quantidade de gordura que possua (ZIMMERMAN; BAI; GINTY, 2014).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

2.2.1 Radicais Livres

Radicalis livres são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados disponíveis para formação de ligações químicas (WAGENER; CARELS; LUNDVIG, 2013). A geração *in vivo* ocorre naturalmente por meio de processos endógenos, durante a realização do metabolismo celular, e exógenos, como a exposição à RUV, poluição e pesticidas (HALLIWELL, 2011). O não emparelhamento confere grande capacidade de reação a estas moléculas, comportando-se como receptores ou doadores de elétrons e sua configuração instável confere propriedades específicas, como a alta reatividade e curto tempo de meia-vida (YOUNG; WOODSIDE, 2001). Estas espécies são importantes para a manutenção de muitas funções fisiológicas, atuando como ativadores do sistema imunológico e receptores de cátions para o controle da acidose celular (VALKO et al., 2007).

Dentre as espécies reativas formadas, o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), o superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), também conhecidos como EROs, representam os principais causadores de danos em macromoléculas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Alterações na estrutura de qualquer uma destas biomoléculas podem interferir nas funções fisiológicas executadas pelas mesmas, induzindo processos patológicos como câncer, cardiopatias e envelhecimento precoce (MURAOKA; MIURA, 2003). As reações que envolvem os EROs são variadas e podem acontecer por abstração de hidrogênio, quebra de anel aromático e também por transferência de elétrons (CHO; MOON, 2010; LAZÁR et al., 1989).

2.2.2 Estresse oxidativo e agentes antioxidantes

O estresse oxidativo é definido como a geração em excesso e/ ou uma deficiência na remoção das EROs pelos sistemas antioxidantes intracelulares; que ocorre na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou no retículo endoplasmático (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003).

Na pele, os principais efeitos das EROs estão relacionadas ao envelhecimento e ao aumento da rugosidade, devido à perda de elasticidade e da capacidade de retenção de água (JANG; REMMEN, 2009; PEREZ et al., 2009). Tais efeitos são resultados dos danos induzidos pelas EROs ao ácido desoxirribonucleico (DNA), que promove alterações na estrutura e função de proteínas cutâneas como colágeno, elastina e glicosaminoglicanos e em vias de expressão de genes, com o aumento da expressão de metaloproteinases, o qual ocasiona a degradação do colágeno e ao acúmulo de elastina (GODIC et al., 2014; HALLIWELL, 2011). Além de atuarem de forma direta sobre diferentes moléculas, as EROs ativam vias metabólicas alternativas que contribuem ainda mais para os danos celulares, reduzindo as defesas antioxidantes intracelulares (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003).

Como mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, o corpo humano produz antioxidantes endógenos, como as enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, as quais retardam ou impedem o processo oxidativo (ZHANG et al., 2014). Porém, elas são insuficientes para combater as inúmeras reações de oxidação, tornando-se necessária a utilização de antioxidantes exógenos, administrados através de dietas, suplementos, ou produtos dermocosméticos (ALONSO et al., 2013).

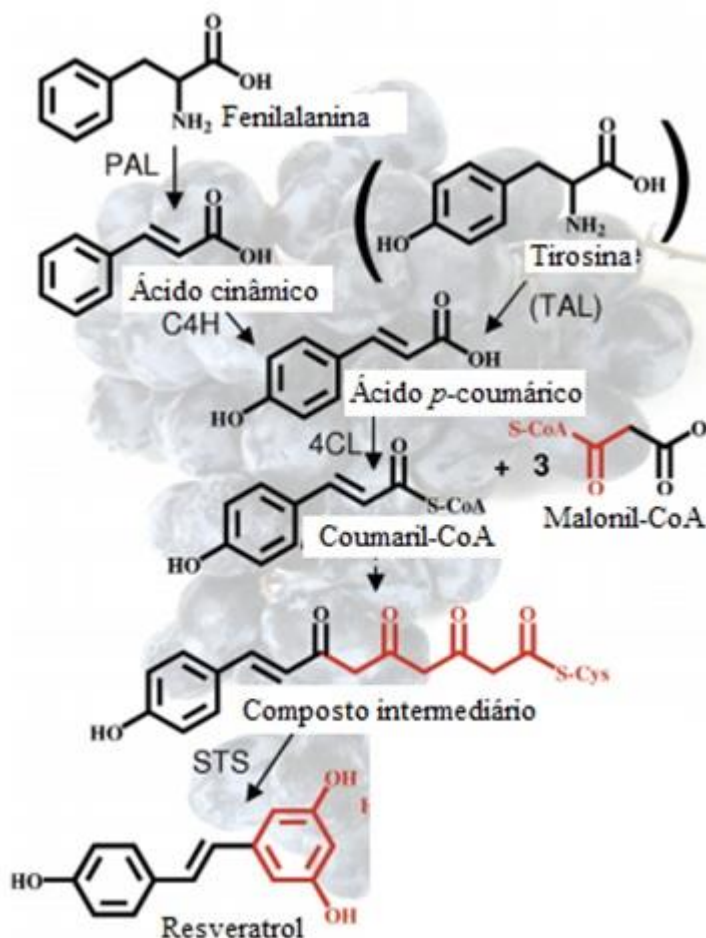
Atualmente, a maioria dos antioxidantes exógenos utilizados são provenientes de produtos naturais como as isoflavonas da soja (MOTA et al., 2007; VALSECCHI et al., 2008), fenóis do óleo de oliva (hidroxitirosol) (LEONARDIS et al., 2008) ou polifenóis (epicatequina, quercetina) (JAYAPRAKASHA; SAKARIAH, 2003). O uso de antioxidantes naturais, polifenóis e carotenóides, em produtos cosméticos é bastante difundido, principalmente pela eficácia em reduzir a geração de radicais livres, retardando o envelhecimento cutâneo (AZIZ; AFAQ; AHMAD, 2005; BANDO et al., 2004; DARVIN et al., 2011; HUNG et al., 2008; LEE et al., 2013).

2.3 RESVERATROL

Substâncias polifenólicas representam uma das maiores classes de metabólitos secundários presentes em plantas, formadas para proteger as mesmas do estresse fotossintético, de EROs e de animais predadores. Devido à semelhança estrutural e funcional com o estrógeno, são considerados fitoestrógenos, com propriedades de defesa para o metabolismo celular, através de sua atividade antioxidante e antiagregante (AVANTAGGIATO et al., 2015). Quimicamente, os polifenóis são compostos que apresentam em sua composição grupos hidroxila ligados diretamente a um anel aromático, podendo conter derivados funcionais como ésteres e glicosídeos (VIOLI et al., 2015). Entretanto, como um grande número de moléculas apresentam estrutura polifenólica, essas substâncias são agrupadas em diferentes classes em função do número de grupamentos fenólicos e dos elementos estruturais que se ligam a estes anéis. As classes incluem os ácidos fenólicos, flavonóides, lignanas e estilbenos (MANACH et al., 2004).

Os estilbenos são compostos bioativos com a estrutura química caracterizada pela presença de dois anéis benzênicos ligados por uma porção de isopropileno, que forma uma estrutura compacta separada por uma dupla ligação. O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é o composto mais relevante dessa classe, sendo isolado pela primeira vez em 1940, a partir das raízes do heléboro branco (*Veratrum grandiflorum*) e, posteriormente, em 1963, a partir das raízes de *Polygonum cuspidatum*, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa e japonesa. Apesar de ser encontrado no amendoim, amora, eucalipto e pêssigo, o resveratrol tem como principal fonte de obtenção a uva (HUANG; MAZZA, 2012; SEBASTIA et al., 2012). Em algumas espécies de plantas, a biossíntese desse composto é via rota dos fenilpropanóides, utilizando quatro enzimas: fenilalanina amonioliase (PAL); 4-hidroxilase ácido cinâmico (C4H); 4-coumarato: Coenzima A ligase (4CL); e estilbeno sintase (STS, também chamada de resveratrol sintase). As duas primeiras enzimas PAL e C4H transformam o aminoácido fenilalanina para ácido *p*-coumárico. A terceira enzima 4CL liga o ácido *p*-coumárico ao grupo panteteína da Coenzima-A para produzir 4-coumaril-CoA. A última enzima da via, a STS, catalisa a condensação entre uma molécula de 4-coumaril-CoA e três moléculas de malonil-CoA, formando o resveratrol (Figura 3) (HALLS, YU, 2008).

Figura 3 – Rota biossintética do resveratrol.



PAL: fenilalanina amômioliase; C4H: 4-hidroxilase ácido cinâmico; TAL: ; 4CL: 4-coumarato: Coenzima A ligase; STS: estilbeno sintase.

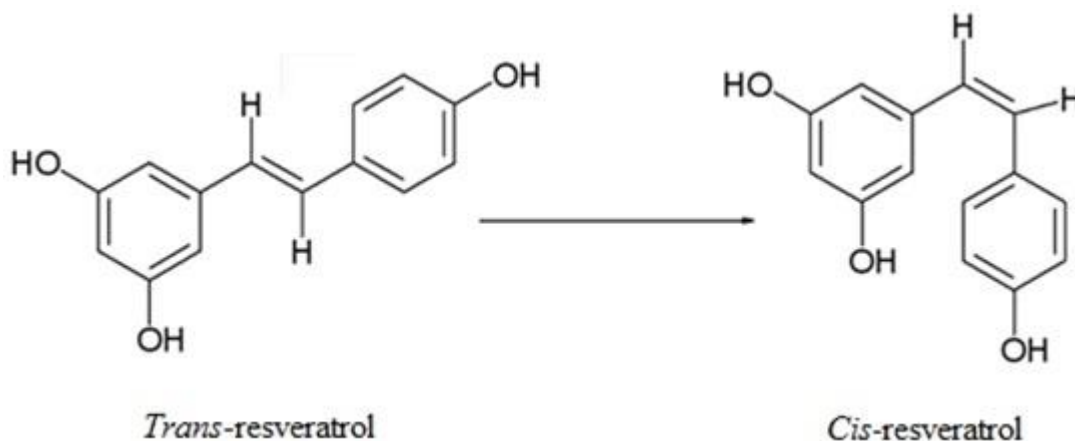
Fonte: adaptado de HALLS; YU, 2008.

Por ser um composto lipofílico (coeficiente de partição igual a 3,40), solúvel em etanol (50 mg mL⁻¹) e em DMSO (16 mg mL⁻¹), sua baixa solubilidade em água (3 mg 100 mL⁻¹) o classifica como “praticamente insolúvel” (KRISTL et al., 2009). Apesar de tal característica, ele apresenta alta permeabilidade e, por isso, é considerado um composto de classe II pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (AMIDON et al., 1995).

Estruturalmente, sua molécula possui dois isômeros: *cis*-(Z)- e *trans*-(E)-resveratrol (Figura 4). Devido à sua conformação, o isômero *cis*- é a forma mais estável, porém o isômero *trans*- é considerado mais ativo biologicamente (FULDA, 2010; RIUS et al., 2010). Quando protegido da luz, *trans*-resveratrol é estável por até 28 dias, armazenado em pH 1-7, enquanto sua forma *cis*- é estável apenas em pH neutro fora do contato com a luz (TRELA; WATERHOUSE, 1996). Outros estudos envolvendo a fotossensibilidade dessa molécula

revelam que entre 80 a 90% do *trans*-resveratrol presente em solução é convertido para seu isômero *cis*-, quando exposto à luz por 1 h (VIAN et al., 2005).

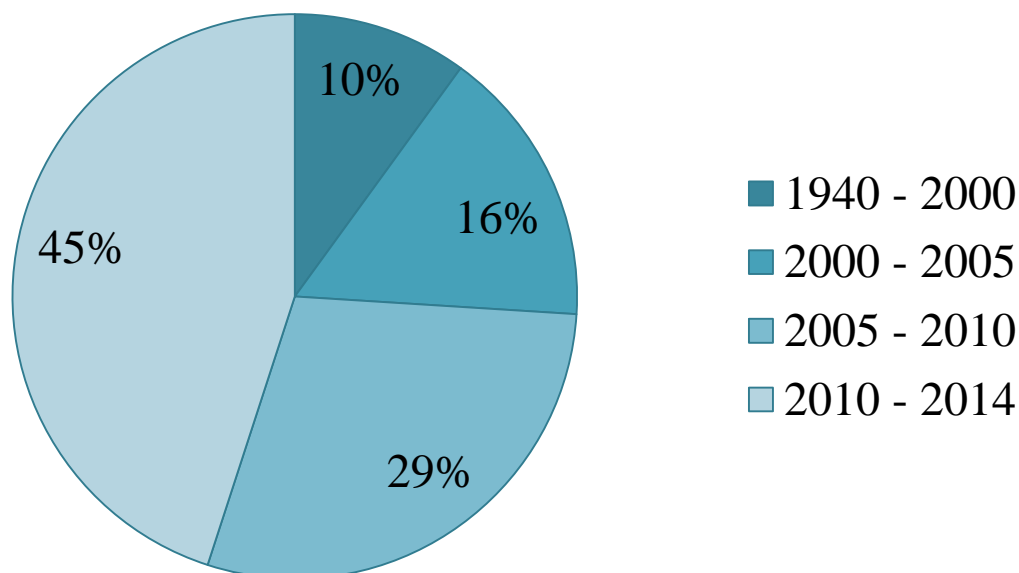
Figura 4 – Isômeros estruturais do resveratrol.



Fonte:BAUR; SINCLAIR, 2006.

Inicialmente, essa fitoalexina despertou pouco interesse até que, em 1992, postulou-se que ela poderia explicar o efeito cardioprotetor do vinho tinto na população francesa, fenômeno designado como “Paradoxo Francês” (RENAUD; DE LORGERIL, 1992). Tal fato foi constatado através de estudos epidemiológicos que descrevem uma relação entre o baixo índice de doenças cardiovasculares na população francesa (apesar de uma dieta rica em gorduras saturadas) e o consumo diário de doses moderadas de vinho tinto (KOPP, 1998). Na última década, um crescente número de estudos avaliaram seus potenciais efeitos benéficos à saúde, com mais de 6437 publicações entre os anos de 1940 e 2014 (Figura 5).

Figura 5 – Descrição gráfica das publicações relacionadas ao resveratrol entre os anos de 1940 a 2014.



Fonte: adaptado de SINGH; PAI, 2014.

Entre os benefícios desta fitoalexina, destacam-se seus efeitos cardioprotetores, anti-inflamatórios e neuroprotetores (UDENIGWE et al., 2008; KELKEL et al., 2010; CATALGOL et al., 2012; RAEDERSTORFF et al., 2013; PANGENI et al., 2014; YANG et al., 2014), além de aumentar a resistência ao estresse e prolongar a expectativa de vida de vários organismos, sejam eles leveduras (HOWITZ et al., 2003) ou vertebrados (BAUR; SINCLAIR, 2006; VALENZANO et al., 2006). Seu efeito quimioprotetor é relacionado com a inibição da atividade da enzima quinona redutase-2, que aumenta a expressão de enzimas antioxidantes responsáveis pelo aumento da resistência celular ao estresse oxidativo (BURYANOVSKYY et al., 2004). O resveratrol auxilia no aumento da atividade da enzima SIRT1, o que resulta na prolongação da longevidade devido ao combate ao estresse celular (AMRI et al., 2012). Ele também regula a expressão de genes como o BRCA1, um gene oncosupressor presente em células mamárias, devido à sua similaridade química com o dietilstilbestrol (LE CORRE et al., 2004; KUNDU; SUHR, 2008).

Quando aplicada topicamente, essa molécula demonstra diversas propriedades, a saber: atividades antiproliferativa e quimiopreventiva contra a carcinogênese cutânea (AZIZ; AFAQ; AHMAD, 2005), proteção solar contra danos causados pela exposição à RUV

(POLONINI et al., 2013), atividade antifúngica contra dermatófitos e o vírus da herpes simplex (DOCHERTY et al., 2004; CHAN, 2002). Os efeitos quimiopreventivos proporcionados pelo resveratrol na pele foram relacionados à inibição da survivina, um membro da família das proteínas inibidoras da apoptose e dos eventos associados a esse efeito (AZIZ; AFAQ; AHMAD, 2005). Uma significativa inibição na incidência do tumor e um atraso no início da tumorigênese foram evidenciados em animais que receberam tratamento tópico com resveratrol (25 ou 50 μM) antes ou após a exposição à RUV (AZIZ; AFAQ; AHMAD, 2005).

Outra característica que torna interessante a incorporação dessa molécula em produtos tópicos e transdérmicos é sua atividade contra o estresse oxidativo, que possui um papel crítico em uma variedade de desordens cutâneas. Primeiramente, sua capacidade antioxidante está intrinsecamente relacionada à sua estrutura, visto que seu grupo *p*-hidróxi e a posição de suas hidroxilas apresentam a habilidade em sequestrar radicais livres e evitar o ciclo pró-oxidante (KOVACIC; SOMANATHAN, 2010; STOJANOVIC; SPRINZ; BREDE, 2001). Além disso, o resveratrol consegue prevenir os danos causados pelo estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio e RUV, como demonstrado em vários sistemas *in vitro* utilizando culturas de fibroblastos e queratinócitos (JAGDEO et al., 2010; LIU et al., 2011; SEVE et al., 2005; VITALE et al., 2013). Adicionalmente aos seus efeitos intrínsecos, o resveratrol consegue modular, em nível celular, um grande número de rotas fisiológicas, principalmente aquelas que regulam a proteção contra o câncer e a senescência celular (KASIOTIS et al., 2013; NDIAYE et al., 2011). Em modelos animais, ele promove efeitos protetores contra danos ambientais, como edema cutâneo, inflamação e hiperplasia causadas por exposição à RUV (AZIZ; AFAQ; AHMAD, 2005). A presença de supostos receptores para resveratrol na epiderme também sugere alguma forma de proteção contra o estresse oxidativo (BASTIANETTO et al., 2010). Soeur e colaboradores (2015) demonstraram que em culturas primárias de queratinócitos humanos ou em modelos de pele humana reconstituída, o resveratrol ativa a via do Nrf2 em doses não tóxicas, entre 20 a 100 μM , promovendo aumento de defesas endógenas presentes na pele que garantem a proteção contra os efeitos tóxicos induzidos pelo estresse.

Apesar de excelentes propriedades biológicas, a aplicação terapêutica do resveratrol permanece muito limitada, apresentando moderados efeitos farmacológicos quando tais estudos são extrapolados para humanos (BAUR; SINCLAIR, 2006). Como explicações, têm-se suas propriedades lábeis, como a rápida oxidação e a fotossensibilidade, que contribuem para o seu baixo tempo de meia-vida (aproximadamente 8 – 14 min) (BAUR; SINCLAIR, 2006; DAS; NG, 2011) e sua baixa biodisponibilidade sistêmica, devido ao rápido metabolismo de primeira

passagem, sendo extensivamente biotransformado em sua forma hidrogenada e sulfatada (MARIER et al., 2002; MURAKAMI, 2014).

Portanto, o aumento da biodisponibilidade do resveratrol em sítios de ação específicos é um passo essencial para o sucesso do seu potencial terapêutico. Com isso, o desenvolvimento de novas formulações, principalmente com a utilização da nanotecnologia, vem se consolidando com o crescente número de depósito de patentes contendo carreadores de ativos convencionais ou nanoestruturados (Tabela 1).

Tabela 1 – Patentes encontradas na quais constam a incorporação do resveratrol em formulações

<i>Número da Patente</i>	<i>Formulação</i>	<i>Propósito</i>	<i>Referência</i>
US 2014/ 0073616 A1	Carreadores nanoestruturados	Entrega do resveratrol através da pele	MARDER, 2014
US 2014/0116386 A1	Fosfolipídeos	Tratamento contra a senescência celular	PIFFERI; ANZAGHI; STEFLI, 2014
US 2010/ 0297199 A1	Nanoemulsão	Uso em cosméticos ou medicamentos	DUAN; ZHOU; YAN, 2010
EP 1 829 452 A1	Microemulsão	Aumento da estabilidade e solubilidade do resveratrol	MIQUEL, 2007
WO 2010102245	Dispersão sólida	Aumento da estabilidade e solubilidade do resveratrol	SAXENA et al., 2010
WO 2013056298	Membrana sublingual	Evitar o metabolismo de primeira passagem/ Aumentar a estabilidade do resveratrol	GRANT; LINDBECK, 2012
CN 102614091 A	Carreador lipídico nanoestruturado	Aumento da estabilidade e solubilidade	XIA; ZHAO, 2012
CN 101874763 A	Lipossoma	Aumento da absorção percutânea	SHI et al., 2010
CN 102755298 A	Micelas poliméricas	Aumento da biodisponibilidade	LI et al., 2012

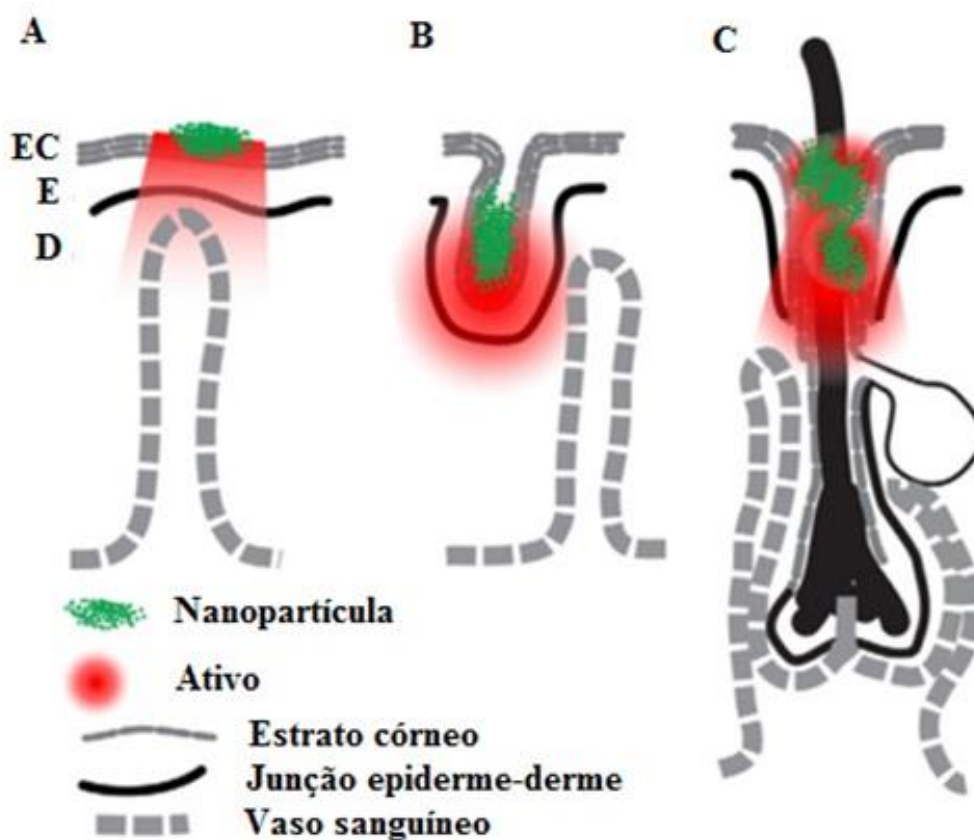
2.4 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é a ciência que lida com a matéria na escala do bilionésimo do metro (10^{-9} m é igual a 1 nm) e caracteriza-se como o estudo da manipulação dessa matéria na escala atômica e molecular. O componente fundamental para o desenvolvimento de uma nanoestrutura são as nanopartículas (NP), definidas como qualquer material que possua pelo menos uma de suas dimensões menor do que 100 nm, e cujo tamanho de sua estrutura esteja entre 1 a 1000 nm (ISO, 2008).

O uso de terapias baseadas nesses sistemas tem como objetivo transportar os ativos até o local específico de ação e entregá-lo com uma dose terapêutica efetiva (BARUA; MITRAGOTRI, 2014). No caso de sistemas de liberação de ativos, as NP são ferramentas emergentes que demonstram grandes vantagens quando comparadas às tecnologias clássicas, a saber: i) dissolução de ativos em soluções aquosas acima do seu limite de solubilidade; ii) promover a estabilidade do ativo; e iii) diminuição da toxicidade, visto que evita a flutuação de níveis plasmáticos do ativo administrado; iv) maior eficácia terapêutica, por meio da liberação prolongada do ativo e v) incorporação tanto de substâncias hidrofílicas (de difícil absorção) quanto de lipofílicas, aumentando a biodisponibilidade (PEER et al., 2007; WANG et al., 2008; PANDEY et al., 2013).

A utilização desses nanosistemas apresenta um elevado potencial terapêutico para seu uso em formulações tópicas e transdérmicas, pelo fato de a pele exibir uma grande área de superfície para aplicação (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004). Além disso, a barreira cutânea não é permeável para a maioria dos compostos e as NP podem utilizar de diversos caminhos do tecido cutâneo para exercer seus efeitos (Figura 6) (JENSEN; PETERSSON; NIELSEN, 2011; PROW et al., 2011).

Figura 6 – Locais para a entrega de princípios ativos por meio de nanopartículas através da pele.



A entrega do princípio ativo na pele a partir das nanopartículas acontece em três grandes áreas: A) superfície do estrato córneo (EC); B) rugas; e C) folículos pilosos.

Fonte: adaptado de PROW et al., 2011.

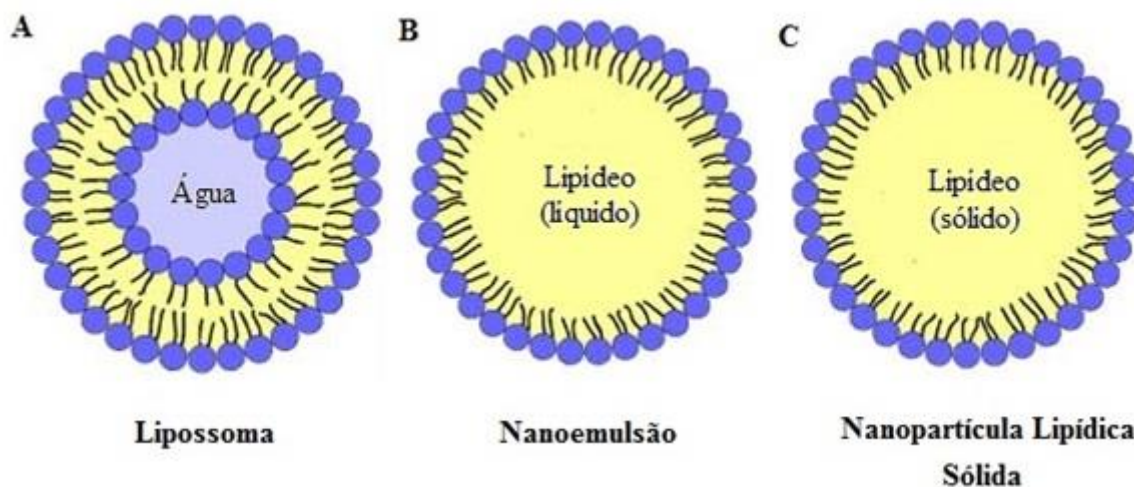
Os nanocarreadores convencionais, como as NP poliméricas ou lipossomas, apresentam limitações quanto às aplicações industriais, por exemplo, problemas com a estabilidade física dos lipossomas, falta de regulamentos aceitos para o uso da maioria dos polímeros disponíveis e a ausência de equipamentos que permitam a produção em larga escala (MITRI et al., 2011). Desta forma, o uso de sistemas de carregamento utilizando lipídeos são promissores, uma vez que os lipídeos são conhecidos como promotores de permeação cutânea, além de serem biodegradáveis e de composição semelhante à fisiológica, produzirem NP com tamanho reduzido e permitirem a proteção contra a degradação e modificação da taxa de liberação do ativo incorporado (POUTON, 2006; PALLERLA; PRABHAKAR, 2013). A classificação das preparações de NP lipídicas consiste em: i) nanoemulsões (quando utiliza-se lipídeo líquido em temperatura ambiente); ii) nanocarreadores lipídicos (quando há uma mistura de lipídeo líquido e sólido) e iii) nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (quando o lipídeo é

sólido em temperatura ambiente) (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004). Uma vez que a matriz lipídica das NLS apresentam uma similaridade estrutural com os lipídeos presentes na pele, tais sistemas de carreamento de ativos podem ser considerados excelentes sistemas tópicos e transdérmicos (ZHAI; ZHAI, 2014).

2.4.1 Nanopartículas Lipídicas Sólidas

As NLS foram desenvolvidas nos anos 1990, por Müller e Lucks (1996) ao patentarem um método de produção de NLS por homogeneização à alta pressão (MARCATO, 2009). O tamanho das partículas varia de 150 a 300 nm, porém valores até 1 µm são aceitos para aplicações específicas (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012; MULLER; SHEGOKAR; KECK, 2011). Com o objetivo de ser um sistema alternativo de encapsulação de princípios ativos em relação aos sistemas coloidais tradicionais, tais como emulsões, nanoemulsões e lipossomas, as NLS são preparadas através da substituição do lipídeo líquido (óleo) de emulsões óleo/ água (O/ A) por um lipídeo ou mistura de lipídeos sólidos e estabilizada por um tensoativo (Figura 7) (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; SOUTO et al., 2011). Esta solidez característica dos lipídeos confere menor mobilidade aos ativos nele incorporado, podendo sustentar ou até controlar a velocidade de liberação destas substâncias (MEHNERT; MÄDER, 2001). Quando comparadas com outros sistemas coloidais, as NLS apresentam algumas vantagens como: i) maior estabilidade físico-química do ativo incorporado; ii) biocompatibilidade; iii) liberação controlada do ativo; iv) métodos de produção sem uso de solvente orgânico; v) fácil produção em escala industrial; e vi) esterilização (DETONI et al., 2012; MEHNERT; MADER, 2001; YANG et al., 2014).

Figura 7 – Representação esquemática de diferentes sistemas carreadores de ativos.



(A) Lipossomas; (B) Nanoemulsão e (C) Nanopartícula Lipídica Sólida.

Fonte: MÜLLER et al. (2000).

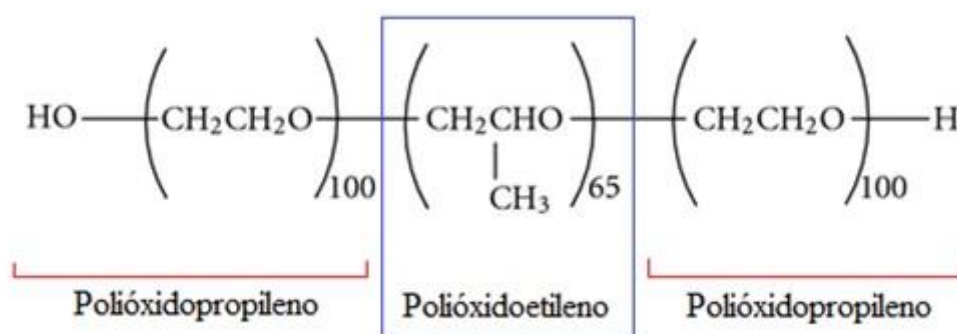
Os lipídeos mais utilizados na obtenção de NLS geralmente são os glicerídeos (tri e monoestearato de glicerila), ácidos graxos de elevado ponto de fusão, como o esteárico e o palmítico, esteróis (colesterol) e ceras (palmitato de cetila). Os lipídeos que cristalizam em formas altamente organizadas, tais como os triacilgliceróis, constituídos por um único tipo de ácido graxo, originam sistemas com poucos locais para acomodar as substâncias ativas, induzindo sua expulsão da matriz lipídica sólida. Como o fármaco se localiza entre as cadeias lipídicas e nas imperfeições dos cristais, a alta organização dos cristais diminui a eficiência de encapsulação (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MÜLLER et al., 2007). As misturas de ácidos graxos com diferentes pontos de fusão formam estruturas com muitas imperfeições, originando NLS com maior capacidade para incorporar as substâncias ativas (SOUTO et al., 2011).

A preservação do arranjo de lipídeos durante a estocagem até a administração das NLS proporciona uma liberação controlada do fármaco encapsulado. Durante o processo de estocagem, os lipídeos podem se cristalizar e se reorganizar em formas de menor energia, mais estáveis (forma β), expulsando o ativo que estava localizado nas imperfeições dos cristais, o qual não será protegido contra a degradação e nem terá uma liberação controlada (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012).

Diversos tensoativos são utilizados para estabilizar a dispersão da fase lipídica e evitar a agregação das partículas. São compostos biocompatíveis, aniônicos, catiônicos ou não iônicos, tais como: sais biliares (taurodeoxicolato), lecitinas e copolímeros do polióxidoetileno

(PEO) e polióxido de propileno (PPO) (poloxamer) (MEHNERT; MÄDER, 2001; WONG et al., 2007). Dentre eles, uma classe que se destaca é a de poloxâmeros, conhecidos comercialmente como Pluronic[®], sendo o Pluronic[®] F-127 um dos principais representantes dessa classe, devido à sua potencial aplicação na área biomédica (Figura 8) (KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002; ALEXANDER et al., 2013). Ele consiste em um tribloco de copolímero, em que os monômeros de PEO e PPO estão organizados como PEO₁₀₀PPO₇₀PEO₁₀₀. Em solvente aquoso, por causa da relativa diferença de hidrofobicidade entre os monômeros, formam-se estruturas micelares, sendo que a porção de PPO funciona como o núcleo hidrofóbico para a incorporação de ativos lipofílicos, enquanto a porção PEO previne a adsorção e agregação das NPs (ALMEIDA et al., 2012). Em concentrações moderadas e à temperatura ambiente, soluções micelares de Pluronic[®] F-127 são encontradas na forma líquida desordenada. Após aumento da temperatura, o núcleo micelar começa a se desidratar, resultando em uma mudança de entropia para um estado ordenado de gel cristalino (ALEXANDER et al., 2013). Formulações contendo esse tribloco de copolímero podem ser administradas por via tópica, visto que as micelas geleificam e a liberação controlada do ativo é atingida pela difusão lenta do mesmo através dos canais aquosos presentes na micela (SHARMA et al., 2008; NIE et al., 2011).

Figura 8 – Estrutura do Pluronic[®] F-127.



Fonte: adaptado de KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002.

2.4.2 Técnicas de preparo de NLS

As NLS podem ser preparadas por diversas técnicas, e estas, por sua vez, interferem em diversas características das partículas, como a sua morfologia. A seguir estão descritas as principais técnicas utilizadas no preparo de NLS.

2.4.2.1 Homogeneização por alta pressão

Esta técnica tem a vantagem de proporcionar ótimas condições para transposição de escala e também de não ser necessário o uso de solventes orgânicos. O uso desta técnica pode ser à frio ou à quente (PARDEIKE et al., 2009). O homogeneizador de alta pressão possui um pistão, no qual o líquido é empurrado sob alta pressão (100 – 2000 Bar) por um orifício com diâmetro micrométrico, acelerado em uma pequena distância a uma alta velocidade (acima de 100 km h⁻¹). Esta colisão possibilita a formação de partículas com diâmetros nanométricos, devido às forças de cavitação que rompem as gotículas (MEHNERT; MADER, 2001).

Na homogeneização à quente, o fármaco é dissolvido ou disperso no lipídeo fundido e estes são adicionados em uma solução aquosa com tensoativos, dando origem a uma pré-emulsão, a qual é colocada no homogeneizador e submetida à alta pressão. A nanoemulsão é posteriormente resfriada e com isso o lipídeo se solidifica, dando origem às NLS (SOUTO et al., 2011). Na homogeneização à frio, é utilizado o lipídeo no estado sólido. Nesta técnica, a substância ativa é dissolvida ou dispersa no lipídeo fundido, e em seguida esta mistura é solidificada em gelo seco ou nitrogênio líquido, depois moída e o pó é disperso em uma solução com tensoativos e, então, submetida à homogeneização (DEMIREL et al., 2001; MARCATO, 2009).

2.4.2.2 Microemulsão

As NLS preparadas à partir desta técnica são produzidas vertendo-se uma microemulsão quente O/ A em água gelada, seguido de forte agitação e retirada do excesso de água por liofilização ou ultracentrifugação (WISSING et al., 2004). A fase interna da microemulsão deve ser composta por lipídeos de baixo ponto de fusão. Portanto, quando a mesma entra em contato com a água gelada, as nanogotas lipídicas sofrem cristalização, formando as NLS (MARENGO et al., 2000).

2.4.2.3 Ultrassonicação

No método de ultrassonicação, as partículas são formadas por ondas ultrassônicas gerando cavitação em líquidos. Quando um líquido é submetido ao processo de sonicação com alta intensidade, as ondas sonoras se propagam no meio líquido, ocorrendo uma alternância de

ondas sonoras de alta e baixa pressão geradas pelo ultrassom. Na fase de baixa pressão e alta intensidade, as ondas criam bolhas de vácuo, e elas aumentam de diâmetro até que não conseguem mais absorver energia, e atingindo a fase de alta pressão, elas são comprimidas até implodirem (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000). O tempo de sonicação pode prejudicar substâncias termolábeis e/ou voláteis porque a temperatura tende a aumentar conforme maior for o tempo de sonicação. Uma outra desvantagem é a contaminação da amostra pelo metal da haste do sonicador, que libera titânio. Isto pode ser resolvido centrifugando a amostra, precipitando o titânio (MAA; HSU, 1999).

2.4.3 Métodos para a caracterização de NLS

A caracterização das NLS é uma das etapas mais importantes durante a etapa de pesquisa e desenvolvimento. Todas as informações coletadas nesta etapa são úteis para a aplicabilidade deste sistema de liberação. As técnicas utilizadas na caracterização são: determinação do tamanho e do potencial zeta da NLS, avaliação morfológica, eficiência de encapsulação e avaliação da estabilidade em função do tempo.

2.4.3.1 Tamanho de partícula

O tamanho de partícula (TP) das NLS depende de vários fatores, como: i) método de preparação; ii) natureza e concentração do polímero e do ativo incorporado; iii) concentração do lipídeo na solução orgânica; e iv) velocidade de agitação (LEGRAND et al., 1999).

Para a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e da distribuição do tamanho, usualmente utiliza-se o método de espalhamento dinâmico de luz (do inglês, *Dynamic Light Scattering*, DLS), também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons. Este método é baseado no movimento Browniano, no qual as partículas em suspensão estão em movimento permanente e se difundem em todas as direções. Tal movimentação causa o espalhamento do feixe de luz incidente sobre as partículas, possibilitando a determinação do diâmetro hidrodinâmico das mesmas em suspensão, sendo que seu valor pode ser influenciado por camadas de tensoativos e/ ou camada de hidratação (HOFFMANN et al., 1997; RODRIGUES et al., 2003; JÄGER et al., 2007). Esta técnica é utilizada somente para partículas com diâmetro entre 3 nm até 1 µm (HEURTAULT et al., 2003; UNER, 2006). Assim, a intensidade da luz dispersa irá variar com o diâmetro das partículas e a velocidade dos movimentos brownianos, sendo que as partículas menores têm um movimento mais rápido que

as partículas maiores, e conseqüentemente dispersam menos luz (HEURTAULT et al, 2003). Por isso, o termo de tamanho de partícula (TP) é comumente utilizado para designar o diâmetro hidrodinâmico médio das NPs.

Outro parâmetro importante é o índice de polidispersão (do inglês, *Polidispersion Index*, PdI), que fornece informações sobre o grau de homogeneidade de uma amostra. Este valor pode variar de zero, quando todas as partículas presentes na suspensão apresentam o mesmo tamanho, até um (1,0), quando o diâmetro das partículas tem uma distribuição bastante heterogênea (LIU; WU, 2010). Nanopartículas lipídicas são consideradas homogêneas quando do valor de PdI é inferior ou igual a 0,30. Devido aos métodos de produção, para NLS são aceitos valores mais elevados de PdI, podendo chegar a valores iguais a 0,40 (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012).

2.4.3.2 Potencial zeta

O potencial zeta (PZ) avalia a carga superficial das partículas, a qual é influenciada pelas mudanças que ocorrem na interface das NP com o meio dispersante. Isto se deve pela dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou pela adsorção de espécies iônicas que estão presentes no meio aquoso da dispersão (FLORENCE; ATWOOD, 2003). Ele pode ser uma maneira efetiva de controlar o comportamento de NPs, pois indica mudanças no potencial de superfície e na força de repulsão entre as partículas (GREF; COUVREUR, 2006).

O PZ é calculado por medidas de mobilidade eletroforética que correspondem à velocidade das partículas em suspensão, quando submetidas a um campo elétrico. Quanto maior a carga superficial, maior será a velocidade com que as partículas se deslocam em direção aos eletrodos de carga oposta. Esta velocidade é medida através da técnica de DLS.

A medida do PZ permite avaliar a estabilidade das dispersões coloidais, principalmente durante o período de estocagem. Em módulo, um valor de PZ relativamente alto é importante para a estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de NP adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2003). Por isso, valores de PZ superiores ao módulo de 30 mV, sugerem suspensões mais estáveis, devido à repulsão entre as partículas (LEGRAND et al., 1999; POHLMANN et al., 2002; GREF; COUVREUR, 2006).

Como dito, os valores de PZ podem ser positivos ou negativos, dependendo da natureza do polímero (SOPPIMATH et al., 2001). Os fosfolipídeos, poloxamer (copolímeros dos óxidos de etileno e propileno) e os polímeros constituintes das NPs são os principais

componentes que podem afetar o PZ, por estarem envolvidos na formação do envoltório e adsorvidos a ele. Enquanto polímeros e lecitina favorecem uma carga negativa na interface, o poloxamer, um tensoativo não-iônico, tende a reduzir, em valor absoluto, o PZ, devido à estabilização do sistema ocorrer por impedimento estérico, o que faz com que o PZ da formulação apresente valor inferior ao módulo de 30 mV, ainda assim, garantindo a estabilidade da suspensão (WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

2.4.3.3 Avaliação morfológica

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) têm sido técnicas microscópicas bastante utilizadas na caracterização de NLS, pois fornecem informações fidedignas sobre o formato e o diâmetro das partículas, bem como a presença de populações heterogêneas (HALL et al., 2007).

Por utilizar pequenos comprimentos de onda dos elétrons, a MET consegue exibir imagens com alta resolução. Ela é baseada na técnica em que um feixe de elétrons é emitido na direção da amostra, o qual sofre diversos tipos de espalhamento dependendo das características da amostra. Imagens de campo claro são formadas por elétrons que sofrem pouco desvio, enquanto as de campo escuro são formadas por elétrons difratados pelos planos cristalinos do material (KLANG; VALENTA; MATSKO, 2013).

Por meio da MEV, é possível verificar a rugosidade e porosidade das partículas (MAGENHEIM; BENITA, 1991). Nesta técnica, os elétrons são retroespalhados e os elétrons secundários são emitidos da superfície da amostra para formarem a imagem (HALL et al., 2007).

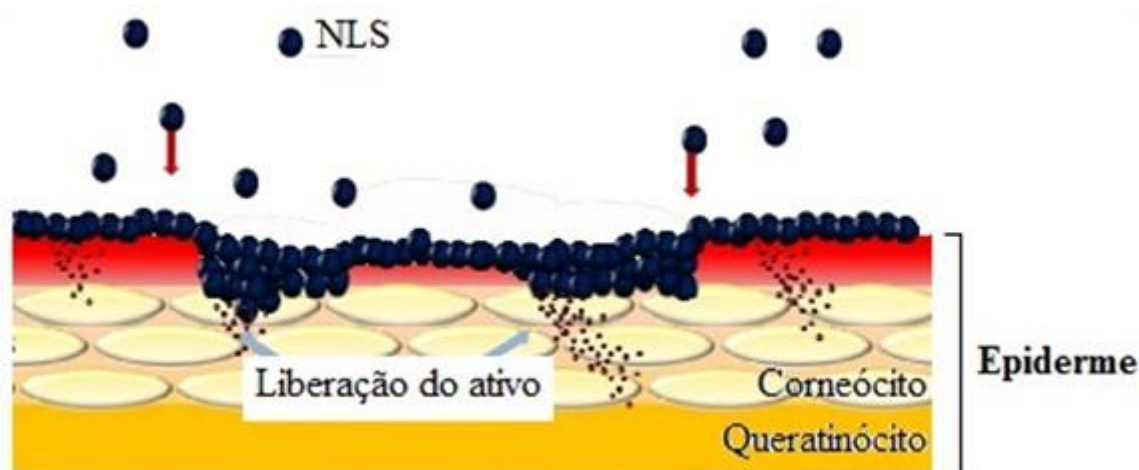
2.4.3.4 Eficiência de encapsulação

A técnica de ultrafiltração-centrifugação é usualmente empregada para determinar a quantidade de ativo associada às NPs, ou seja, determinar quanto do ativo utilizado para o preparo do sistema realmente está incorporado na NP. Para a realização desta técnica, uma membrana é utilizada, visando a separação entre as fases aquosa e oleosa ou dispersa da suspensão coloidal. A concentração livre do ativo é determinada no ultrafiltrado e a fração de ativo associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre a concentração inserida inicial e livre de ativo (KHERADMANDNIA et al., 2010; PRIYANKA; ABDUL; HASAN, 2012).

2.4.4 Nanopartícula lipídica sólida para aplicação tópica

O uso de NLS como carreadores para produtos tópicos já é conhecido há algum tempo (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004). Os efeitos oclusivos produzidos pela NLS são resultados de seu pequeno tamanho e propriedades adesivas das partículas, o que leva à formação de filmes na camada superficial da pele (Figura 9) (MÜLLER et al., 2007; MÜLLER; SHEGOKAR; KECK, 2011; WISSING; LIPPACHER; MÜLLER, 2001). A formação do filme reduz a perda de água transepidermal e, possivelmente, auxilia no aumento da hidratação da pele e em sua elasticidade (JENSEN; PETERSSON; NIELSEN, 2011). Além disso, o tamanho reduzido das partículas facilita o transporte de ativos através da pele (ÜNER; YENER, 2007).

Figura 9 – Formação do filme oclusivo de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) na pele.



Fonte: adaptado de MÜLLER; SHEGOKAR; KECK, 2011.

Portanto, o uso de NLS em produtos tópicos é promissor. Aliado à isto, o uso de uma matriz lipídica com uma constituição balanceada de ácidos graxos, além de permitir uma maior eficiência na encapsulação do ativo, pode promover um aumento na hidratação e, conseqüentemente, na penetração do ativo na epiderme e derme.

2.5 THEOBROMA GRANDIFLORUM

O gênero *Theobroma* pertence à família *Sterculiaceae* e é constituído por vinte duas (22) espécies de árvores que crescem em florestas tropicais. Considerado como o principal fruto da Amazônia, quando relacionado às outras culturas de frutas tropicais, o cupuaçu (*Theobroma*

grandiflorum) é uma árvore de médio porte, com altura compreendida entre seis a dezoito metros, sendo naturalmente encontrada na região Sul dos estados do Pará, Maranhão e Amazonas (Figura 10) (FLECK; NEWMAN, 2012; HURST et al., 2002).

Figura 10 – Fruto e polpa de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu).



Fonte: FLECK; NEWMAN, 2012.

O fruto de cupuaçu tem um diâmetro de 10 a 12 cm e peso de 1 a 2 kg, contendo cerca de 50 sementes por fruto. Ele é apreciado por sua polpa ácida e fortemente aromática, que recobre as sementes. Por causa de seu sabor forte, a polpa da fruta não é consumida sozinha, porém é largamente utilizada como ingrediente em produtos alimentícios, como sucos e sorvetes e substitutivo do cacau em chocolates (STEINBERG; BEARDEN; KEEN, 2003).

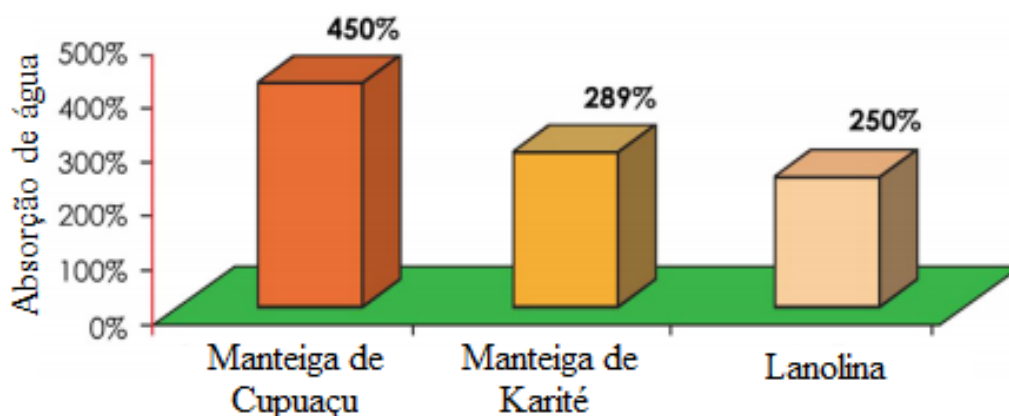
As sementes do cupuaçu representam uma fração significativa do fruto e apresentam alto valor nutritivo (ROGEZ et al., 2004). Com cerca de 35 a 50 sementes por fruto, correspondendo a 20% do peso deste, o seu processamento oferece muitas perspectivas para o seu aproveitamento. Quando beneficiadas, as sementes de cupuaçu resultam na manteiga e na torta, sendo a primeira bastante utilizada pela indústria de cosméticos (HURST et al., 2002).

A manteiga de cupuaçu, também conhecida como manteiga da semente de *T. grandiflorum*, é um triglicerídeo, com alto valor calórico, e uma composição rica em alcalóides e lipídeos, principalmente ácidos graxos saturados e insaturados, que lhe conferem um baixo

ponto de fusão e aspecto sólido macio que funde rapidamente em contato com a pele (YANG et al., 2003).

A capacidade da manteiga de cupuaçu penetrar na pele rapidamente, devido ao seu baixo ponto de fusão, é superior à manteiga de karité e lanolina, e sua alta capacidade de absorção de água (Figura 11), aproximadamente 210% superior à da lanolina, auxilia tanto na estabilidade de emulsões quanto em sua propriedade emoliente (FLECK; NEWMAN, 2012).

Figura 11 – Capacidade de retenção de água.



Fonte: adaptado de FLECK; NEWMAN, 2012.

Por causa de suas características lipofílicas, ela diminui a perda transepidermal de água, o que promove a hidratação do tecido cutâneo, deixando-a mais elástica, macia e suave. Além disso, ela protege contra RUV e tem a capacidade de regular as atividades da camada lipídica da pele, auxiliando na homeostasia do tecido (FLECK; NEWMAN, 2012; YANG et al., 2003).

3 HIPÓTESE

O desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas inovadoras que utilizam manteiga de *Theobroma grandiflorum* propicia uma maior estabilidade para o resveratrol, potencializando sua atividade antioxidante e aumentando sua penetração nas camadas mais profundas da pele.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) utilizando como componente lipídico a manteiga de cupuaçu para incorporar o resveratrol, visando a aplicação tópica deste antioxidante, com a finalidade de aumentar a penetração cutânea e seu potencial terapêutico.

4.2 Específicos

- Caracterizar qualitativamente e quantitativamente os componentes da manteiga de cupuaçu, por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CG-AR);
- Desenvolver NLS controle (C-NLS) e contendo o resveratrol (R-NLS);
- Caracterizar as NLS obtidas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação;
- Avaliar a estabilidade das NLS produzidas;
- Avaliar *in vitro* a atividade antioxidante das NLS, comparando-a com uma solução etanólica de resveratrol (SER);
- Avaliar *in vitro* o perfil e a cinética de liberação do resveratrol a partir da R-NLS;
- Avaliar *ex vivo* a penetração cutânea do resveratrol a partir da R-NLS, utilizando modelo experimental com pele humana e
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade das NLS em linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REAGENTES E MATERIAIS

A acetonitrila (ACN) utilizada na preparação da fase móvel foi grau CLAE, (Sigma-Aldrich, EUA). O cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), sulfato de magnésio (MgSO₄) e fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) foram todos obtidos do mesmo fornecedor (Sigma-Aldrich, EUA). A água ultrapura obtida em um sistema Direct-Q[®] 3 UV (Millipore, Alemanha) (18,2 MΩ cm de resistividade a 25 °C e < 10 ppb de carbono orgânico total) foi utilizada em todos os experimentos. Resveratrol, 98% de pureza, foi adquirido da JiAherb (China) e o Pluronic[®] F-127 da Sigma-Aldrich (EUA). A fase móvel e o meio receptor foram filtrados à vácuo em filtros de celulose de 0,45 μm (Sartorius, Alemanha) e degaseificados utilizando ultrassom (Unique, Brasil) por 30 min antes do uso. Para os estudos de cultura celular, o dimetilsulfóxido (DMSO) foi obtido da Synth (Brasil). O Soro fetal bovino (SFB), a penicilina, a estreptomicina e o meio DMEM foram adquiridos da Invitrogen (EUA). O brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), bicarbonato de sódio e o ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES) foram adquiridos pela Sigma Chemical Co. (EUA). Células de queratinócitos humanos (HaCaT) foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Substâncias Antitumorais, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

5.2 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

5.2.1 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

Uma alíquota da manteiga de cupuaçu foi submetida à análise para a determinação qualitativa e quantitativa de seus compostos por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CG-AR) equipado com detector de ionizador de chamas. Foi utilizada coluna capilar da HP-INNOWax, com 15 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste, com um fluxo constante de 2 mL min⁻¹, temperatura inicial do forno de 80 °C (1 min), e rampa de 7 °C min⁻¹ até temperatura final de 240 °C. O injetor foi utilizado no modo *split* (1/50) a 250 °C e o detector na mesma temperatura. As amostras foram diluídas em clorofórmio 0,5% e o volume de injeção foi de 1 μL. A identificação dos

componentes químicos foi baseada no tempo de retenção da amostra e uma mistura de n-alcanos de C₁₀ – C₁₈ (CHRISTIE; HAN, 2010).

5.2.2 Quantificação do resveratrol por CLAE

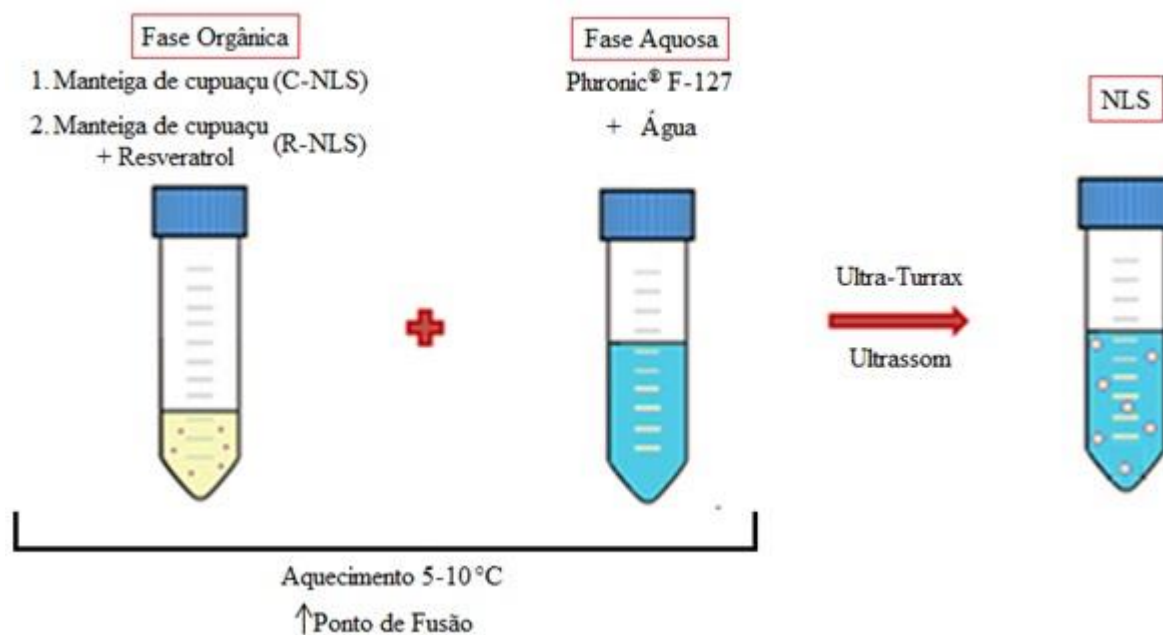
As análises por CLAE para a quantificação do resveratrol foram realizadas em um sistema cromatográfico Shimadzu SPD-10 AV (Japão) composto por: bomba quaternária (LC-10 AT), detector DAD (SPD-M10 A) e injetor automático (SIL-10 AF). As separações cromatográficas foram obtidas utilizando colunas de octadecilsilano (C18) – 250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm da ACE[®] (Escócia).

A quantificação foi feita utilizando metodologia já desenvolvida e validada no laboratório NIQUA (ALMEIDA et al., 2014), conforme a Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003, que regulamenta a validação de métodos analíticos e bioanalíticos no Brasil. A fase móvel utilizada foi uma mistura de ACN e água (55:45, v/ v), com um fluxo de 1,2 mL min⁻¹, volume de injeção de 25 µL e detecção no UV a 307 nm. Uma curva de calibração foi obtida proveniente da análise de diferentes concentrações de resveratrol (0.5 - 80 µg mL⁻¹), em triplicata, para a determinação da seletividade (interferência dos componentes da NLS) do método.

5.3 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

As NLS foram preparadas pelo método homogeneização por alto cisalhamento (NEVES et al., 2013), com algumas modificações (Figura 12).

Figura 12 – Preparo das nanopartículas lipídicas sólidas por meio da técnica de homogeneização por alto cisalhamento.



NLS: nanopartículas lipídicas sólidas; C-NLS: NLS controle (sem ativo); e R-NLS: NLS contendo resveratrol.

Fonte: o autor.

A fase orgânica (FO), composta pela manteiga de cupuaçu (NLS controle – C-NLS) ou manteiga de cupuaçu e resveratrol (R-NLS) foi aquecida a 45 °C. Em seguida, a fase aquosa (FA) constituída de Pluronic® F-127, previamente aquecida na mesma temperatura, foi vertida na fase oleosa. Após esta etapa, essa dispersão foi submetida à alta agitação (12.000 rpm) por 1 min (SilentCrusher M, Heidolph, Alemanha), seguida de uma irradiação ultrassônica (Vibra Cell, Sonics, EUA) por 10 min com uma intensidade de 35%, auxiliado por uma ponta de ultrassom (6 mm de diâmetro), formando a C-NLS e R-NLS (Tabela 2). As NLS preparadas foram deixadas à temperatura ambiente para a solidificação do núcleo lipídico.

Tabela 2 – Composição das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo resveratrol.

	<i>C-NLS</i>	% (m/ v)	<i>R-NLS</i>	% (m/ v)
Composição	Manteiga de cupuaçu	1,00	Manteiga de cupuaçu	1,00
	Pluronic® F-127	0,70	Pluronic® F-127	0,70
			Resveratrol	0,05

C-NLS: NLS controle, sem ativo (C-NLS); R-NLS: NLS contendo resveratrol.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

5.4.1 Caracterização físico-química

Amostras de C-NLS e R-NLS foram caracterizadas pelo TP, PdI e PZ, utilizando o equipamento Zetatrac (Microtrac, EUA). O TP e o PdI foram determinados por meio da técnica de DLS, como uma medida do comprimento da distribuição do tamanho das partículas. Os valores de PZ foram determinados através da avaliação da mobilidade eletroforética, que foi transformada em PZ pela equação de Smoluchowski. Antes da caracterização, as amostras foram diluídas (1:400, v/ v) em água ultrapura para promover uma intensidade adequada de espalhamento de luz. Os valores foram obtidos através do cálculo da média de 5 leituras. As medidas foram realizadas em triplicata, à temperatura ambiente.

5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Previamente à análise por MET, as dispersões de C-NLS e R-NLS foram diluídas (1:5, v/ v) em água ultrapura e depositada sobre um *grid* de metal de cobre revestido com carbono (CF 200-Cu, 300 *mesh* de cobre, EMS, EUA). A amostra foi seca em fluxo de nitrogênio e deixada à temperatura ambiente por 12 h. As partículas foram visualizadas em uma magnitude de 100.000 vezes em um microscópio eletrônico (MET JEM-1011, JEOL, EUA).

5.4.3 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada indiretamente por meio da quantificação do resveratrol livre (não encapsulado) presente na FA das dispersões. A R-NLS foi diluída (1:200, v/ v) em água ultrapura, para evitar o risco de deposição de cristais do ativo na superfície da NLS, o que ocasionaria uma estimativa elevada do valor de EE (ARAÚJO et al., 2012). Para isso, o resveratrol livre foi separado do sistema utilizando o método de ultrafiltração/ centrifugação (SOUTO; MÜLLER, 2006). Alíquotas (n=3) de 2 mL da suspensão de R-NLS diluída foram transferidas para unidades de filtração Amicon® (MWCO 10,000, Millipore, Alemanha) e centrifugadas a $1.810 \times g$ por 30 min (Eppendorf® 5810 R, Alemanha). Após a separação, 50 µL do filtrado (não encapsulado) foram retirados e diluídos em 50 µL de fase móvel para determinação da EE. As amostras foram analisadas por CLAE, conforme método descrito previamente. A EE do resveratrol na NLS foi calculada como sendo a diferença

percentual entre a concentração de ativo presente na suspensão (concentração total) e a encontrada no filtrado (concentração livre), através da Equação 1:

$$\text{Eficiência de Encapsulação (\%)} = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{livre}}}{C_{\text{total}}} \times 100$$

Em que: C_{Total} e C_{livre} correspondem à concentração de resveratrol total no sistema e concentração de resveratrol no filtrado.

5.4.4 Estudo de estabilidade de curto prazo

As amostras (C-NLS e R-NLS) (n=3) foram armazenadas em *vials* de vidro, protegidos da luz, sob refrigeração (4 °C) por 30 dias e avaliadas físico-quimicamente quanto aos aspectos de TP, PdI e PZ nos tempos 0 (preparo), 7, 15 e 30 dias de armazenamento.

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante da SER, C-NLS e R-NLS foi avaliada através do método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (QIN et al., 2014). Quando um agente antioxidante é adicionado à reação de DPPH, a mesma diminui sua absorbância. Alíquotas de 100 µL com diferentes concentrações de resveratrol (equivalentes entre 10 a 100 µM de resveratrol) foram adicionadas a 100 µL de uma solução de 100 µM de DPPH dissolvido em etanol. Após agitação em vórtex e 30 min à temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância foi lida a 517 nm. Um valor de absorvância baixo representa uma alta atividade antioxidante frente ao DPPH. A atividade antioxidante foi calculada através da Equação 2:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{controle}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

Em que: A_{amostra} é o valor para a solução com a amostra mais o DPPH; A_{controle} é o valor da amostra mais etanol e A_{DPPH} é o valor da solução etanólica de DPPH.

Uma curva concentração-resposta foi calculada para cada amostra testada contendo resveratrol. Os resultados foram expressos como concentração efetiva de 50% (CE_{50}), ou seja, a quantidade de resveratrol (μM) necessário para consumir metade do radical livre presente (μM de DPPH). Quanto menor o valor de CE_{50} , maior a atividade antioxidante da amostra.

5.6 PERFIL E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Para a verificação da cinética de liberação do resveratrol através da R-NLS e da SER, foram utilizadas células de difusão vertical volumétricas (células de Franz) de 7 mL e área de difusão total de $1,86\text{ cm}^2$, com coleta automática, prateleira agitadora com capacidade para agitação calibrada de 6 células simultaneamente e banho de aquecimento com a mesma capacidade, para aquecer as células por meio de seu sistema de camisa-de-água (Microette Plus, Hanson Research, EUA).

O meio receptor biorelevante, previamente validado por nosso grupo de pesquisa, foi composto de uma solução aquosa de suor humano artificial (Tabela 3), que mimetiza as condições da pele humana, adicionado de 10% de etanol para garantir as condições *sink* em que o meio receptor não atue como uma barreira de absorção percutânea (FDA, 1997).

Tabela 3 – Composição do meios receptor biorelevante utilizado para estudos de cinética de liberação *in vitro* do resveratrol.

<i>Componente</i>	Suor humano
	artificial (mM)
NaCl	49,96
KH ₂ PO ₄	7,50
CaCl ₂	0,15
MgSO ₄	1,00

NaCl: cloreto de sódio. KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico. CaCl₂: cloreto de cálcio. MgSO₄: sulfato de magnésio.

Ao compartimento doador foram adicionadas alíquotas uniformes de 200 μL de R-NLS ou SER (equivalente a 90 μg de resveratrol) ($n = 6$ para cada formulação) e o compartimento receptor foi preenchido completamente com o meio receptor adequado, certificando-se de que não houvesse ar entre o meio e as membrana utilizada, posicionada entre

os dois compartimentos. Discos circulares de polisulfona de 25 mm de diâmetro (Tuffryn, Pall Corporation, EUA) foram utilizados como membranas artificiais, as quais foram previamente lavadas com água ultrapura para remoção de possíveis aditivos ou contaminantes e saturadas com meio receptor por 30 min antes do experimento. O meio receptor permaneceu em agitação constante a 600 rpm por meio de uma barra magnética, exceto nos períodos de coleta, e mantidos a 32 ± 2 °C durante todo o experimento. As células foram então fechadas para manutenção de oclusão por todo o experimento, com auxílio de uma braçadeira. Alíquotas do meio receptor (1 mL) foram coletadas em intervalos regulares de tempo (0,5, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 h após a aplicação das amostras) diretamente em *vials* para CLAE, e as células de difusão foram imediatamente repostas com o mesmo volume de meio, na mesma temperatura. A concentração de resveratrol foi devidamente corrigida em cada coleta em relação às diluições ocasionadas pela reposição do meio. A concentração de resveratrol em cada tempo de coleta foi determinada utilizando CLAE, sendo a quantidade liberada de ativo no tempo t ($Q_{real,t}$) calculada usando a equação 3:

$$Q_{real,t} = C_{mensurado,t} \cdot V_r \cdot V_a \cdot \sum_{i=1}^{n-1} C_a$$

na qual $C_{mensurado,t}$ é a concentração calculada no tempo t , V_r é o volume da célula de difusão, V_a é o volume da alíquota coletada e C_a é a concentração da alíquota.

Quantidades cumulativas de resveratrol (μg) liberadas por unidade de área de superfície (cm^2) foram plotadas em função do tempo (h) para determinação dos perfis de liberação. Modelos matemáticos foram aplicados para determinação da cinética de liberação. Porcentagem cumulativa de resveratrol (%) *versus* tempo (h) foram plotadas para avaliar se a liberação seguia cinética de ordem zero; Porcentagem cumulativa de resveratrol (%) *versus* a raiz quadrada do tempo (\sqrt{t}) para cinética de pseudo-primeira ordem (modelo de Higuchi); e o log da porcentagem cumulativa de resveratrol (%) *versus* tempo (h) para cinética de primeira ordem. Coeficientes de determinação maiores que 0,99 foram considerados lineares. Para estes, o fluxo em estado estacionário (J_s) foi determinado a partir do coeficiente linear da curva plotada para a porcentagem cumulativa de resveratrol *versus* tempo. O tempo de latência (T_L) representa o tempo necessário para que se atingisse o fluxo em estado estacionário.

5.7 PENETRAÇÃO CUTÂNEA *EX VIVO*

5.7.1 Pele humana

Amostras de pele humana excisadas da região abdominal de uma pacientes do sexo feminino que realizou cirurgia de abdominoplastia, com idade igual a 37 anos e sem doenças cutâneas prévias foram obtidas para a realização do estudo. A pele foi coletada imediatamente após a cirurgia e checada visualmente para a garantia de que estava íntegra a olho nu e inalterada pelas condições de remoção cirúrgica. Para transporte, cuja duração foi inferior a 30 min, a mesma foi mantida em recipiente isotérmico a 4 °C. Ao chegar ao laboratório do NIQUA, a gordura subcutânea e o tecido conectivo foram imediatamente removidos com o auxílio de bisturi cirúrgico. A pele foi então lavada com água corrente, embrulhadas em Parafilm (Pechiney Plastic Packaging Company, EUA) e papel alumínio e armazenada a -80 °C até sua utilização (período de armazenamento inferior a 1 mês).

Para os experimentos, a pele foi utilizada íntegra em sua espessura (*full thickness*). Ela foi retirada do *freezer* 10 min antes do uso para descongelar, e então cortada em discos circulares de 25 mm de diâmetro, sendo posicionados sobre as células de Franz de maneira aleatória.

Este protocolo seguiu o Código de Ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsinki) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo n°. 151.275).

5.7.2 Estudo de penetração cutânea *ex vivo*

O estudo de penetração cutânea foi realizado no mesmo equipamento descrito no item 5.5. Todo o experimento foi desenhado de modo a mimetizar as condições reais de uso dos produtos em humanos. Os discos de pele foram posicionados entre os compartimentos doador e receptor com o EC superiormente, e assegurando que não fossem formadas bolhas de ar entre a pele e o meio receptor. O compartimento receptor foi preenchido completamente com o meio receptor, o qual permaneceu em temperatura constante de 32 ± 2 °C e agitação constante a 600 rpm, exceto no período de coleta. Os discos de pele ficaram 30 min em contato com o meio receptor para equilíbrio da temperatura, e após este período de tempo uma alíquota de 200 µL de SER ou R-NLS (equivalente a 90 µg de resveratrol) foi aplicada na superfície da pele. Braçadeiras foram utilizadas para manter os sistemas fixos.

Alíquotas do meio receptor (1 mL) foram coletadas em intervalos regulares de tempo (0,5, 1, 2, 3, 4, 8 e 12 h após a aplicação das amostras) diretamente em *vials* para CLAE, e as células de difusão foram imediatamente repostas com o mesmo volume de meio, na mesma temperatura. A tubulação das células era rinsada com 1,5 mL de meio 30 seg antes cada coleta para evitar interferência de coletas anteriores, período no qual a agitação era interrompida. A concentração de resveratrol foi devidamente corrigida em cada coleta em relação às diluições ocasionadas pela rinsagem e pela reposição do meio. A concentração de resveratrol em cada tempo de coleta foi determinada utilizando CLAE, e cada experimento foi realizado em réplicas de seis (n=6).

5.7.3 Retenção do resveratrol na pele

Após os experimentos de permeação, cada disco de pele foi retirado das células de difusão para análise da quantidade de resveratrol retido em suas camadas. Para tanto, o EC foi separado da epiderme viável mais derme (EP + D) pela técnica de *tape stripping*, por meio da aplicação de 15 fitas adesivas (Durex[®], 3M, Brazil) (ANDRADE et al., 2014). A EP + D foi cortada em pequenos pedaços com o auxílio de bisturi cirúrgico. Fitas adesivas contendo o EC e a EP + D foram transferidas para tubos cônicos de polipropileno individuais e imersas em 5 mL de fase móvel, agitadas mecanicamente de forma vigorosa por 2 min e submetidas em banho de ultrassom por 20 min à temperatura ambiente. O conteúdo líquido de cada tubo foi então individualmente filtrado em filtros de celulose de 0,45 µm e transferido para *vials* de CLAE para quantificação do resveratrol em solução. A concentração de resveratrol foi corrigida para as diluições realizadas.

5.8 CULTURA CELULAR

A linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) foi cultivada como uma monocamada aderente em garrafas plásticas de cultura, contendo meio DMEM suplementado com 10% de SFB inativado, 100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina e 10 mM de HEPES, em pH 7,4, mantidas em estufa com atmosfera umidificada a 37 °C e com 5% de CO₂. A cada 2 ou 3 dias, as células eram passadas para novas garrafas e repostas com meio novo. Antes da realização de todos os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do Azul de Trypan e a contagem realizada em câmara de Neubauer (FRESHNEY, 1987).

5.8.1 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por meio do método de MTT (MOSMANN, 1983). O MTT é um sal tetrazólio de cor amarela, que é reduzido a formazana, de coloração azulada, pela atividade oxidativa das células, funcionando como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular.

A linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) foram cultivadas em placas de 96 poços com densidade celular de 5×10^4 células mL⁻¹, com volume de 100 µL por poço. Decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi trocado por um novo contendo os tratamentos. Poços em sextupliata foram tratados com resveratrol, C-NLS e R-NLS, em concentrações que variam entre 10 a 100 µM. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 h, o meio foi removido, e uma alíquota de 90 µL de DMEM com 10 µL de solução de MTT (5 mg mL⁻¹) foi adicionada, seguida de um período de incubação de 3 h a 37 °C. O precipitado de formazana formado foi dissolvido em 100 µL de DMSO e a absorvância foi lida a 570 nm, utilizando um leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, EUA). O grupo controle, contendo apenas meio DMEM, foi considerado como 100% de viabilidade celular. A viabilidade celular foi determinada pela equação 4 (KWON et al., 2015):

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{A\ amostra}{A\ controle} \times 100$$

Em que $A_{amostra}$ e $A_{controle}$ é o valor da absorvância obtida para a amostra e para o controle, respectivamente.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como média ± erro-padrão da média (EPM). Para a caracterização das NLS, a significância estatística foi determinada pelo teste t de *Student*. Todos os outros experimentos foram analisados empregando a Análise de Variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey para comparações de grupos, usando o *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

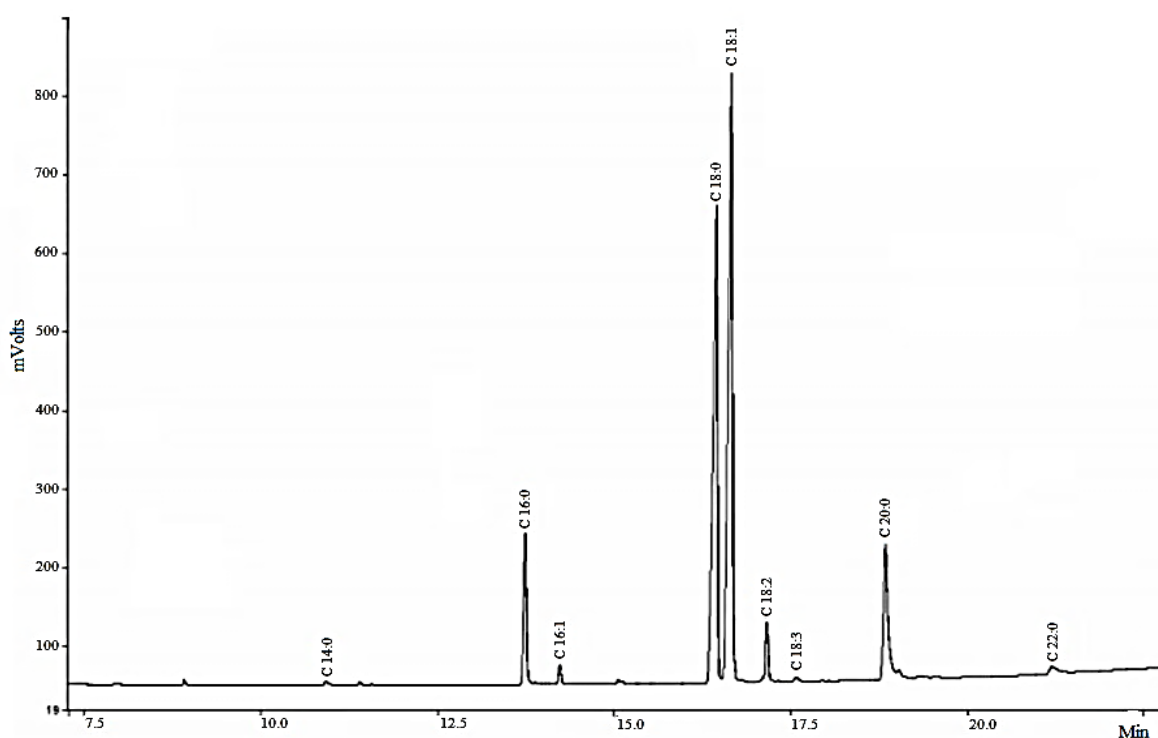
6.1 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

6.1.1 Composição química da manteiga de cupuaçu

O primeiro passo para o desenvolvimento da NLS foi determinar a composição química da manteiga de cupuaçu. Essa etapa foi crucial para o sucesso do nanocarreador produzido, uma vez que a caracterização da manteiga ajudou a auxiliar no planejamento e delineamento experimental de todo o projeto e a definir qual a característica ideal da NP produzida para a entrega do ativo com atividade antioxidante na pele, a fim de aumentar a penetração e a eficácia do mesmo.

Portanto, a caracterização química qualitativa e quantitativa da manteiga de cupuaçu foi realizada empregando a CG-AR. De acordo com a Figura 13, foram identificados nove ácidos graxos por essa técnica cromatográfica, correspondente a 99,7% de todos os componentes presentes na manteiga. Os outros constituintes não apresentados estão em concentrações inferiores à 1% na manteiga.

Figura 13 – Perfil cromatográfico da manteiga de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu).



A Tabela 4 apresenta a concentração de cada componente da manteiga de cupuaçu. Interessantemente, esse lipídeo apresentou uma composição equilibrada em número de compostos e em porcentagem de ácidos graxos saturados (5 componentes e 54,2% dos ácidos graxos totais) e insaturados (4 componentes e 45,5% dos ácidos graxos totais). Dentre os lipídeos com maior concentração, o ácido oléico (AO) apresentou-se como o mais concentrado na manteiga (41,8%), seguido pelo ácido esteárico (AE) (34,4%) e pelo ácido araquídico (AA) (10,9%). Os demais, apresentaram concentração abaixo de 10%.

Tabela 4 – Composição química da manteiga de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu).

<i>Composto</i>	<i>%</i>
C 14:0 – Ácido mirístico	0,30
C 16:0 – Ácido palmítico	7,60
C 16:1 – Ácido palmitoléico	1,00
C 18:0 – Ácido esteárico	34,40
C 18:1 – Ácido oléico	41,80
C 18:2 – Ácido linoléico	2,40
C 18:3 – Ácido linolênico	0,30
C 20:0 – Ácido araquídico	10,90
C 22:0 – Ácido behênico	1,00
<i>Total</i>	<i>99,70</i>

Devido às características lipofílicas, os ácidos graxos são considerados como um dos mais importantes promotores de penetração cutânea, ou seja, são agentes químicos capazes de alterar a função barreira da pele de maneira reversível e segura e auxiliar no aumento da taxa de penetração de ativos, diminuindo o tempo de liberação dos mesmos no sítio de ação específico. No caso da pele, os ácidos graxos intracelulares que a compõem determinam uma importante função na manutenção da propriedade de barreira do EC, formando uma camada hidrofóbica entre as células (GOLDEN; MCKIE; POTTS, 1987; SODDU et al., 2014). Logo, uma mudança da quantidade de ácidos graxos na pele, através da adição externa, pode levar a uma perturbação na função de barreira, que resultaria em um aumento da permeabilidade de muitas substâncias. Por este motivo, o AO é visto como um dos grandes responsáveis por esse quesito. Acredita-se que este ácido graxo aumenta a fluidez dos lipídeos do EC, promovendo alterações no empacotamento lipídico e aumentando a permeabilidade da membrana. Além

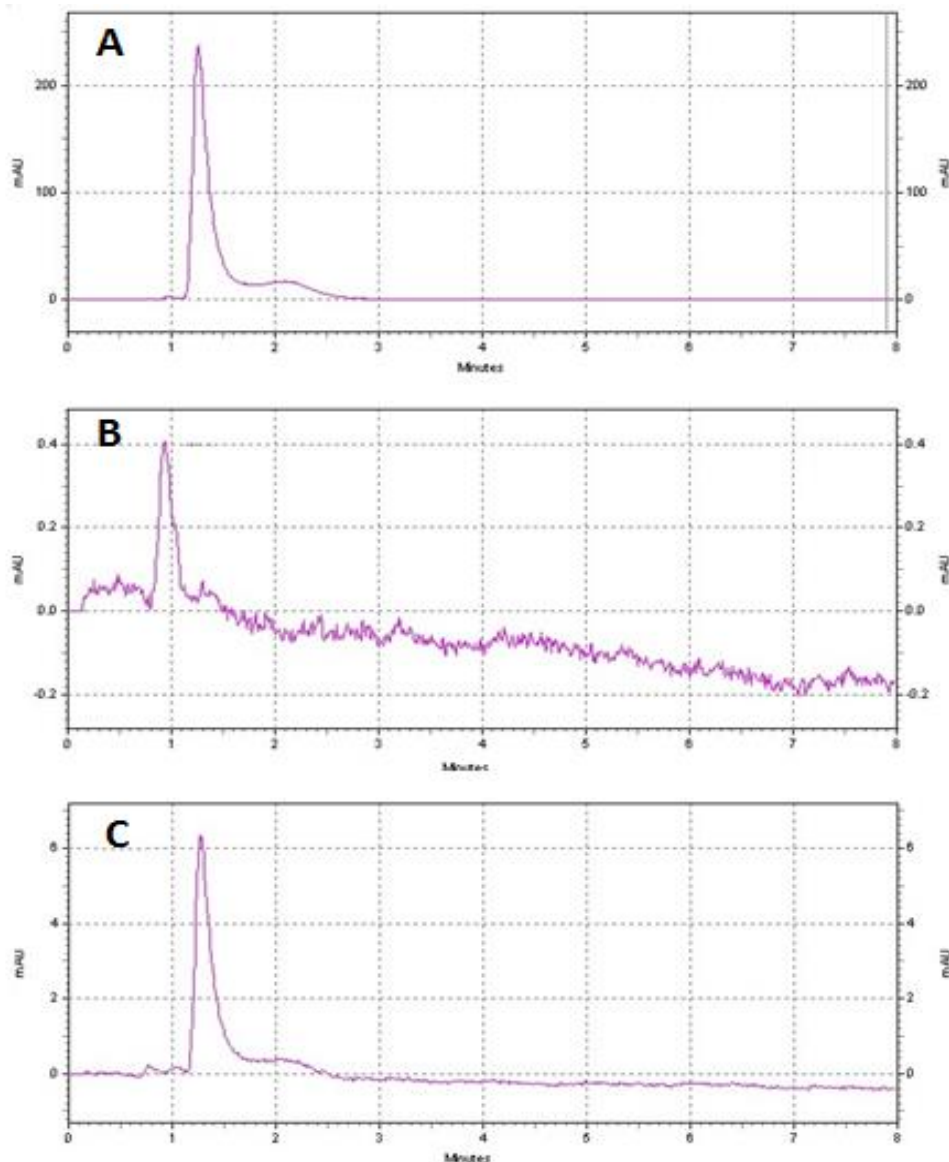
disso, evidências apontam para a separação de fases como o provável mecanismo de ação do AO, aumentando a permeabilidade transdérmica por meio da criação de uma fase mais permeável que coexiste com os lipídeos endógenos do EC (NOTMAN; ANWAR, 2013; SALES-CAMPOS et al., 2013). Por outro lado, os ácidos graxos saturados (AE e AA) aumentam a interação da NLS com o EC, auxiliando em uma penetração mais eficiente do resveratrol e da NLS nas camadas da pele.

6.1.2 Quantificação do resveratrol por CLAE

Uma vez que o método de quantificação do resveratrol já estava desenvolvido e validado pelo nosso laboratório, procedeu-se a análise de diferentes concentrações (0,5 - 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do resveratrol, em triplicata, para a obtenção da curva de calibração ($y = 152969x - 21816$; $R^2 = 0.9983$). O limite de quantificação (LQ) do método, que representa a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, foi igual a 1,88 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A especificidade, muitas vezes utilizada como um sinônimo de seletividade, define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. A Figura 14 mostra os cromatogramas obtidos durante a análise de especificidade, em que não foram observados interferentes no tempo de retenção do resveratrol (1,29 min), indicando que o método utilizado é adequado para a quantificação do resveratrol nos estudos posteriores.

Figura 14 – Cromatogramas obtidos para o resveratrol, utilizando-se o método previamente desenvolvido para quantificação do mesmo, evidenciando sua especificidade e a não interferência no método dos componentes da nanopartícula lipídica sólida.



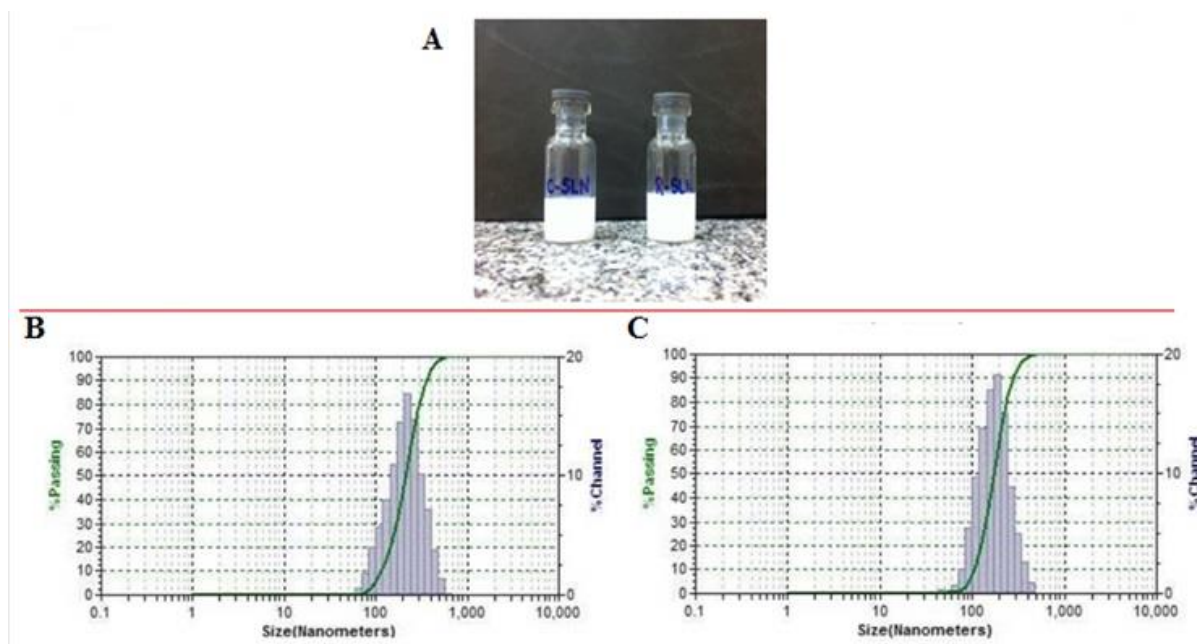
A: resveratrol, solução padrão; B: nanopartícula lipídica sólida controle (C-NLS); e C: nanopartícula lipídica sólida contendo resveratrol (R-NLS).

6.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Como passo inicial para a caracterização das NLS produzidas, o aspecto visual foi analisado a fim de confirmar a presença de um sistema homogêneo. As formulações de NLS (C-NLS e R-NLS) apresentaram aspecto macroscópico opaco, perolado e com uma baixa fluidez (Figura 15 A). A composição lipídica da manteiga pode ser responsável por essas características, visto que a utilização de misturas de lipídeos com baixo ponto de fusão contribui

para a diminuição da viscosidade, além de estarem diretamente ligados à partículas com tamanhos menores e homoganeamente distribuídas, fato este confirmado pelos resultados de tamanho médio de partícula demonstrados no histograma (Figura 15 B e 15 C).

Figura 15 – Aspecto visual e histogramas em intensidade do tamanho de partícula das nanopartículas lipídicas sólidas.



A: NLS controle (C-NLS) e NLS contendo resveratrol (R-NLS); B: histograma de intensidade do tamanho de partícula de C-NLS; e C: histograma de intensidade do tamanho de partícula de R-NLS.

Devido às características reflexivas das NLS desenvolvidas, previamente à análise de DLS, as partículas foram diluídas em água ultrapura para evitar interferências nas medidas. Os resultados obtidos por meio da leitura por DLS indicam que o método de homogeneização à quente empregando alto cisalhamento e ultrassom foi adequado para o preparo das NLS, produzindo partículas com tamanho desejado para aplicação tópica. De acordo com a Tabela 5, a C-NLS apresentou uma característica monodispersa, com um TP e PdI igual a $201,8 \pm 5,4$ nm e $0,26 \pm 0,06$, respectivamente. A incorporação do resveratrol não alterou as características desse nanossistema ($p = 0,505$ e $p = 0,289$ para TP e PdI, respectivamente), visto que os valores de TP e PdI permaneceram próximos aos encontrados na C-NLS ($195,3 \pm 7,0$ nm e $0,16 \pm 0,05$, respectivamente). Estes dados indicam que o método foi adequado para o preparo das NLS, pois foi capaz de produzir partículas com tamanho e comportamento unimodal, sugerindo NLS monodispersas e com a incorporação do resveratrol na matriz lipídica.

O PZ revelou uma carga negativa superficial para ambas as NLS. A C-NLS apresentou um PZ igual a $-17,2 \pm 0,9$ mV, e a R-NLS uma carga igual a $-19,5 \pm 1,1$ mV. Estes resultados sugerem a presença de NP estáveis, pois a agregação é menos usual de acontecer em partículas carregadas, devido à repulsão elétrica entre elas. Além disso, o Pluronic® F-127 estabilizou o sistema provavelmente pelo impedimento estérico, devido à extensa cauda monomérica de PEO, formando um revestimento hidrofílico em torno da superfície da NLS. Apesar de garantir a estabilidade do sistema de acordo com uma propriedade física, este efeito diminui a repulsão eletrostática da dispersão, fato este que justifica os valores de PZ abaixo do módulo de 30 mV.

Tabela 5 – Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).

	<i>C-NLS</i>	<i>R-NLS</i>
TP (nm)	$201,8 \pm 5,4$	$195,3 \pm 7,0$
PdI	$0,26 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,05$
PZ (‘mV)	$-17,2 \pm 0,9$	$-19,5 \pm 1,1$

NLS controle (C-NLS) e NLS contendo resveratrol (R-NLS).

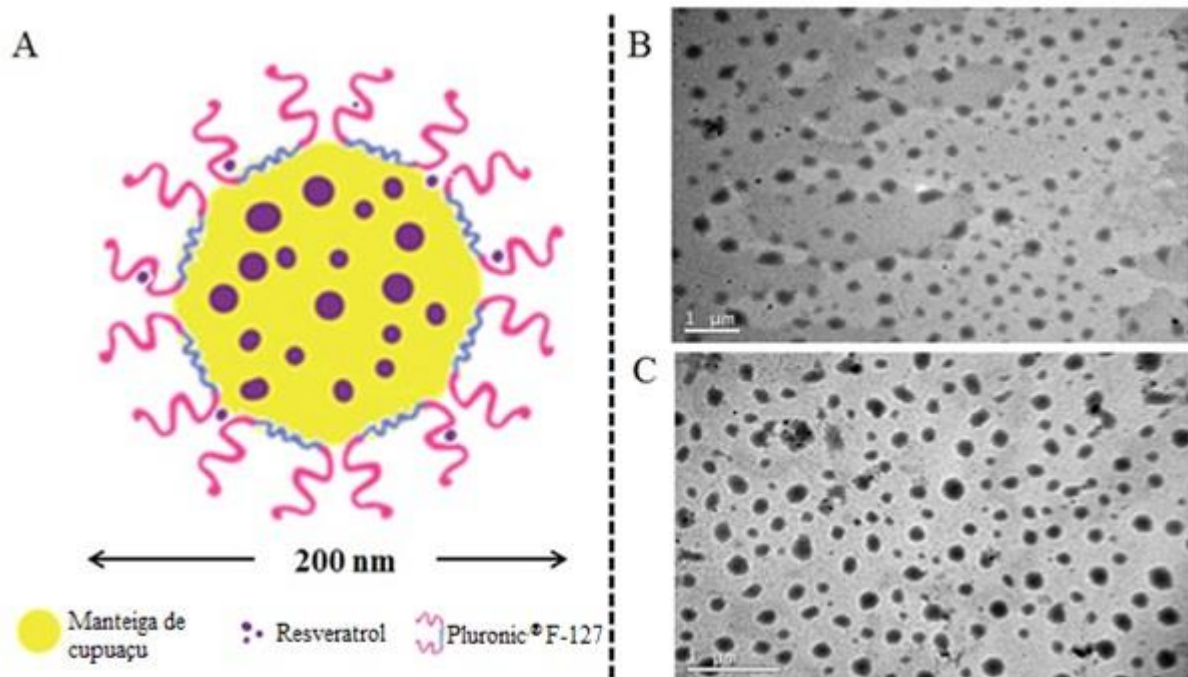
TP: tamanho de partícula; PdI: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta.

Todos os valores representam média \pm EPM (n=3).

Nenhuma diferença estatística ($p > 0,05$) foi observada entre as formulações.

Uma representação esquemática da R-NLS é apresentada na Figura 16 A. O resveratrol, pelo caráter lipofílico, encontra-se no núcleo da NLS, distribuído nas imperfeições criadas pela mistura de ácidos graxos presentes na manteiga. Porém, devido às características hidrofóbicas do monômero de PPO do polímero, uma pequena fração do polifenol pode encontrar-se distribuída na superfície do sistema (NEVES et al., 2013; PARDEIKE; HOMMOS; MÜLLER, 2009). A fim de complementar e confirmar os dados obtidos pelas análises de DLS, a morfologia da C-NLS e da R-NLS foi determinada por MET e encontra-se representada nas Figuras 16 B e 16 C, respectivamente. As NLS revelaram um formato esférico, distribuído homogeneamente, e com uma média de TP próxima a 200 nm. Tais resultados corroboram com os dados obtidos pela técnica de DLS, comprovando que as duas técnicas atuaram de forma complementar.

Figura 16 – Representação esquemática e eletromicrografias de transmissão da nanopartícula lipídica sólida (NLS) desenvolvida.



A: Representação da NLS e seus componentes; B: Eletromicrografias de transmissão de NLS controle (C-NLS) e C: contendo resveratrol (R-NLS).

6.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A EE pode ser definida como a porcentagem de ativo incorporada nos lipídeos da NLS em comparação com a concentração total do ativo adicionada no sistema (WANG et al., 2015). Durante o desenvolvimento de NLS como sistemas de liberação de ativos, é um parâmetro chave para garantir a qualidade e a reprodutibilidade da técnica utilizada para a produção. Uma elevada EE (acima de 70%) indica um processo de incorporação elevado do ativo pelo nanocarreador, visto que sua maior parte estará efetivamente na partícula (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012). A técnica de ultrafiltração-centrifugação é uma das mais empregadas para a determinação deste parâmetro. Ela consiste na utilização de uma membrana com tamanho de poro conhecido para separar a NP do meio disperso em que ela se encontra. A concentração livre do ativo é determinada no ultrafiltrado e pode ser calculada pela diferença entre a concentração inicial inserida de ativo no sistema menos a concentração de ativo livre determinada no ultrafiltrado (KHERADMANDNIA et al., 2010). O alto valor de EE encontrado na R-NLS ($74,12 \pm 2,17\%$) pode ser decorrente da composição variada da manteiga de cupuaçu. As imperfeições na estrutura lipídica permitem uma maior incorporação de ativos

no interior do nanocarreador (MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000; BATTAGLIA; GALLARATE, 2012), em razão disto, por apresentarem uma mistura de ácidos graxos com tamanhos diferentes, a R-NLS sugere um arranjo menos ordenado, o qual contribui para a encapsulação do resveratrol e justifica o elevado valor de EE encontrado.

6.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE A CURTO PRAZO

Ao desenvolver um novo sistema para liberação controlada de ativos, a estimativa da estabilidade do mesmo é crucial para o sucesso comercial (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2008). A estabilidade do armazenamento envolve aspectos físicos e químicos e inclui a prevenção de reações de degradação (por exemplo, hidrólise) e a preservação do tamanho de partícula inicial. As formulações que empregam NLS devem apresentar uma estreita distribuição do tamanho de partícula na escala nanométrica para evitar o crescimento do nanocarreador (MEHNERT; MÄDER, 2001). Além disso, partículas maiores do que 1 µm e o aumento do tamanho com o decorrer do tempo podem ser um indicador de instabilidade físico-química (MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000).

A Tabela 6 representa os valores encontrados durante o estudo de estabilidade a curto prazo das NLS produzidas. Alguns fatores essenciais para a caracterização do sistema produzido e classificação do mesmo como uma NP foram avaliados, a saber: TP, PdI e PZ. Durante o armazenamento a 4 °C por 30 dias, não houve alteração significativa para os parâmetros analisados de TP ($p = 0,384$), PdI ($p = 0,224$) e PZ($p = 0,311$), demonstrando a presença de um sistema nanoparticulado estável para a incorporação de resveratrol.

Tabela 6 – Avaliação da estabilidade a curto prazo das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), armazenadas a 4 °C por 0, 7, 15 e 30 dias.

<i>Tempo</i> <i>(dias)</i>	<i>C-NLS</i>			<i>R-NLS</i>		
	<i>TP (nm)</i>	<i>PdI</i>	<i>PZ (mV)</i>	<i>TP (nm)</i>	<i>PdI</i>	<i>PZ (mV)</i>
0	201,8 ± 5,4	0,26 ± 0,06	-17,2 ± 0,9	195,3 ± 7,0	0,16 ± 0,05	-19,5 ± 1,1
7	205,6 ± 3,9	0,25 ± 0,03	-15,2 ± 1,1	194,4 ± 5,2	0,23 ± 0,06	-20,1 ± 0,9
15	205,8 ± 6,4	0,18 ± 0,05	-17,1 ± 0,7	192,3 ± 4,8	0,19 ± 0,05	-19,3 ± 1,0
30	200,9 ± 4,5	0,19 ± 0,06	-18,8 ± 0,6	198,8 ± 6,2	0,21 ± 0,03	-17,5 ± 0,8

NLS controle (C-NLS) e NLS contendo resveratrol (R-NLS).

TP: tamanho de partícula; PdI: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta.

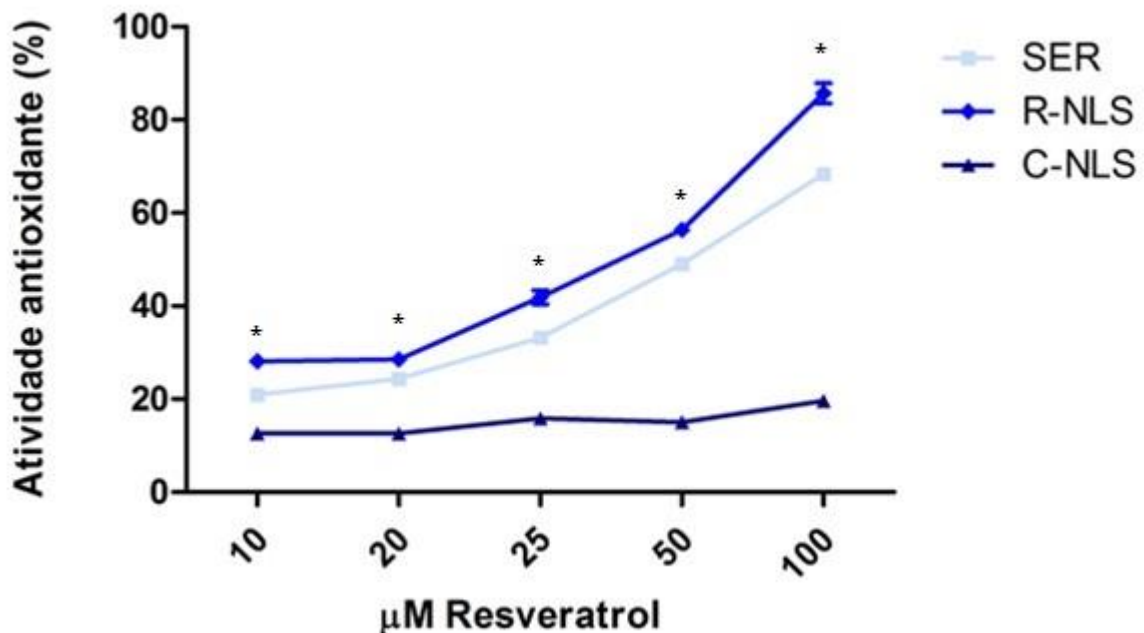
Todos os valores representam média ± EPM (n=3).

Nenhuma diferença estatística ($p > 0,05$) foi observada entre as formulações.

6.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A medida da atividade antioxidante determinada por meio do método do DPPH, baseia-se no princípio de que esse radical, estável e de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para ser reduzido na presença de um composto antioxidante, adquirindo coloração amarela (BLACK, 2015). Os mecanismos pelo qual os antioxidantes são capazes de neutralizar radicais livres estão relacionados com a estrutura básica dos compostos e a presença de grupos hidroxilas (ALONSO et al., 2013). O Gráfico 1 mostra a atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH das R-NLS comparadas com a SER e a C-NLS. O resveratrol encapsulado pela R-NLS apresentou uma maior atividade antioxidante em comparação com os outros tratamentos ($p < 0,0001$). Por exemplo, na concentração de 100 μM , a R-NLS apresentou uma atividade de $85,70 \pm 2,15\%$, superior ao encontrado pela SER ($68,38 \pm 1,13\%$) e C-NLS ($19,62 \pm 0,77\%$) na mesma diluição, indicando que a encapsulação do resveratrol na R-NLS auxilia no aumento da atividade antioxidante do composto.

Gráfico 1 – Atividade antioxidante de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) utilizando o método do DPPH.



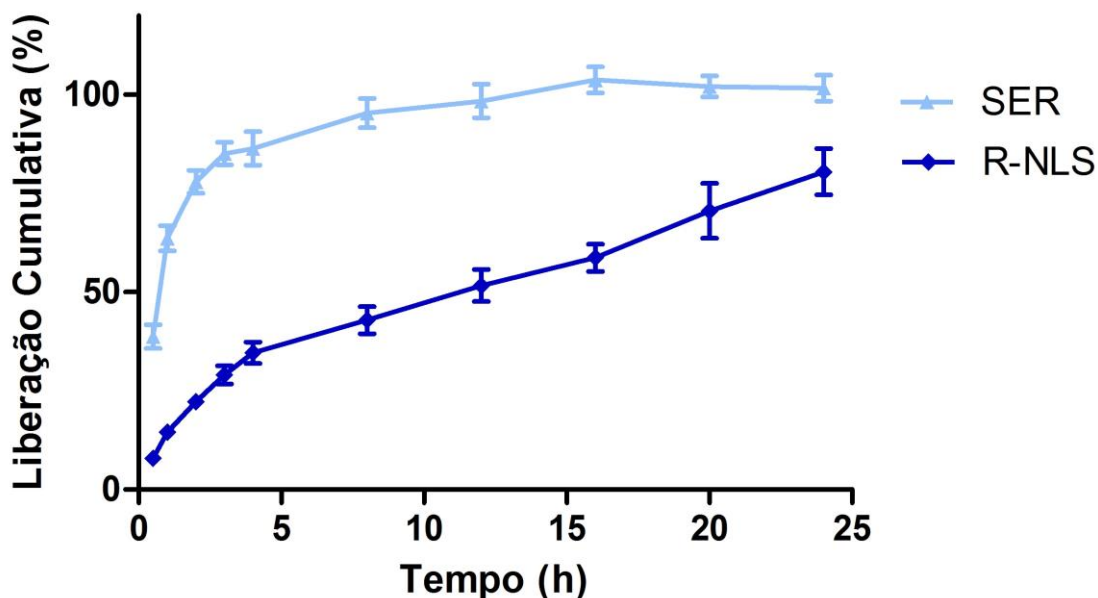
NLS controle (C-NLS); NLS contendo resveratrol (R-NLS); solução etanólica de resveratrol (SER).
 Todos os valores representam média \pm EPM (n=3).

* Diferença estatística ($p < 0,0001$) entre os tratamentos, na mesma concentração.

Uma outra maneira de se expressar a atividade antioxidante é por meio da CE_{50} , ou seja, a concentração para o composto antioxidante reduzir em 50% a quantidade do radical DPPH inicialmente na reação. Os valores de CE_{50} foram calculados através da regressão linear da equação da reta obtida e produziu um efeito dose-dependente para o resveratrol utilizado no preparo da R-NLS e da SER. Por meio dessa equação, consegue-se avaliar a presença de uma resposta dependente da dose de resveratrol utilizada. O valor de CE_{50} obtido para a R-NLS foi de $0,41 \pm 0,03$ (μM de resveratrol/ μM de DPPH), valor menor do que o obtido para a SER de $0,64 \pm 0,05$ (μM de resveratrol/ μM de DPPH). Estes dados mostram que é necessário cerca de 40% menos resveratrol, quando o mesmo apresenta-se nanoencapsulado, para obter-se o mesmo valor de atividade antioxidante em comparação ao ativo presente em solução etanólica. Este resultado observado pode ser consequência de um sinergismo entre o resveratrol e a R-NLS, cuja composição inclui lipídeos que exercem uma atividade antioxidante moderada (CHO; HONG; LEE, 2010; XU et al., 2005).

6.6 ESTUDOS DE PERFIL E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Previamente ao ensaio de permeação cutânea, o teste de liberação do resveratrol e o estudo de cinética deste processo foram realizados. O teste de liberação de ativos é uma forma para avaliar a liberação dos mesmos em sistemas nanoestruturados e prever como tais sistemas se comportarão frente a meios biológicos, como a pele. Ele consiste em um teste para prover uma avaliação comparativa de produtos inovadores com os já disponíveis no mercado, além de funcionar como um parâmetro para o controle de qualidade dos produtos desenvolvidos (BABY et al., 2009). Para tanto, os perfis de liberação *in vitro* do resveratrol a partir da R-NLS e SER foram construídos e se encontram no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Perfis de liberação *in vitro* do resveratrol.

Nanopartículas lipídicas sólidas contendo resveratrol (R-NLS); solução etanólica de resveratrol (SER).

Todos os valores representam média \pm EPM (n=6).

Pode-se verificar a partir dos resultados demonstrados no Gráfico 2 que o resveratrol presente na SER difundiu-se livremente e rapidamente permeou a membrana de polisulfona, sendo que praticamente todo o polifenol presente na SER foi liberado do sistema em menos de 10 h. No entanto, a R-NLS apresentou um perfil de liberação não linear. Isto indica um perfil de liberação que segue um padrão bifásico, ou seja, ele apresenta uma liberação rápida no início do processo e após um determinado tempo, o sistema promove uma liberação controlada do ativo. De fato, constatou-se que, após um curto tempo de latência, a R-NLS promoveu uma brusca liberação do ativo ($34,66 \pm 5,82\%$ de resveratrol) nas primeiras 4 h, seguido de controlada até o final das 24 h de estudo, atingindo a porcentagem cumulativa de resveratrol de $80,48 \pm 12,20\%$ liberado da R-NLS.

Durante as primeiras 4 h, a rápida liberação observada pode ser devido à presença de algumas moléculas do resveratrol próximas à superfície da R-NLS. Tal fato pode ser causado pelo monômero de PEO presente na fase aquosa da dispersão coloidal. Este polímero pode auxiliar no aumento da solubilidade do resveratrol, visto que o mesmo, apesar de sua natureza lipofílica, apresenta três grupos hidroxila em sua estrutura, ajudando na localização de moléculas na interface com a região hidrofílica, promovendo uma rápida liberação do ativo pelo

sistema (NIE et al., 2011; TESKAC; KRISTL, 2010; KUPETZ; BUNJES, 2014). Do mesmo modo, a liberação controlada pode ser atribuída à difusão das moléculas através da matriz lipídica da NLS, o que pode ser confirmado através do estudo de cinética de liberação do resveratrol pela R-NLS.

Para determinar o mecanismo de cinética de liberação do ativo e prever o comportamento de difusão do resveratrol pela R-NLS, os resultados obtidos foram tratados matematicamente, empregando-se o modelo de regressão linear. Os dados foram utilizados em modelos cinéticos com o objetivo de se verificar qual o exato mecanismo de liberação (Tabela 7). Tais modelos auxiliam na predição da taxa de liberação do fármaco e também no comportamento durante a difusão dos mesmos a partir da NP, sendo útil para a compreensão da física envolvida no fenômeno de transporte (PEPPAS; NARASIMHAN, 2014; SHARMA; WALKER; PATHAK, 2011).

Tabela 7 – Modelos matemáticos utilizados para a determinação do perfil de cinética de liberação do resveratrol das nanopartículas lipídicas sólidas (R-NLS).

<i>Formulação</i>	<i>Modelo cinético</i>	<i>Equação da reta</i>	<i>R²</i>	<i>J_s</i> <i>($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)</i>	<i>T_L</i> <i>(h)</i>
R-NLS	Ordem-zero	$y = 0,032x + 0,617$	0,757		
	Higuchi	$y = 3,884x - 0,273$	0,991	3,88	0,29
	Primeira-ordem	$y = 0,673x - 3,939$	0,958		

J_s: fluxo estacionário. *T_L*: tempo de latência.

Como demonstrado na Tabela 7, a liberação segue o modelo de Higuchi ($y = 3,884x - 0,2732$, $R^2 = 0,991$), ou seja, o mecanismo de liberação do resveratrol é um processo de difusão que obedece à lei de Fick e é dependente da raiz quadrada do tempo. Vários sistemas contendo NLS são descritos na literatura seguindo o mesmo modelo encontrado neste estudo (KASHANIAN; AZANDARYANI; DERAKHSHANDEH, 2011; LIU et al., 2007; TIYABOONCHAI; TUNGPRADIT; PLIANBANGCHANG, 2007). Isto indica que o perfil de liberação é controlado pela difusão do ativo através do núcleo lipídico e, posteriormente, pela difusão na matriz polimérica, o que descreve um processo de liberação passiva do veículo para o meio receptor (COUTO et al., 2014).

Do ponto de vista terapêutico, uma rápida liberação inicial é considerada vantajosa, visto que pequenas quantidades de resveratrol são entregues rapidamente ao sítio de ação, exercendo um efeito terapêutico já nas primeiras horas de administração. Em conjunto, a

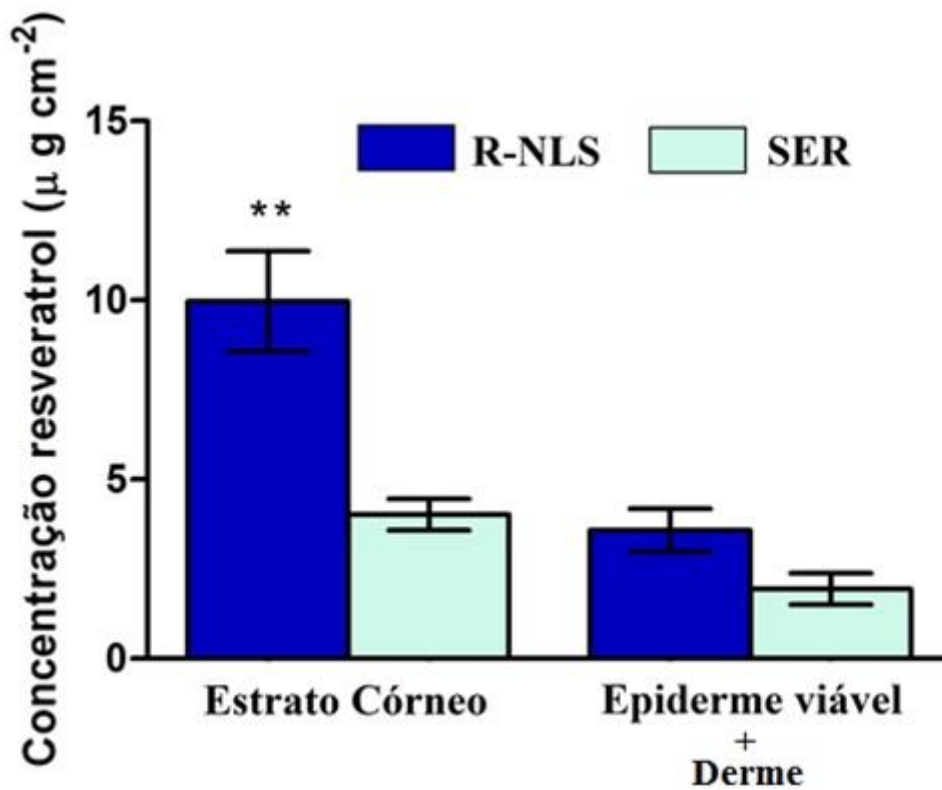
subsequente liberação controlada do ativo ainda presente na R-NLS é benéfico para o paciente, pois auxilia na manutenção de uma dose terapêutica segura e prolongada, sem a necessidade de aplicações recorrentes (BUNJES, 2011).

6.7 ESTUDOS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA *EX VIVO*

Neste estudo, optou-se pela utilização de um protocolo para o estudo de penetração um pouco diferente para este tipo de estudo e dos estudos de liberação *in vitro* previamente realizados. A primeira alteração é relacionada com o tempo de estudo, já que optou-se por realizar os experimentos com uma duração de 12 h, e não as convencionais 24 h. Isto foi baseado no fato de que, como o desenvolvimento da R-NLS visa a aplicação dermatológica, um tempo maior de estudo poderia não corresponder ao que de fato se observa na utilização de produtos deste segmento. Outra variação está no fato de se ter utilizado pele íntegra, *full thickness*. Isso foi selecionado porque a espessura da pele afeta sobremaneira o resultado de experimentos de permeação (KLANG et al., 2012), então a utilização de pele sem dermatomização ajuda a mimetizar as condições fisiológicas de aplicação, um dos cerne de nosso desenho experimental (POLONINI, 2014).

Isto posto, o estudo de penetração cutânea do resveratrol presente na R-NLS e SER foi realizado e os resultados estão expressos no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Penetração cutânea do resveratrol.



Nanopartículas lipídicas sólidas contendo resveratrol (R-NLS); solução etanólica de resveratrol (SER). Todos os valores representam média \pm EPM (n=6).
 ** Diferença estatística ($p = 0,0007$).

Com base nos resultados, pode-se notar que a R-NLS foi capaz de aumentar a concentração de resveratrol que penetrou no EC. Comparando com a SER, a concentração do resveratrol no EC teve um aumento de 2,48 vezes com a utilização da R-NLS após 12 h. Tal diferença provavelmente está relacionada com a composição equilibrada de ácidos graxo da manteiga de cupuaçu utilizada no preparo deste nanocarreador. O AO, principal ácido graxo insaturado presente na manteiga, apresenta ligações duplas capazes de alterar e causar danos reversíveis na arquitetura da bicamada lipídica presente na pele, com isso, facilita a interação da R-NLS com as camadas cutâneas e promove uma maior liberação do ativo nas mesmas. Concomitantemente, a presença de ácidos graxos saturados (AE e AA) controlam a hidratação da pele e, conseqüentemente, da penetração da R-NLS, que fica retida na camada do EC (KANDIMALLA et al., 1999; ALEXANDER et al., 2012). Além disso, esse acúmulo da R-NLS na pele favorece o contato desse sistema com as junções de corneócitos e apêndices epidérmicos presentes entre eles, aumentando a hidratação da pele (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; CEVC, 2004; KYADARKUNTE, 2014).

De maneira interessante, a maior concentração de resveratrol presente no EC pode estar relacionada com a rápida liberação inicial do mesmo a partir da R-NLS nas primeiras horas. Apesar do fluxo de liberação do resveratrol calculado ser igual a $3,88 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$; após 12 h de estudo foi possível observar a penetração de uma quantidade igual a $13,97 \mu\text{g cm}^{-2}$ do ativo na pele, menor do que a esperada. Isto pode ser explicado de acordo com o Gráfico 2, em que, após 12 h de estudo, cerca de 60% de resveratrol ainda estava presente na R-NLS, o que explica a diferença entre o fluxo de liberação calculado e o valor retido na pele.

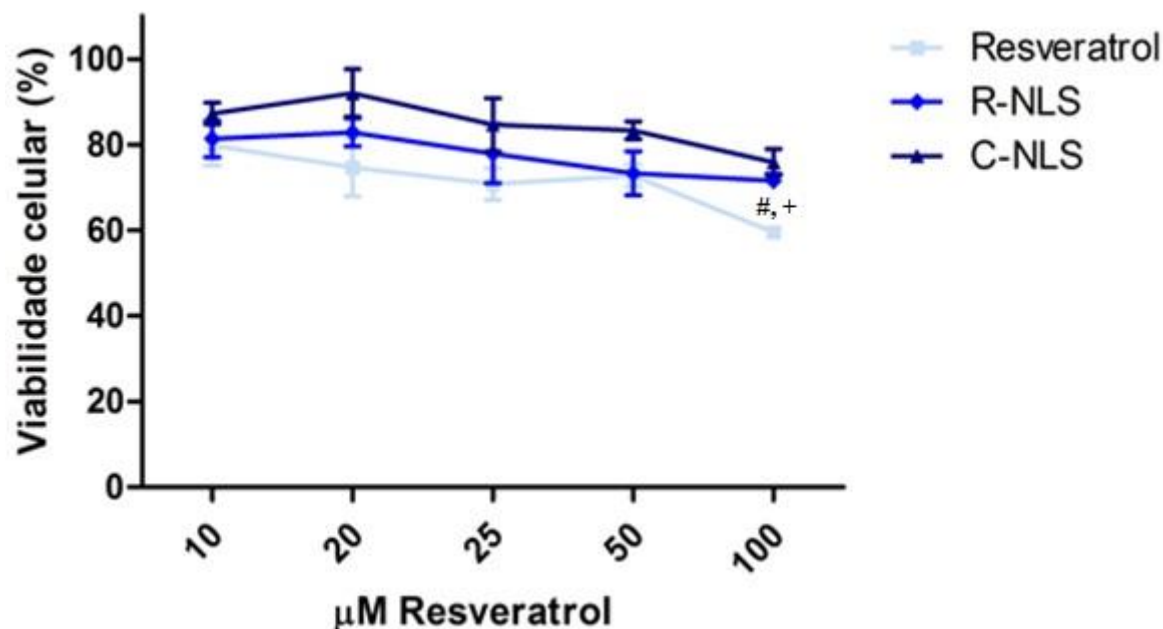
Por outro lado, a SER não conseguiu uma penetração eficiente na pele quando comparada com a R-NLS. Para avaliar tal fato, a concentração do resveratrol presente na solução receptora foi quantificada por meio da CLAE após o término do estudo. No entanto, a quantidade de ativo contida no meio receptor não atingiu o LQ estabelecido pelo método desenvolvido ($1,88 \mu\text{g mL}^{-1}$), o que indica que tanto a R-NLS quanto a SER não promovem a permeação do resveratrol através da pele. Esta característica é de grande interesse para o desenvolvimento e comercialização de produtos inovadores para a área de dermatologia, visto que a permeação do princípio ativo após a aplicação tópica do nanocarreador não é desejada, a fim de se evitar a passagem do ativo para a corrente sanguínea (JENSEN; PETERSSON; NIELSEN, 2011).

6.8 VIABILIDADE CELULAR

Apesar de serem considerados fisiologicamente bem toleráveis, os lipídeos utilizados para o preparo de NLS muitas vezes apresentam citotoxicidade em células constituintes da epiderme (LIANG; CHOU, 2009; MUSAZZI et al., 2014). Os queratinócitos são os tipos celulares mais comuns encontrados na epiderme (cerca de 90% de sua constituição), sendo usualmente utilizados como modelo celular para estudos de citotoxicidade (LOHAN et al., 2014; RANCAN et al., 2014).

Portanto, com o objetivo de entender os efeitos da NLS produzida sobre a viabilidade celular, C-NLS e R-NLS foram testados em cultura de queratinócitos humanos (linhagem HaCaT) (Gráfico 4). Um controle positivo utilizando resveratrol foi testado, a fim de verificar se a NLS apresentava propriedades mais seguras que o ativo em si. Para a realização deste estudo, as doses de resveratrol variaram de $10 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$, por já existirem na literatura relatos que descrevem atividades antioxidante e anti-envelhecimento nessa faixa de concentração (GOKCE et al., 2012; KASIOTIS et al., 2013; SOEUR et al., 2015).

Gráfico 4 – Viabilidade *in vitro* de queratinócitos humanos após tratamento com resveratrol e nanopartículas lipídicas sólidas.



Resveratrol: suspensão de resveratrol em meio de cultivo DMEM; nanopartículas lipídicas sólidas contendo resveratrol (R-NLS); nanopartículas lipídicas sólidas controle (C-NLS).

A viabilidade do grupo não tratado foi considerada como 100% de viabilidade celular.

Todos os valores representam média \pm EPM (n=6).

Diferença estatística ($p = 0,0189$) em relação ao R-NLS; + Diferença estatística ($p = 0,0127$) em relação ao C-NLS.

De acordo com a ISO 10993-5, considera-se que um tratamento apresenta citotoxicidade quando a viabilidade celular é reduzida em mais de 30% (ISO, 2009). Neste estudo, comparando-se os grupos tratados com C-NLS e R-NLS, não foram verificadas diferenças estatísticas em todas as concentrações utilizadas no teste. Sendo que, para os dois nanocarreadores, a viabilidade celular ficou acima de 70%. No entanto, ao comparar o tratamento de resveratrol com as amostras R-NLS e C-NLS, na concentração de 100 μ M, observa-se uma redução de aproximadamente 20% na viabilidade celular. Em comparação com o grupo de células não tratadas, houve uma queda de 60% na viabilidade com o tratamento de resveratrol a 100 μ M. Os resultados obtidos sugerem que a incorporação do resveratrol na R-NLS auxiliou na redução da citotoxicidade do ativo e que os sistemas desenvolvidos (C-NLS e R-NLS) podem ser considerados seguros pela regulamentação vigente, o que torna esse sistema promissor na incorporação de ativos antioxidantes para uso tópico.

7. CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que:

- O método proposto para o desenvolvimento da NLS mostrou-se adequado, produzindo nanocarreadores com tamanho de partícula satisfatório para o que se destina (aplicação tópica) e com distribuição homogênea;
- O estudo de microscopia eletrônica mostrou que a NLS produzida apresentaram formato esférico;
- O estudo de estabilidade demonstrou que a NLS é estável na dispersão aquosa por pelo menos 30 dias, quando mantidas refrigeradas a 4 °C;
- A atividade antioxidante *in vitro* do resveratrol foi significativamente potencializada quando o mesmo encontrou-se encapsulado na R-NLS, quando comparado com a SER;
- O estudo *in vitro* de liberação evidenciou uma liberação controlada de resveratrol a partir da R-NLS, seguindo modelo de cinética de difusão de Higuchi;
- O estudo *ex vivo* de penetração demonstrou que a R-NLS desenvolvida aumenta significativamente a penetração e a retenção do resveratrol no estrato córneo;
- A NLS desenvolvida apresentou-se segura quando avaliadas em modelo de cultivo de células de queratinócitos humano e nas condições experimentais;
- Os resultados obtidos demonstram o alto potencial da R-NLS desenvolvida através de manteiga natural em ser incorporada em formulações cosméticas para a liberação controlada do resveratrol nas diversas camadas da pele.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, A.; AJAZUDDIN; KHAN, J.; SARAF, S.; SARAF, S. Poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid) based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 172, p. 715-729, 2013.
- ALEXANDER, A.; DWIVEDI, S.; AJAZUDDIN; GIRI, T.K.; SARAF, S.; SARAF, S.; TRIPATHI, D.K. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 164, p. 26-40, 2012.
- ALMEIDA, H.; AMARAL, M.H.; LOBÃO, P.; LOBO, J.M. Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 592-605, 2012.
- ALONSO, C.; MARTÍ, M.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, L.; PARRA, J.L.; CODERCH, L.. Antioxidant cosmeo-textiles: Skin assessment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, p. 192-199, 2013.
- ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.Y; KALIA, N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 53-62, 2004.
- AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 413-420, 1995.
- AMRI, A; CHAUMEIL, J.C.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. Administration of resveratrol: what formulation solutions to bioavailability limitations?. **Journal of Controlled Release**, v. 158, p. 182-192, 2012.
- ANDRADE, L. M.; DE FÁTIMA REIS, C.; MAIONE-SILVA, L.; ANJOS, J.L.V.; ALONSO, A.; SERPA, R.C.; MARRETO, R.N.; LIMA, E.M.; TAVEIRA, S.F. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, *in vitro* release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, p. 40-47, 2014.
- ARAÚJO, J.; GARCIA, M. L.; MALLANDRICH, M.; SOUTO, E. B.; CALPENA, A. C. Release profile and transscleral permeation of triamcinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers (TA-NLC): *In vitro* and *ex vivo* studies. **Nanomedicine**, v. 8, p. 1034-1041, 2012.
- AVANTAGGIATO, A.; BERTUZZI, G.; PASCALI, M.; CANDOTTO, V.; CARINCI, F. The theories of aging: reactive oxygen species and what else? **Journal of Biological**

Regulators and Homeostatic Agents, v. 29, p. 156-163, 2015.

AZIZ, M. H.; AFAQ, F.; AHMAD, N. Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin. **Photochemistry and photobiology**, v. 81, p. 25–31, 2005.

BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.. Influence of urea, isopropanol, and propylene glycol on rutin in vitro release from cosmetic semisolid systems estimated by factorial design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, p. 272-282, 2009.

BANDO, N., HAYASHI, H., WAKAMATSU, S., INAKUMA, T., MIYOSHI, M., NAGAO, A., YAMAUCHI, R., TERAOKA, J. Participation of singlet oxygen in ultraviolet-A-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary beta-carotene: an ex vivo study. **Free Radicals and Molecular Biology**, v. 37, p. 1854–1863, 2004.

BARRY, B. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, p.101-114, 2001.

BARUA, S.; MITRAGOTRI, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. **Nano Today**, v. 9, p. 223–243, 2014.

BASTIANETTO, S.; DUMONT, Y.; DURANTON, A.; VERCAUTEREN, F.; BRETON, L.; QUIRION, R. Protective action of resveratrol in human skin: Possible involvement of specific receptor binding sites. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1–12, 2010.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Experts Opinion in Drug Delivery**, v. 9, p. 497-508, 2012.

BAUMANN, L. **Dermatologia cosmética: princípios e prática**. 1. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. 238 p.

BAUR, J. A; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, p. 493–506, 2006.

BLACK, H.S. The role of nutritional lipids and antioxidants in UV-induced skin cancer. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 20-29, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e Bioanalíticos. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 15 out. 2015.

BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid Interface Science**, v. 16, p. 405-411, 2011.

- BURYANOVSKYY, L.; FU, Y.; BOYD, M.; MA, Y.; HSIEH, T.C.; WU, J.M.; ZHANG, Z. Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. **Biochemistry**, v. 43, p. 11417–11426, 2004.
- CADDEO, C.; MANCONI, M.; CARDIA, M.C.; SALES, D.O.; FADDA, A.M.; SINICO, C. Investigating the interactions of resveratrol with phospholipid vesicle bilayer and the skin: NMR studies and confocal imaging. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 484, n. 1-2, p. 138–145, 2015.
- CATALGOL, B.; BATIREL, S.; TAGA, Y.; OZER, N.K. Resveratrol: French Paradox revisited. **Frontiers in Pharmacology**, v. 141, p. 3-18, 2012.
- CHAN, M.M. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 99-104, 2003.
- CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 675–711, 2004.
- CHO, Y.S.; MOON, H. The role of oxidative stress in the pathogenesis of asthma. **Allergy, Asthma and Immunology Research**, v. 2, p. 183-187, 2010.
- CHO, K.H.; HONG, J.H.; LEE, K.T. Monoacylglycerol (MAG)-oleic acid has stronger antioxidant, anti-atherosclerotic, and protein glycation inhibitory activities than MAG-palmitic acid. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 99-107, 2010.
- CHRISTIE, W.W.; HAN, X. Lipid Analysis: Isolation, separation identification and lipidomic analysis. Oily Press. 4 Ed, 2010, 448 p.
- CORRE, L.L.; FUSTIER, P.; CHALABI, N.; BIGNON, Y.J.; GALLON, D.B. Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA 1 oncosuppressor in human breast cell lines. **Clinica Chimica Acta**, v. 344, p. 115-121, 2004.
- COUTO, A.; FERNANDES, R.; CORDEIRO, M.N.; REIS, S.S.; RIBEIRO, R.T.; PESSOA, A.M. Dermic diffusion and stratum corneum: a state of the art review of mathematical models. **Journal of Controlled Release**, v. 177, p. 74-83, 2014.
- DARVIN, M. E.; FLUHR, J. W.; MEINKE, M. C.; ZASTROW, L.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Topical beta-carotene protects against infra-red-light-induced free radicals. **Experimental Dermatology**, v. 20, p. 125–129, 2011.
- DAS, S.; NG, K. Quantification of trans-resveratrol in rat plasma by a simple and sensitive high performance liquid chromatography method and its application in pre-clinical study.

Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 34, p. 1399–1414, 2011.

DEMIREL, M.; YAZAN, Y.; MÜLLER, R.H.; KILIÇ, F.; BOZAN, B. Formulation and in vitro- in vivo evaluation of piribedil solid lipid micro- and nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, p. 359-371, 2001.

DETONI, C.B.; SOUTO, G.D.; DA SILVA, A.L.M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 913–921, 2012.

DOCHERTY, J.J.; SMITH, J.S.; FU, M.M.; STONER, T.; BOOTH, T. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. **Antiviral Research**, v. 61, n. 1, p. 19-26, 2004.

DUAN, M.; ZHOU, H.; YAN, Z. **Nanoemulsion of resveratrol-phospholipid complex and method for preparing the same and applications thereof**, US 2011/ 0009496, EUA, 2011.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry on Nonsterile Semisolid Dosage Forms – Scale-up and Postapproval Changes: chemistry, manufacturing, and controls, In vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation, 1997.

FLECK, C.A.; NEWMAN, M. Advanced skin care – a novel ingredient. **Journal of the American College of Clinical Wound Specialists**, v. 4, p. 92-94, 2012.

FLORENCE, A.T., ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 1 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 66 p., 2003.

FRESHNEY, R. **Culture of animals cells: A manual of basic technique**. 1 ed. New York: Alan R. Liss. Inc., 117 p., 1987.

FULDA, S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 757–765, 2010.

GODIC, A.; POLJSKAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

GOLDEN, G.M.; MCKIE, J.E.; POTTS, R.O. Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 76, p. 25-28, 1987.

GOKCE, E. H.; KORKMAZ, E.; DELLERA, E.; et al. Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: Evaluation of antioxidant potential for

dermal applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1841–1850, 2012.

GRANT, R.S.; LINDBECK, K. **Pharmaceutical compositions of resveratrol**, WO 2013056298, EUA, 2012.

GRAF, R.; COUVREUR, P. Nanocapsules: preparation, characterization and therapeutic application. In: **Nanoparticulates as Drug Carriers**, EUA, p. 255 - 276, 2006.

HALL, S. S.; MITRAGOTRI, S.; DAUGHERTY, P. S. Identification of peptide ligands facilitating nanoparticle attachment to erythrocytes. **Biotechnology Progress**, v.23, p.749-754, 2007.

HALLS, C.; YU, O. Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 77-81, 2008.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, p. 125-130, 2011.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HOFFMANN, F.; CINATL, J.; KABICKOVÁ, H.; CINATL, J.; KREUTER, J.; STIENEKER, F. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal Pharmaceutics**, v. 157, p. 157- 189, 1997.

HOU, D.; XIE, C.; HUANG, K.; ZHU, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials**, v. 24, p. 1781-1785, 2003.

HOWITZ, K.T.; BITTERMAN, K.J.; COHEN, H.Y.; LAMMING, D.W.; LAVU, S.; WOOD, J.G.; ZIPKIN, R.E.; CHUNG, P.; KISIELEWSKI, A.; ZHANG, L.L.; SCHERER, B., SINCLAIR, D.A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v. 425, p. 191-196, 2003.

HUANG, X.; MAZZA, G. Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, piceid and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3890-3899, 2011.

HUNG, C.-F.; LIN, Y.-K.; HUANG, Z.-R.; FANG, J.-Y. Delivery of resveratrol, a red wine polyphenol, from solutions and hydrogels via the skin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 955–962, 2008.

HURST, W.J.; TARKA, S.M.; POWIS, T.G.; VALDEZ, F.; HESTER, T.R. Archaeology: cacao usage by the earliest Maya civilization. **Nature**, v. 418, p. 289-290, 2002.

IDO, Y.; DURANTON, A.; LAN, F.; WEIKEL, K.A.; BRETON, L.; RUDERMAN, N.B. Resveratrol prevents oxidative stress-induced senescence and proliferative dysfunction by activating the AMPK-FOXO3 cascade in cultured primary human keratinocytes. **PLoS One**, v. 10, e0115341, 2015.

ISO - International Organization for Standardization. ISO/ TC 229 - Nanotechnologies. Genebra, 2008.

ISO - International Organization for Standardization. ISO 10993-5: 2009 - Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Genebra, 2009.

JAGDEO, J.; ADAMS, L.; LEV-TOV, H.; SIEMINSKA, J.; MICHL, J.; BRODY, N. Dose-dependent antioxidant function of resveratrol demonstrated via modulation of reactive oxygen species in normal human skin fibroblasts in vitro. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 9, p. 1523–1526, 2010.

JANG, Y.C.; REMMEN, H.V. The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models. **Experimental Gerontology**, v. 44, p. 256-260, 2009.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K. K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, v. 36, p. 117–122, 2003.

JENSEN, L. B.; PETERSSON, K.; NIELSEN, H. M. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 68–75, 2011.

JESUS, M.B.; ZUHORN, I.S. Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: properties and molecular mechanisms. **Journal of Controlled Release**, v. 201, p. 1-13, 2015.

JOHANSEN, J.S.; HARRIS, A.K.; RYCHLY, D.J.; ERQUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 4, p. 1-5, 2005.

JOHANSSON, J.A.; HEADON, D.J. Regionalisation of the skin. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 25, p. 3-10, 2014.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. Pele e Anexos. In: **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 359-370.

KABANOV, A.V.; BATRAKOVA, E.V.; ALAHKOV, V.Y. Pluronic block copolymers as

novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 189-212, 2002.

KANDIMALLA, K.; KANIKKANNAN, N. S.; ANDEGA, S; SINGH, M. Effect of fatty acids on the permeation of melatonin across rat and pig skin in vitro and on the transepidermal water loss in rats in vivo. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 783-790, 1999.

KARANDE, P.; MITRAGOTRI, S. Transcutaneous immunization: an overview of advantages, disease targets, vaccines, and delivery technologies. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 1, p. 175-201, 2010.

KASHANIAN, S.; AZANDARYANI, A. H.; DERAKHSHANDEH, K. New surface-modified solid lipid nanoparticles using N-glutaryl phosphatidylethanolamine as the outer shell. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2393–2401, 2011.

KASIOTIS, K. M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; HAROUTOUNIAN, S. A. Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 112–120, 2013.

KELKEL, M.; JACOB, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M.; Potential of the dietary antioxidants resveratrol and curcumin in prevention and treatment of hematologic malignancies. **Molecules**, v. 15, p. 7035-7074, 2010.

KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M., ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine**, v. 6, p.753-759, 2010.

KLANG, V.; HABERFELD, S.; HARTL, A.; VALENTA, C. Effect of γ -cyclodextrin on the in vitro skin permeation of a steroidal drug from nanoemulsions: impact of experimental setup. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 535-542, 2012.

KLANG, V.; VALENTA, C.; MATSKO, N.B. Electron microscopy of pharmaceutical systems. **Micron**, v. 44, p. 45-74, 2013.

KOPP, P. Resveratrol a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the French paradox? **European Journal of Endocrinology**, v. 138, p. 619-620, 1998.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: Focus on antioxidant action, cell signaling and safety. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, p. 86–100, 2010.

KRISTL, J.; TESKAČ, K.; CADDEO, C.; ABRAMOVIĆ, Z.; ŠENTJURC, M. Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 2, p. 253–259, 2009.

KUNDU, J.K.; SURH, Y.J. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. **Cancer Letters**, v. 269, p. 243-261, 2008.

KUPETZ, E.; BUNJES, H. Lipid nanoparticles: drug localization is substance-specific and achievable load depends on the size and physical state of the particles. **Journal of Controlled Release**, v. 189, p. 54-64, 2014.

KWON, S. S.; KIM, S. Y.; KONG, B. J.; KIM, K. J.; NOH, J. Y.; IM, N. R.; LIM, J. W.; HÁ, J. H.; KIM, J.; PARK, S. N. Cell penetrating peptide conjugated liposomes as transdermal delivery system of Polygonum aviculare L. extract. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 26–37, 2015.

LAZÁR, M.; RYCHLÝ, J.; KLIMO, V.; PELIKÁN, P.; VALKO, L. **Free radical in chemistry and biology**. 1 ed. Florida: CRC Press, 1989, 312 p.

LEE, C. W.; KO, H. H.; LIN, C. C.; CHAI, C. Y.; CHEN, W. T.; YEN, F. L. Artocarpin attenuates ultraviolet B-induced skin damage in hairless mice by antioxidant and anti-inflammatory effect. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 123-129, 2013.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 9, p. 411-418. 1999.

LEONARDIS, A.; ARETINI, A.; ALFANO, G.; MACCIOLA, V.; RANALLI, G. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 4, p. 653–659, 2008.

LI, W.; LI, A.; CHEN, W.; ZHANG, Z. **Preparation method and application of resveratrol freeze-dried polymer micelle**, CN 102755298 A, 2012.

LIANG, C. H.; CHOU, T. H. Effect of chain length on physicochemical properties and cytotoxicity of cationic vesicles composed of phosphatidylcholines and dialkyldimethylammonium bromides. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 158, p. 81–90, 2009.

LIU, J.; HU, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 191–195, 2007.

LIU, Y.; CHAN, F.; SUN, H.; YAN, J.; FAN, D.; ZHAO, D.; AN, J.; ZHOU, D. Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, p. 130–137, 2011.

LIU, C.H.; WU, C.T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 353, p. 149-156, 2010.

LOHAN, S. B.; BAUERSACHS, S.; AHLBERG, S.; BAISAENG, N.; KECK, C.M.; MÜLLER, R.H.; WITTE, E.; WOLK, K.; HACKBARTH, S.; RÖDER, B.; LADEMANN, J.; MEINKE, M.C. Ultra-small lipid nanoparticles promote the penetration of coenzyme Q10 in skin cells and counteract oxidative stress. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 89, p. 201–207, 2015.

MAA, Y. F., HSU, C. C. Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. **Pharmaceutical Development of technology**, v. 4, p. 233-240, 1999.

MÄDER, K.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 165–96, 2001.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 1, p. 221-241, 1991.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MANDAWGADE, S.D.; PATRAVALE, V.B. Development of SLNs from natural lipids: application to topical delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutis**, v. 363, p. 132–138, 2008.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VI, p. 1–37, 2009.

MARDER, G. **Hydrocortisone nano technological delivery**. US 2014/ 0073616 A1, EUA, 2014.

MARENGO, E.; CAVALLI, R.; CAPUTO, O.; RODRIGUEZ, L.; GASCO, M. R. Scale-up of the preparation process of solid lipid nanospheres. Part I. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 205, p. 3-13, 2000.

- MARIER, J.-F.; VACHON, P.; GRITSAS, A.; ZHANG, J.; MOREAU, J.P.; DUCHARME, M.P. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, p. 369–373, 2002.
- MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, p. 24-38, 2003.
- MÉRILLON, J.M.; FAUCONNEAU, B.; WAFFO, P.; BARRIER, L.; VERCAUTEREN, J.; HUGUET, F. Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 1092-1093, 1997.
- MIQUEL, G. **Microemulsion of polar antioxidants in edible oils**. EP 1 829 452 A1, 2007.
- MITRI, K.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSELMINI, C.; MÜLLER, R. H. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, p. 267–275, 2011.
- MOTA, M.; GARGAVU, S.; POPA, S.; SCHIOPU, S.; PANDURU, N.M.; MOTA, E. Soya – the medicine food product. **Romanian Journal of International Medicine**, v. 45, p. 113-121, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MÜLLER, R.H.; LUCKS, J.S. **Azneistoffträger aus festen lipidteilchen – feste lipid nanosphären (SLN)**, EP 0605497, Alemanha, 1996.
- MÜLLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) form controlled drug delivery – a review of the state of art. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161 – 177, 2000.
- MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 522–530, 2007.
- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 131–155, 2002.
- MULLER, R.H.; SHEGOKAR, R.; KECK, C.M. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and

NLC): present state of development and industrial applications. **Current Drug Discovery Technology**, v. 8, p. 207-227, 2011.

MURAKAMI, I.; CHALECKIS, R.; PLUSKAL, T.; ITO, K.; HORI, K.; EBE, M.; YANAGIDA, M.; KONDOH, H. Metabolism of Skin-Absorbed Resveratrol into Its Glucuronized Form in Mouse Skin. **PLoS ONE**, v. 9, p. e115359, 2014.

MURAOKA, S.; MIURA, T. Inhibition by uric acid of free radicals that damage biological molecules. **Pharmacology Toxicology**, v. 93, p. 284-289, 2003.

MUSAZZI, U. M.; YOUM, I.; MUROWCHICK, J. B.; EZOULIN, M. J.; YOUAN, B. C. Resveratrol-loaded nanocarriers : formulation, optimization ,characterization and in vitro toxicity on cochlear cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 234–242, 2014.

NDIAYE, M.; PHILIPPE, C.; MUKHTAR, H.; AHMAD, N. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: Promise, prospects, and challenges. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, p. 164–170, 2011.

NEVES, A. R.; LÚCIO, M.; MARTINS, S.; LIMA, J. L. C.; REIS, S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 177–187, 2013.

NIE, S.; HSIAO, W. W.; PAN, W.; YANG, Z. Thermoreversible pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: In vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 151–166, 2011.

NOTMAN, R.; ANWAR, J. Breaching the skin barrier--insights from molecular simulation of model membranes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 237-250, 2013.

PACKER, L.; CADENAS, E. Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress. **Free Radical Research**, v. 41, p. 951-952, 2007.

PALLERLA, S. M.; PRABHAKAR, B. A Review on Solid Lipid Nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutical Sciences: Review and Research**, v. 20, p. 196–206, 2013.

PANDEY, S.; BADOLA, A.; BHATT, G. K.; KOTHIYAL, P. An overview on transdermal drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 2, p. 1171–1180, 2013.

PANDO, D.; MATOS, M.; GUTIÉRREZ, G.; PAZOS, C. Formulation of resveratrol entrapped niosomes for topical use. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 398–

404, 2015.

PANGENI, R.; SAHNI, J.K.; ALI, J.; SHARMA, S.; BABOOTA, S. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, p. 1285-1298, 2014.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170–184, 2009.

PEPPAS, N.A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: how modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75-81, 2014.

PEREZ, V.I.; BOKOV, A.; REMMEN, H.V.; MELE, J.; RAN, Q.; IKENO, Y; RICHARDSON, A. Is the oxidative stress theory of aging dead? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, p. 1005-1014, 2009.

PIFFERI, G.; ANZHAGI, P.; STEFLI, R. **Resveratrol-phospholipids complexes, their preparation, and pharmaceutical and cosmetic composition containing same**, US2014/0116386 A1, EUA, 2014.

POLONINI, H.C.; LIMA, L.L.; GONÇALVES, K.M.; CARMO, A.M.R.; SILVA, A.D.; RAPOSO, N.R.B. Photoprotective activity of resveratrol analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 964-968, 2013.

POUTON, C.W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 278–287, 2006.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

PRAUSNITZ, M. R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 3, p. 115–124, 2004.

PRIYANKA, K.; ABDUL; HASAN, S.A. Preparation and evaluation of montelukast sodium loaded solid lipid nanoparticles. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4, p. 129-137, 2012.

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. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 470–491, 2011.

QIN, L.; WANG, W.; YOU, S.; DONG, J.; ZHOU, Y.; WANG, J. In vitro antioxidant activity and in vivo antifatigue effect of layered double hydroxide nanoparticles as delivery vehicles for folic acid. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 5701–5710, 2014.

RAEDERSTORFF, D.; KUNZ, I.; SCHAGER, J. Resveratrol: from experimental data to nutritional evidence: the emergence of a new food ingredient. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1290, p. 136-141, 2013.

RANCAN, F.; NAZEMI, B.; RAUTENBERG, S.; RYLL, M.; HADAM, S.; GAO, Q.; HACKBARTH, S.; HAAG, S.F.; GRAF, C.; RHÜL, C.; PEYTAVI, U.B.; LADEMANN, J.; VOGT, A.; MEINKE, M.C. Ultraviolet radiation and nanoparticle induced intracellular free radicals generation measured in human keratinocytes by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Skin Research & Technology**, v. 20, p. 182-193, 2014.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, p. 1523–1526, 1992.

RIUS, C.; ABU-TAHA, M.; HERMENEGILDO, C.; PIQUERAS, L.; NICOLAS, J.M.C.; ISSEKUTZ, A.C.; ESTAÑ, J.; CORTIJO, J.; MORCILLO, E.J.; ORALLO, F.; SANZ, M.J. Trans- but not cis-resveratrol impairs angiotensin-II-mediated vascular inflammation through inhibition of NF- κ B activation and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma upregulation. **Journal of Immunology**, v. 185, p. 3718–3727, 2010.

RODRIGUES, J.S.; SANTOS-MAGALHAES, N.S.; COELHO, L.C.B.B.; COUVREUR, P.; PONCHEL, G.; GREL, R. Novel core(polyester) shell (polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p.103-112, 2003.

RODRÍGUEZ-CABO, T.; RODRÍGUEZ, I.; RAMIL, M.; CELA, R. Comprehensive evaluation of the photo-transformation routes of trans-resveratrol. **Journal of Chromatography A**, v. 1410, p. 129-139, 2015.

LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insigninis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, 218, p. 380-384, 2004.

SALES-CAMPOS; H.; SOUZA; P.R.; PEGHINI, B.C.; SILVA, J.S.; CARDOSO, C.R. Na overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 201-210, 2013.

SANTOS, A. C.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. J. New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol. **Expert opinion on drug delivery**, v. 8, p. 973–990, 2011.

SAXENA, A.; WERTZ, C.F.; O'NEILL, V.A.; JENSEN, J.S.; LUNDELL, K.R. **Solid dispersion comprising resveratrol**, WO 2010102245, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L., POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737 2003.

SEBASTIA, N.; MONTORO, A.; MANES, J.; SORIANO, J.M. A preliminary study of presence of resveratrol in skins and pulps of European and Japanese plum cultivars. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 92, p. 3091-3094, 2012.

SEVE, M; CHIMIANTI, F; DEVERGNAS, S; AOUFFEN, M; DOUKI, T; CHANTEGREL, J; CADET, J; FAVIER, A. Resveratrol enhances UVA-induced DNA damage in HaCaT human keratinocytes. **Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 629-633, 2005.

SHARMA, R.; WALKER, R. B.; PATHAK, K. Evaluation of the kinetics and mechanism of drug release from econazole nitrate nanosponge loaded carbapol hydrogel. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 45, p. 25-31, 2011.

SHI, Q.; JIN, R.; CHEN, J.; CHEN, M.; LI, H.; LU, L.; GAO, B. **Resveratrol flexible liposome and preparation method thereof**, CN 101874763 A, 2010.

SINGH, G.; PAI, R. S. Recent advances of resveratrol in nanostructured based delivery systems and in the management of HIV / AIDS. **Journal of Controlled Release**, v. 194, p. 178–188, 2014.

SODDU, E.; RASSU, G.; COSSU, M.; GIUNCHEDI, P.; CERRI, G.; GAVINI, E. The effect of formulative parameters on the size and physical stability of SLN based on “green” components. **Pharmaceutical Development Technology**, v. 10, p. 1-10, 2014.

SOEUR, J.; EILSTEIN, J.; LÉREAUX, G.; JONES, C.; MARROT, L. Skin resistance to oxidative stress induced by resveratrol: From Nrf2 activation to GSH biosynthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 78, p. 213–223, 2015.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H. Investigation of the factors influencing the incorporation of clotrimazole in SLN and NLC prepared by hot high-pressure homogenization. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, p. 377-388, 2006.

SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A.; PINHO, S.C. Nanopartículas de lípidos sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v. 34, p. 1762-1769, 2011.

STEINBERG, F.M.; BEARDEN, M.M.; KEEN, C.L. Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, p. 215-223, 2003.

STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, p. 79–89, 2001.

TESKAC, K.; KRISTL, J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, p. 61-69, 2010.

THOMAS, B. J.; FINNIN, B. C. The transdermal revolution. **Drug Discovery Today**, v. 9, p. 697–703, 2004.

TIYABOONCHAI, W.; TUNGPRADIT, W.; PLIANBANGCHANG, P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, p. 299–306, 2007.

TRELA, B.C.; WATERHOUSE, A.L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agric Food Chemistry**, v. 44, p. 1253-1257, 1996.

UDENIGWE, C.C.; RAMPRASATH, V.R.; ALUKO, R.E.; JONES, P.J. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. **Nutrition Reviews**, v. 66, p. 445-454, 2008.

ÜNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. **Pharmazie**, v.61, p.375-386, 2006.

ÜNER, M.; YENER, G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspective. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, p. 289–300, 2007.

VALENZANO, D.R.; TERZIBASI, E.; GENADE, T.; CATTANEO, A.; DOMENICI, L.; CELLERINO, A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short lived vertebrate. **Current Biology**, v. 16, p. 296-300, 2006.

- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.
- VALSECCHI, A. E.; FRANCHI, S.; PANERAI, A. E.; SACERDOTE, P.; TROVATO, A.E.; COLLEONI, M. Genistein, a natural phytoestrogen from soy, relieves neuropathic pain following chronic constriction sciatic nerve injury in mice: anti-inflammatory and antioxidant activity. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, p. 230–240, 2008.
- VIAN, M. A.; TOMAO, V.; GALLET, S.; COULOMB, P. O.; LACOMBE, J. M. Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, p. 224–229, 2005.
- VILLARINO, N.; LANDONI, M. Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. **Analecta Veterinaria**, v. 26, n.1, p. 28-37, 2006.
- VIOLI, F.; PASTORI, D.; CARNEVALE, R.; PIGNATELLI, P. Nutritional and therapeutic approaches to modulate NADPH oxidase-derived ROS signaling in platelets. **Current Pharmaceutical Design**, v. 29, p. 1-13, 2015.
- VITALE, N.; KISSLINGER, A.; PALADINO, S.; PROCACCINI, C.; MATARESE, G.; PIERANTONI, G.M.; MANCINI, F.P.; TRAMONTANO, D. Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells. **PLoS ONE**, v. 8, e80728, 2013.
- WAGENER, F.A.D.T.G.; CARELS, C.E.; LUNDEVIG; D.M.S. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 9126-9167, 2013.
- WANG, J.J; LIU, K.S.; SUNG, K.C.; TSAI, C.Y.; FANG, J.Y. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 138–146, 2009.
- WANG, J.; WANG, H.; ZHU, R.; LIU, Q.; FEI, J.; WANG, S. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice to the lipopolysaccharide-induced sepsis. **Biomaterials**, v. 53, p. 475-483, 2015.
- WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1257–1272, 2004.
- WISSING, S.; LIPPACHER, A; MÜLLER, R. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Cosmetic Science**, v. 52, n. October, p. 313–324, 2001.
- WONG, H.L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A.M.; LI, Y.; WU, X.Y. Chemotherapy with

anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 491-504, 2007.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 456-469, 2011.

XIA, Q.; ZHAO, W. **Resveratrol nanostructured lipid carrier and preparation method thereof**. CN 102614091 A, 2012.

XU, Q.-M.; CHENG, J.-S.; GE, Z.-Q.; YUAN, J.-J. Antioxidant responses to oleic acid in two-liquid-phase suspension cultures of *Taxus cuspidata*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 125, p. 11-26, 2005.

YANG, X.; LI, X.; REN, J. From French Paradox to cancer treatment: anti-cancer activities and mechanisms of resveratrol. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 806–825, 2014.

YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGETT, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY, E.J. New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (“Cupuaçu”). **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1501-1504, 2003.

YOUNG, I.S.; WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 176-186, 2001.

ZIMMERMAN, A.; BAI, L.; GINTY, D.D. The gentle touch receptors of mammalian skin. **Science**, v. 346, p. 950-954, 2014.

ZHAI, Y.; ZHAI, G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 90–99, 2014.

ZHANG, Y.; LIU, L.; JIN, L.; YI, X.; DANG, E.; YANG, Y.; LI, C.; GAO, T. Oxidative stress-induced calreticulin expression and translocation: new insights into the destruction of melanocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, p. 183-191, 2014.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação do fluxo de permeação cutânea de fármacos administrados por via transdérmica

Pesquisador: NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01147112.5.0000.5147

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia (UFJF)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 151.275

Data da Relatoria: 22/11/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto possui pertinência e valor científico.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos estão claros e são passíveis de serem executados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios estão bem caracterizados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem valor acadêmico e científico e foi bem estruturada na sua metodologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta o termo de responsabilidade com os gastos do estudo.

Recomendações:

Rever o cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atender o item recomendado.

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
 Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.036-900
 UF: MG Município: JUIZ DE FORA
 Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propeq@ufjf.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA/MG



Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto.

JUIZ DE FORA, 22 de Novembro de 2012

Assinador por:
Paulo Cortes Gago
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO CEP: 35.036-900
UF: MG Município: JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigo publicado

Periódico: Journal of Chromatography B

Título: Permeation profiles of resveratrol cream delivered through porcine vaginal mucosa: Evaluation of different HPLC stationary phases

Hudson Caetano Polonini ^{a,b}, **Pedro Paulo Soldati** ^a, Priscila Aparecida de Almeida^a, Carla Grazieli Azevedo da Silva^c, Carol Hollingworth Collins ^c, Marcone Augusto Leal de Oliveira ^d, Anderson de Oliveira Ferreira ^e, Nádia Rezende Barbosa Raposo^a, Marcos Antônio Fernandes Brandão^a.

^a Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil

^b Suprema—Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora, 36033-003 Juiz de Fora, MG, Brazil

^c Institute of Chemistry, University of Campinas, P.O. Box 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

^d Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ), Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil

^e Ortofarma—Quality Control Laboratory, 36120-000, Matias Barbosa, Brazil

Resumo: *Trans*-resveratrol affects biological systems in a multitude of ways, but its oral bioavailability is remarkably poor due to *in vivo* metabolization. This drawback has fomented the development of new strategies for systemic delivery, such as transmucosal delivery via the vaginal route, which is our main focus here. In this sense, our pioneering study purposed to evaluate the *trans*-resveratrol permeation efficacy through this route. For that, we used a previously validated method and tested it with three different stationary phases: a commercial C18 column and two laboratory-made chromatographic columns containing poly(methyloctadecylsiloxane) (PMODS) thermally immobilized onto zirconized silica (Zr-PMODS) or titanized silica (Ti-PMODS). The permeation experiments showed that resveratrol, in the formulation used, was not successfully delivered to the bloodstream – it was actually retained within the vaginal mucosa, which suggests a local use rather a systemic one.

Keywords: Camellia sinensis; Quality Control; In Vitro Drug Release.

Artigo publicado**Periódico:** Química Nova**Título:** Transdermal formulations containing human sexual steroids: development and validation of methods and *in vitro* drug release**Autores:** Hudson C. Polonini¹, **Pedro Paulo Soldati**¹, Marcone Augusto Leal de Oliveira², Marcos Antônio F. Brandão¹, Maria das Graças M. Chaves¹, Nádia R. B. Raposo^{1,*}

1. Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330 Juiz de Fora – MG, Brasil

2. Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ), Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330 Juiz de Fora – MG, Brasil

Resumo: *In vitro* release of bioidentical hormones in four different liposomal transdermal emulsions (containing testosterone or progesterone or estradiol or estradiol + estriol) was assessed. For that, new high performance liquid chromatography (HPLC) methods were developed and validated for each emulsion, in an eco-friendly manner, and used to determine the *in vitro* release of such products. The methods were suitable for the intended goals, and the emulsions are good candidates for human sexual steroids transdermal delivery, once the vehicle used releases in high rates the hormones incorporated into it.

Keywords: *in vitro* drug release; transdermal steroids; semisolid formulations.

Artigo publicado

Periódico: Journal of Young Pharmacists

Título: Essential oil from *Origanum vulgare* Linnaeus: an alternative against microorganisms responsible for bad perspiration odor.

Autores: Erika Y Suzuki¹, **Pedro P Soldati**¹, Maria das Graças A. M. Chaves², Nádia R. B. Raposo¹

¹ Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/ n, 36036-900, Juiz de Fora/ MG, Brasil

² NUPITE, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/ n, 36036-900, Juiz de Fora/ MG, Brasil

Resumo: The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil from *Origanum vulgare* Linnaeus against the main bacteria responsible for bad perspiration odor (*Corynebacterium xerosis* IAL 105, *Micrococcus luteus* ATCC 7468, *Proteus vulgaris* ATCC 13315 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) and to develop the formulation of a deodorant containing the essential oil as antimicrobial agent. The antimicrobial activity was evaluated by means of the turbidimetric method, by using the microdilution assay. The chemical profile of the essential oil was evaluated by high-resolution gas chromatography (HR-GC). Seventeen constituents were identified, being that γ -terpinene (30.5%) and carvacrol (15.7%) were the major components found. The essential oil exhibited antimicrobial activity against all microorganisms tested and the minimum inhibitory concentration (MIC) values ranged from 0.7 to 2.8 mg/ mL. Electron microscopies confirmed the morphological alteration in the structure of the bacteria treated with the essential oil as compared to control. The formulation of the deodorant demonstrated bactericidal activity and it was able to cause damage in the morphological structure of the treated bacteria. The essential oil from *O. vulgare* can be used as a potential natural antimicrobial agent to be applied in personal care products.

Keywords: Deodorants *Origanum vulgare*, Personal care products, Antimicrobial action

Artigo submetido**Periódico:** Journal of Controlled Release**Título:** Controlled release of resveratrol from solid lipid nanoparticles prepared with natural seed butter improves local antioxidant effect.**Autores:** Pedro Paulo Soldati^a, Hudson Caetano Polonini^a, Camila Quinetti Paes^a, Jelver Alexander Sierra Restrepo^b, Tânia Beatriz Creczynksi-Pasa^b, Maria das Graças Afonso Miranda Chaves^a, Marcos Antônio Fernandes Brandão^a, Frederico Pittella^a, Nádia Rezende Barbosa Raposo^{*,a}^a Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 36036-900, Brazil.^b Departamento de Ciências Farmacêuticas, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil.**Resumo:** Solid lipid nanoparticles (SLN) based on natural seed butter extracted from Amazon tree *Theobroma grandiflorum* were prepared for the topical controlled release of resveratrol, a well-known lipophilic antioxidant. The natural butter was assessed by gas chromatography for the identification and quantification of the lipids, showing saturated and unsaturated fatty acids as the major constituents. Nanoparticles were then prepared by high shear homogenization and presented small particle size, with narrow size distribution, which was confirmed by dynamic light scattering (DLS) measurements and transmission electronic microscopy (TEM) images. The negative surface charge, size and polydispersity index (PdI) remained unaltered for 30 days, indicating good colloidal stability. Moreover, the controlled release kinetics revealed a burst release followed by a sustained drug release from SLNs containing resveratrol (R-SLN), which fitted the Higuchi mathematical model, indicating that the releasing profile from the lipid core is diffusion-controlled. R-SLN showed an increased antioxidant activity in 20% compared to resveratrol ethanolic solution (RES). When applied to human skin, R-SLN increased the permeation and retention of resveratrol in the human skin, raising the amount of resveratrol over than 2-fold in stratum corneum (SC) compared to RES. In addition, there was no cytotoxicity of the SLN to human keratinocytes at tested conditions. This new SLN prepared with natural seed butter was able to permeate and deliver hydrophobic actives to the skin in a controlled manner, having the potential to ultimately be used in formulations that request topical delivery.

Keywords: Antioxidants, resveratrol, natural seed butter, controlled release, solid lipid nanoparticles.

APÊNDICE B – RESUMO PUBLICADO EM ANAIS DE EVENTOS

Pedro P. Soldati; Hudson C. Polonini; Frederico P. Silva; Maria das Graças A. M. Chaves; Nádia R. B. Raposo. Development of innovative resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles using natural *Theobroma grandiflorum* seed butter. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso: 5th International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems, 2015, Dubai, Emirados Árabes Unidos).

APÊNDICE C – TRABALHO APRESENTADO

Bruna A. Oliveira; Paula R. Porto; **Pedro P. Soldati**; Nádia R. B. Raposo; Frederico P. Silva. Incorporação de ativos e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) preparadas com manteiga natural. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso: 4º Workshop de Materiais Aplicados à Física e à Farmácia, 201, Gravatal, Santa Catarina, Brasil).