



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Dispersões sólidas de *trans*-resveratrol incorporadas em membranas de polivinilpirrolidona para aplicação cutânea: desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica *in vitro* e *in vivo*

Bruno Vincenzo Fiod Riccio

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientadora: Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari

Araraquara - SP

2021



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Dispersões sólidas de *trans*-resveratrol incorporadas
em membranas de polivinilpirrolidona para aplicação
cutânea: desenvolvimento, caracterização e avaliação
biológica *in vitro* e *in vivo***

Bruno Vincenzo Fiod Riccio

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de
Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli
Coorientadora: Profa. Dra. Priscileila
Colerato Ferrari

**Araraquara-SP
2021**

R493d

Riccio, Bruno Vincenzo Fiod.

Dispersões sólidas de trans-resveratrol incorporadas em membranas de polivinilpirrolidona para aplicação cutânea: desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica *in vitro* e *in vivo* / Bruno Vincenzo Fiod Riccio. – Araraquara: [S.n.], 2021.

109 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.

Coorientadora: Priscileila Colerato Ferrari.

1. Amorfização. 2. Dermatite atópica. 3. Cristalinidade. 4. Inovação Tecnológica. 5. Permeação Cutânea. 6. Solubilidade. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Ferrari, Priscileila Colerato, coorient. III. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de Bruno Vincenzo Fiod Riccio, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara-UNESP.

Aos dezenove dias do mês de novembro de dois mil e vinte e um, às quatorze horas, reuniu-se, virtualmente, a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes Professores Doutores: Marlus Chorilli (Orientador) do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, Valquíria Linck Bassani da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de Bruno Vincenzo Fiod Riccio, intitulado "Dispersões sólidas de trans-resveratrol incorporadas em membranas de polivinilpirrolidona para aplicação cutânea: desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica in vitro e in vivo". Os membros participaram por meio de vídeo-conferência, atendendo o comunicado PROPG de 23 de março de 2020 e o Comunicado 05 - Comitê Unesp Covid-19 de 22 de março de 2020. Após a exposição, o discente foi arguido virtualmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo o candidato recebido o conceito final: APROVADO. Registre-se, que nesta ata, não constará a assinatura dos membros da Comissão Examinadora participantes por meio de vídeo-conferência. Será anexado a esta ata, parecer circunstanciado dos membros participantes por vídeo-conferência, enviado por e-mail. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelo presidente da Comissão Examinadora.



Marlus Chorilli (Orientador)

Valquíria Linck Bassani (parecer anexo)

Membro participante por vídeo-conferência

Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos (parecer anexo)

Membro participante por vídeo-conferência

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

DISCENTE: Bruno Vincenzo Fiod Riccio

TÍTULO DA TESE: Dispersões sólidas de trans-resveratrol incorporadas em membranas de polivinilpirrolidona para aplicação cutânea: desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica in vitro e in vivo

DATA: 19/11/2021

APROVADO

REPROVADO

PARECER A SER EMITIDO NO MOMENTO DA DEFESA :

O aluno fez uma excelente apresentação e respondeu aos questionamentos da banca examinadora com segurança. O trabalho escrito é de qualidade e certamente serão publicados artigos de impacto na área. Considerando a apresentação, arguição e versão escrita do trabalho, considero o candidato aprovado.

Araraquara, 19 de novembro de 2021



Prof. Dr. Marius Chorilli
Orientador



DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

DISCENTE: Bruno Vincenzo Fiod Riccio

TÍTULO DA TESE: Dispersões sólidas de trans-resveratrol incorporadas em membranas de polivinilpirrolidona para aplicação cutânea: desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica in vitro e in vivo

DATA: 19/11/2021

APROVADO

REPROVADO

PARECER A SER EMITIDO NO MOMENTO DA DEFESA :

O trabalho apresentado pelo Mestrando cumpre todos os quesitos exigidos por uma excelente dissertação de Mestrado, no que tange ao seu conteúdo e mérito científico, redação do manuscrito e apresentação oral. Sou de parecer por sua aprovação e concessão do título postulado.

Araraquara, 19 de novembro de 2021

VALQUIRIA LINCK
BASSANI:23887311000

Assinado de forma digital por VALQUIRIA
LINCK BASSANI:23887311000
Dados: 2021.11.19 16:31:19 -03'00'

Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani
Membro Titular participante por meio de vídeo-conferência



DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

DISCENTE: Bruno Vincenzo Fiod Riccio

TÍTULO DA TESE: Dispersões sólidas de trans-resveratrol incorporadas em membranas de polivinilpirrolidona para aplicação cutânea: desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica in vitro e in vivo

DATA: 19/11/2021

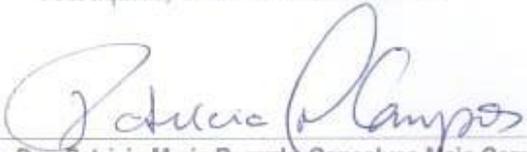
APROVADO

REPROVADO

PARECER A SER EMITIDO NO MOMENTO DA DEFESA :

O mestrando Bruno apresentou muito bem o seu trabalho e mostrou domínio do projeto e resultados obtidos durante a arguição. O tema é relevante e abrangente na área de Ciências Farmacêuticas com aplicação na área de clínica médica - especificamente dermatologia. Os resultados foram excelentes e conclusivos. Portanto, o desempenho do aluno foi excelente.

Araraquara, 19 de novembro de 2021


Prof. Dra. Patricia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos
Membro Titular participante por meio de vídeo-conferência

Epígrafe

“Nada de desgosto, nem de desânimo;

Se acabas de fracassar,

Recomeça!”

(*Marcus Aurelius Antoninus*, 121-180 D.C.)

Agradecimentos

À minha mãe, Rita, que mesmo com todas as dificuldades do mundo nunca me deixou faltar nada e que me criou para ser perseverante e autossuficiente. Sou eternamente grato por sempre me ajudar a alcançar meus objetivos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli pelas oportunidades que me deu e pela generosidade, sempre fazendo o possível para tornar minhas ideias possíveis.

Agradeço à minha coorientadora Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari pela amizade e parceria de anos, sendo inspiração para o profissional que quero me tornar.

Agradeço à Profa. Dra. Andreia Bagliotti Meneguim por todos os ensinamentos, a parceria, e a disposição de sempre estender uma mão amiga quando necessário.

À minha amiga e colega de laboratório Andressa Maria Pironi por me ajudar e transmitir seus conhecimentos desde o início do mestrado até hoje, sendo sempre muito disposta e atenciosa.

Ao Prof. Dr. Hernane da Silva Barud e seus alunos por me receberem em seu laboratório na UNIARA e poder tornar o meu projeto possível.

À Profa. Dra. Carla Raquel Fontana e sua doutoranda Sarah Raquel di Annunzio pela parceria que fizemos durante o meu mestrado e os aprendizados e trabalhos gerados.

Aos amigos e colegas que fiz no laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da UNESP de Araraquara, assim como os de outros laboratórios, por todos os gestos, ensinamentos, ajudas e parcerias realizadas.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, quem investiu e tornou possível esse projeto desde o início através do processo de número 2019/00164-0.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob o código 001, por também tornar essa pesquisa possível, bem como minha formação profissional.

RESUMO

A inflamação cutânea se relaciona à síntese de mediadores inflamatórios que quando em quantidades exacerbadas e produzidos cronicamente podem gerar doenças como a dermatite atópica. O *trans*-resveratrol demonstra ser um efetivo agente anti-inflamatório devido à redução ou inibição de mediadores como histamina, citocinas e a ciclooxigenase-2. O desenvolvimento de dispersões sólidas de *trans*-resveratrol pode melhorar a sua solubilidade. De forma a viabilizar a administração cutânea das dispersões sólidas, membranas de polivinilpirrolidona (PVP) podem ser interessantes, pois se trata de um polímero capaz de evitar a recristalização do *trans*-resveratrol. O estudo objetivou desenvolver, caracterizar e avaliar a citotoxicidade *in vitro* e a atividade anti-inflamatória *in vivo* de dispersões sólidas incorporadas em membranas de PVP para a administração cutânea, sendo algo inédito do ponto de vista tecnológico. Foram desenvolvidas dispersões sólidas contendo *trans*-resveratrol constituídas por quitosana e tensoativo (Poloxamer® 407 ou TPGS), bem como duas formulações sem tensoativos, as quais foram caracterizadas empregando análises morfológicas e físico-químicas. Foi desenvolvido um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação do *trans*-resveratrol. Após a escolha das formulações de melhor desempenho, duas foram incorporadas em membranas poliméricas de PVP, sendo feitas também outras duas sem fármaco como controle. As membranas foram caracterizadas quanto às suas propriedades de barreira e físico-químicas, bem como análises *in vitro* e *in vivo*. De acordo com os resultados, foi possível atingir até 56% de rendimento na produção das dispersões sólidas de *trans*-resveratrol empregando secagem por aspersão (*spray dryer*), sendo que dentre as formulações quase todas obtiveram ângulo de repouso excelente, bem como através da difração de raios-X (DRX) foi possível constatar que as dispersões sólidas conseguiram amorfizar o *trans*-resveratrol com sucesso. As dispersões sólidas também aumentaram a solubilidade do fármaco em água, com algumas formulações dobrando a sua solubilidade. As membranas conseguiram manter o *trans*-resveratrol sem recristalizar por mais de dois meses, conforme evidenciado pelo DRX, além de apresentarem bioadesão, favorável para a administração cutânea. De acordo com o ensaio de liberação *in vitro*, as membranas obtidas não liberaram totalmente o fármaco em 24 h, obtendo valores de 82,27±2,60 a 92,81±2,50%, sendo assim um perfil de liberação prolongado. Ensaio de retenção *in vitro* evidenciaram que as quantidades de *trans*-resveratrol retidas nas camadas da derme e epiderme em 24 h variaram de 42,88 a 53,28%, estando disponíveis para promover o efeito farmacológico. Observou-se também que as citotoxicidades das formulações não foram expressivas. Por fim, no ensaio *in vivo*, foi possível observar que as formulações apresentaram efeito anti-inflamatório favorável ao tratamento farmacológico proposto, obtendo-se a redução de até 66% no modelo de inflamação de orelha de camundongo. Os resultados demonstram que o sistema desenvolvido é capaz de ser utilizado como agente anti-inflamatório para o tratamento da dermatite atópica.

Palavras-chave: Amorfização, Dermatite atópica, Cristalinidade, Inovação Tecnológica, Permeação Cutânea, Solubilidade.

ABSTRACT

Cutaneous inflammation is related to the synthesis of inflammatory mediators that, when in exacerbated amounts and chronically produced, can generate diseases such as atopic dermatitis. *Trans-resveratrol* proves to be an effective anti-inflammatory agent due to the reduction or inhibition of mediators such as histamine, cytokines and cyclooxygenase-2. The development of solid dispersions containing *trans-resveratrol* can improve its solubility. In order to enable the cutaneous administration of solid dispersions, polyvinylpyrrolidone (PVP) membranes can be interesting, since it is a polymer capable of preventing the recrystallization of *trans-resveratrol*, being something unprecedented from a technological point of view. The study aimed to develop, characterize and evaluate the *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* anti-inflammatory activity of solid dispersions incorporated in PVP membranes for cutaneous administration. Solid dispersions containing *trans-resveratrol* constituted by chitosan and surfactant (Poloxamer® 407 or TPGS) were developed, as well as two formulations without surfactants, which were characterized using morphological and physicochemical analyses. An analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed for the quantification of *trans-resveratrol*. After choosing the best performing formulations, two were incorporated into polymeric PVP membranes and two others were also made without the drug as a control. The membranes were characterized regarding their barrier and physicochemical properties, as well as *in vitro* and *in vivo* analyses. According to the results, it was possible to reach up to 56% yield in the production of solid dispersions containing *trans-resveratrol* using spray drying. According to the X-ray diffraction (XRD) it was possible to verify that the solid dispersions were able to amorphize the *trans-resveratrol* successfully. Solid dispersions also increased the drug's solubility in water, with some formulations doubling its solubility. The membranes managed to maintain *trans-resveratrol* without recrystallizing for more than two months, as evidenced by the XRD, in addition to presenting bioadhesion, favorable for cutaneous administration. According to the *in vitro* release assay, the membranes obtained did not fully release the drug in 24 h, obtaining values from 82.27 ± 2.60 to $92.81 \pm 2.50\%$, thus being a profile of extended release. The *in vitro* retention assays showed that the amounts of *trans-resveratrol* retained in the dermis and epidermis layers within 24 h ranged from 42.88 to 53.28%, being available to promote the pharmacological effect. It was also observed that the cytotoxicities of the formulations were not expressive. Finally, in the *in vivo* test, it was possible to observe that the formulations presented an anti-inflammatory effect favorable to the proposed pharmacological treatment, obtaining a reduction of up to 66% in mouse ear inflammation model. The results demonstrate that the developed system is capable of being used as an anti-inflammatory agent for the treatment of atopic dermatitis.

Keywords: Amorphization, Atopic Dermatitis, Crystallinity, Technological Innovation, Skin Permeation, Solubility.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. PELE HUMANA.....	14
2.2 INFLAMAÇÃO	16
2.3. DERMATITE ATÓPICA	18
2.4. ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS	20
2.5. TRATAMENTOS CONVENCIONAIS DA DERMATITE ATÓPICA	21
2.6. <i>TRANS-RESVERATROL</i>	24
2.7. CRISTALINIDADE DE FÁRMACOS	25
2.8. DISPERSÕES SÓLIDAS	27
2.9. SPRAY DRYING.....	28
2.10. QUITOSANA	29
2.11. POLOXAMER® 407.....	30
2.12. VITAMINA E - TPGS.....	31
2.13. MEMBRANAS POLIMÉRICAS	31
2.14. SOLUTION CASTING.....	32
2.15. POLIVINILPIRROLIDONA.....	33
2.16. GLICERINA	33
2.17. POLIETILENOGLICOL (PEG 400).....	34
2.18. BENZOATO DE SÓDIO.....	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. OBJETIVO GERAL	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. MATERIAIS UTILIZADOS	35
4.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	35
4.3. MÉTODOS	36
4.3.1. PRODUÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS	36
4.3.2. RENDIMENTO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS	37
4.3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS	37
4.3.3.1. TEOR DE UMIDADE	37
4.3.3.2. ÂNGULO DE REPOUSO ESTÁTICO (α)	38
4.3.3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	38
4.3.3.4. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	38
4.3.3.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	38

4.3.3.6. TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (TG-DSC)	38
4.3.3.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE <i>TRANS-RESVERATROL</i>	39
4.3.3.8. TESTE DE SOLUBILIDADE	39
4.3.4. PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS DE PVP	39
4.3.5. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	40
4.3.5.1. ESPESSURA	40
4.3.5.2. PERFIL DE INTUMESCIMENTO	40
4.3.5.3. TAXA DE TRANSMISSÃO DE VAPOR D'ÁGUA (TTVA) E PERMEABILIDADE AO VAPOR D'ÁGUA (PVA)	41
4.3.5.4. PROPRIEDADES MECÂNICAS	42
4.3.5.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	43
4.3.5.6. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	43
4.3.5.7. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (ATR)	43
4.3.5.8. TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (TG-DSC)	43
4.3.5.9. BIOADESÃO <i>IN VITRO</i>	43
4.3.5.10. LIBERAÇÃO DO <i>TRANS-RESVERATROL</i> <i>IN VITRO</i>	44
4.3.5.11. PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	44
4.3.5.12. RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	44
4.3.5.13. CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	44
4.3.5.14. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i>	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS	46
5.1.1. ASPECTO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS	46
5.1.2. RENDIMENTO DO PROCESSO EM <i>SPRAY DRYER</i>	48
5.1.3. TEOR DE UMIDADE	49
5.1.4. ÂNGULO DE REPOUSO ESTÁTICO	50
5.1.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	52
5.1.6. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	55
5.1.7. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	56
5.1.8. TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (TG-DSC)	59
5.1.9. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE <i>TRANS-RESVERATROL</i>	61
5.1.10. TESTE DE SOLUBILIDADE	62
5.2. ESCOLHA DAS FORMULAÇÕES A SEREM INCORPORADAS NAS MEMBRANAS DE PVP	63

5.3.1. ASPECTO DAS MEMBRANAS DE PVP	63
5.3.2. ESPESSURA	65
5.3.3. PERFIL DE INTUMESCIMENTO	66
5.3.4. TAXA DE TRANSMISSÃO DE VAPOR D'ÁGUA (TTVA) E PERMEABILIDADE AO VAPOR D'ÁGUA (PVA).....	67
5.3.5. PROPRIEDADES MECÂNICAS	69
5.3.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	70
5.3.7. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	72
5.3.8. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	73
5.3.9. TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (TG-DSC)	75
5.3.10. BIOADESÃO <i>IN VITRO</i>	77
5.3.11. LIBERAÇÃO DO <i>TRANS-RESVERATROL IN VITRO</i>	78
5.3.12. CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	82
5.3.13. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i>	83
5. CONCLUSÕES	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
APÊNDICE A - VALIDAÇÃO ANALÍTICA EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	99
1.A. LINEARIDADE	100
2.A. ESPECIFICIDADE	100
3.A. PRECISÃO	100
3.1.A. REPETIBILIDADE	100
3.2.A. PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	101
4.A. EXATIDÃO	101
5.A. LIMITES DE DETECÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ)	101
6.A. ROBUSTEZ.....	101
7.A. ENSAIO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	102
APÊNDICE B - RESULTADOS DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA EM CLAE	103
1.B. LINEARIDADE	103
2.B. PRECISÃO E EXATIDÃO (INTERMEDIÁRIA E REPETIBILIDADE)	104
3.B. ESPECIFICIDADE	105
4.B. SENSIBILIDADE	106
5.B. ROBUSTEZ.....	106
6.B. ENSAIO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	107

FIGURAS

Figura 1: Aspecto visual das dispersões sólidas.	46
Figura 2: Fotomicrografia do <i>trans</i> -resveratrol 35000x	52
Figura 3: Fotomicrografia da quitosana 35000x	52
Figura 4: Fotomicrografias das formulações DS-1:9-C e DS-1:3-C 35000x.	53
Figura 5: Fotomicrografias das formulações contendo Poloxamer® 407, 35000x.....	53
Figura 6: Fotomicrografias das formulações contendo TPGS 35000x	54
Figura 7: DRX das matérias-primas e das formulações DS-1:9-C e DS-1:3- C.	55
Figura 8: DRX das formulações contendo Poloxamer® 407 ou TPGS, respectivamente.....	56
Figura 9: FTIR das matérias-primas e misturas físicas 1:1 (PM)	56
Figura 10: FTIR das dispersões sólidas contendo Poloxamer® 407.	58
Figura 11: FTIR das dispersões sólidas contendo TPGS	58
Figura 12: TGA e DSC das matérias-primas e formulações SD-1:9-C e SD- 1:3-C.....	59
Figura 13: TGA e DSC das formulações contendo Poloxamer® 407.....	60
Figura 14: TGA e DSC das formulações contendo TPGS	61
Figura 15: Aspecto visual das membranas obtidas.	63
Figura 16: Fotomicrografias de superfície e transversal da membrana M- 1:9-TPGS1-C.	71
Figura 17: Fotomicrografias de superfície e transversal da membrana M- 1:3-TPGS1-C.	71
Figura 18: Fotomicrografias de superfície e transversal da membrana SD- 1:9-TPGS1	71
Figura 19: Fotomicrografias de superfície e transversal da membrana SD- 1:3-TPGS1	72
Figura 20: DRX das misturas das matérias-primas 1:1 e das membranas.....	73
Figura 21: FTIR das membranas e do PVP	74
Figura 22: TGA do <i>trans</i> -resveratrol, das misturas das matérias-primas 1:1 e das membranas.	75
Figura 23: DSC do <i>trans</i> -resveratrol, das misturas das matérias-primas 1:1 e das membranas.	76
Figura 24: Perfil de liberação <i>in vitro</i> das membranas M-SD-1:9-TPGS1 e M-SD-1:3-TPGS1.....	78
Figura 25: Perfil da permeação cutânea das membranas M-SD 1:9-TPGS1 e M-SD-1:3-TPGS1, durante 24 horas.....	79
Figura 1.B: Média das curvas analíticas e equação da reta obtida	103

TABELAS

Tabela 1: Proporções utilizadas na elaboração das dispersões sólidas.....	37
Tabela 2: Composição das dispersões sólidas contendo Poloxamer® 407.	37
Tabela 3: Composição das dispersões sólidas contendo TPGS.....	37
Tabela 4: Dispersões sólidas selecionadas para a incorporação nas membranas de PVP	39
Tabela 5: Planejamento para a produção das membranas de PVP.....	40
Tabela 6: Divisão do grupos de acordo com os tratamentos realizados.....	46
Tabela 7: Rendimentos médios e desvios padrão dos processos produtivos.	48
Tabela 8: Médias de percentagem de umidade	50
Tabela 9: Resultados de ângulo de repouso (α) das amostras analisadas, de acordo com Zhang <i>et al.</i> (2014).....	51
Tabela 10: Determinação do teor de <i>trans</i> -resveratrol nas dispersões sólidas e suas percentagens de recuperação	62
Tabela 11: Médias e desvios padrão das concentrações de <i>trans</i> -resveratrol no ensaio de solubilidade.....	62
Tabela 12: Espessuras médias das membranas obtidas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras (Test-t, $p>0,05$)	65
Tabela 13: Médias de intumescimento após 120 minutos. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras (Test-t, $p>0,05$)	67
Tabela 14: TTVA e PVA calculadas após 120 horas	67
Tabela 15: Resultados das propriedades mecânicas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras para cada parâmetro (Test-t, $p>0,05$)	69
Tabela 16: Média e desvio padrão da força de bioadesão. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as amostras (Test-T, $p>0,05$).....	77
Tabela 17: Médias acumuladas e percentagens de <i>trans</i> -resveratrol retido no estrato córneo após 24 horas.	81
Tabela 18: Médias acumuladas e percentagens de <i>trans</i> -resveratrol retido após 24 horas nas camadas da derme e epiderme abaixo do estrato córneo	81

Tabela 19: Médias dos halos observados e seu grau de citotoxicidade correspondente (JEONG et al., 2019)	82
Tabela 20: Resultados de inflamação e redução da inflamação. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras (Teste de Tuckey, $p > 0,05$)	83
Tabela A.1: Condições utilizadas para a validação do método analítico em CLAE.....	99
Tabela 2.A: Concentrações finais práticas das 7 soluções padrão preparadas.....	100
Tabela 3.A: Variáveis empregadas no ensaio de robustez.	102
Tabela 4.A: Planejamento das condições de análise do ensaio de robustez.	102
Tabela 1.B: Áreas obtidas utilizadas para a construção das curvas analíticas da linearidade do método.....	103
Tabela 2.B: Precisão do método analítico	104
Tabela 3.B: Exatidão do método analítico utilizando a formulação DS-1:9-PX1	105
Tabela 4.B: exatidão do método analítico utilizando a formulação DS-1:9-TPGS1	105
Tabela 5.B: Teor de fármaco e percentagem de recuperação	106
Tabela 6.B: Avaliação do impacto de cada parâmetro da robustez.	106
Tabela 7.B: Concentrações e percentagens de recuperação do <i>trans</i> -resveratrol para cada análise estudada.....	107

EQUAÇÕES

Equação 1: Rendimento da produção das dispersões sólidas por spray dryer	37
Equação 2: Cálculo de percentagem de intumescimento	41
Equação 3: Determinação da PVA.....	41
Equação 4: Resistência à perfuração das membranas.	42
Equação 5: Alongamento durante a perfuração das membranas.....	42
Equação 6: Energia na perfuração por unidade de volume das membranas.	42
Equação 1.A: Desvio padrão relativo da linearidade.....	100
Equação 2.A: Limite de quantificação	101

1. INTRODUÇÃO

A dermatite atópica é uma doença de cunho inflamatório e caráter crônico, a qual é caracterizada pela inflamação da pele em virtude da produção exacerbada de agentes pró-inflamatórios tais como quimiocinas, citocinas e interleucinas (tais como a 17 e a 22). Trata-se de uma doença capaz de causar dor, infecções e problemas estéticos, podendo levar a problemas de aceitação social ou até mesmo de autoaceitação (SENRA; WOLLENBERG, 2014; KIM; KIM; LEUNG, 2019).

De modo a viabilizar um tratamento efetivo, diversas moléculas vêm sendo estudadas como candidatas a fármacos para serem incorporadas em formas farmacêuticas, tais como o *trans*-resveratrol. O *trans*-resveratrol é um composto fenólico, da classe dos estilbenos e também pertencente a classe das fitoalexinas, que tem sido estudado devido à sua atividade anti-inflamatória, uma vez que seu isômero *trans*, que é o mais associado a atividade farmacológica, pode ativar deacetilases de histona tipo 2, bem como a SIRT-1, alterando assim a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo então sinais e sintomas (MORAES et al., 2020).

Entretanto, o *trans*-resveratrol possui algumas características que dificultam sua incorporação em formas farmacêuticas, tais como sua alta cristalinidade e, conseqüentemente, baixa solubilidade em água, o que também acarreta na baixa biodisponibilidade (RUIVO et al., 2015). De modo a viabilizar a amorfização deste composto, as dispersões sólidas de quitosana surgem como uma estratégia para aumentar sua solubilidade (HA et al., 2010).

Porém, as dispersões sólidas apresentam-se como pós amorfos, o que dificulta a sua administração e aderência à pele, sendo necessária a incorporação em um sistema que possa promover não apenas sua bioadesão, mas também a sua liberação controlada, tais como as membranas de polivinilpirrolidona – PVP (KURAKULA; RAO, 2020).

Desse modo, estas membranas podem ser utilizadas para a incorporação destas dispersões sólidas e com isso promover a liberação controlada do *trans*-resveratrol diretamente na pele, evitando assim a necessidade de múltiplas aplicações diárias, sendo então uma solução inovadora para a veiculação do *trans*-resveratrol amorfizado diretamente no seu local de ação (BASSI; KAUR, 2017; PARK et al., 2018).

Além disso, devido a alta taxa de metabolização do *trans*-resveratrol este fica viável na pele durante pouco tempo (CHEDEA et al., 2017), sendo um composto que provavelmente iria necessitar de múltiplas aplicações diárias para se manter os níveis terapêuticos. Desta forma, a liberação controlada desta molécula pode acarretar na sustentação de seus níveis e conseqüentemente em um maior tempo de ação (TRAN; TRAN, 2019).

Com isso, é possível melhorar as propriedades físico-químicas do *trans*-resveratrol através do sistema proposto, bem como suas propriedades biológicas, podendo assim tornar viável sua aplicação cutânea ao mesmo tempo permitindo sua liberação controlada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE HUMANA

A pele humana é um tecido que protege os órgãos internos do contato com o exterior e conseqüentemente os protege contra situações deletérias como estresses químicos (poluição e umidade) (VELASCO et al., 2018), físicos (calor, frio e radiação solar) (AMARO-ORTIZ; YAN; D'ORAZIO, 2014), biológicos (microrganismos) e traumas mecânicos (YOUSEF; SHARMA, 2017). É também responsável por ser uma das vias de termorregulação, ou seja, de troca de calor e demais sensações entre o meio externo e o organismo. Além disso, serve como barreira seletiva quanto ao que pode ou não permear através dela (ROMANOVSKY, 2014).

A pele participa em processos tais como a percepção sensorial (nocicepção, termocepção e pressocepção), assim como funciona como uma barreira seletiva, uma vez que através das características químicas de cada composto ela é capaz de selecionar o que pode permear através dela ou não e até que ponto essa permeação pode ocorrer sem que o composto seja degradado (KUHTZ-BUSCHBECK et al., 2010). A pele é dividida em três camadas: epiderme, derme e, dependendo do autor, tecido subcutâneo (DIJKHOFF et al., 2020).

A derme é um tecido conjuntivo que varia entre 0,5 e 3 mm, sendo nela encontrados os apêndices cutâneos (pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas), além de vasos sanguíneos, terminações nervosas e componentes celulares, tais como células matrizes, fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos (SAHLE; BODO; WOHLRAB, 2015).

A derme reticular é a camada mais interna e espessa, é formada por tecido conjuntivo denso e possui esse nome devido ao entrelaçamento (ou reticulação) dos seus feixes de fibras de colágeno (MENDONÇA; RODRIGUES, GERUZA, 2011).

A camada papilar da derme é uma camada repleta de fibroblastos, os quais possuem como função principalmente a cicatrização de feridas e interações entre epitélio e mesenquima (tecido que origina os tecidos conjuntivos em adultos), além de possuir feixes de colágeno, elastina, capilares sanguíneos e terminações nervosas. É também onde estão presentes os folículos pilosos (RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019).

Entre a derme e a epiderme há a zona da membrana basal, uma camada de macromoléculas, formando redes proteicas que unem os queratinócitos com as fibras de colágeno sintetizadas na derme papilar (BARCAUI et al., 2015).

A epiderme é a camada externa fazendo interface com o meio ambiente, tem espessura entre 0,06 mm (rosto) e 1,3 mm (palmas da mão), não contém sistema de irrigação sanguínea direta e com transporte de nutrientes por meio da difusão por capilaridade. Dentre suas funções, destaca-se fato de ser uma barreira para o ambiente externo, evitando a perda de componentes do ambiente interno, tais como água, nutrientes e eletrólitos e, conseqüentemente, a desidratação (ARENS; HUI, 2006; LIM, 2021).

O estrato espinhoso é a camada onde as células da camada basal se diferenciam em queratinócitos, sendo que estes são unidos pelos desmossomos, o que faz com que ele contenha tonofilamentos, filamentos proteicos que se acomodam nos espaços intercelulares, conectando assim os

queratinocitos entre si através do processo de ancoragem (AUDI et al., 2017). Nessa camada, também estão presentes as células de Langerhans e os melanócitos.

As células de Langerhans pertencem à linhagem de células mielóides e são exclusivas da epiderme, desempenhando a função igual à de macrófagos, ou seja, fagocitam qualquer xenobiótico que adentre a pele, também atuando como apresentadores de antígeno para as células T para consequentemente ativá-las (DOEBEL; VOISIN; NAGAO, 2017).

Os melanócitos são responsáveis por sintetizar a melanina, pigmento escuro que confere proteção da pele contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta e quando em hiperatividade pode hiperpigmentar a pele gerando inclusive os melanomas, que podem ser benignos (pintas) ou malignos (câncer de pele). Já as células de Merkel estão entre a derme e a epiderme e fornecem as sensações de tato e pressão sobre a pele (BRENNER; HEARING, 2008; YOUSEF; SHARMA, 2017)

Os queratinócitos são o principal tipo celular presente na pele, começam a ser designados assim após a diferenciação celular que ocorre no estrato basal, tratando-se da fase proliferativa e nucleada dessas células, antes que elas percam essas características e se tornem corneócitos. São também os queratinócitos as células responsáveis pela produção de queratina (SILVA et al., 2013) que é uma proteína fibrosa filamentar, a qual tem a função de estruturar a epiderme, além de garantir sua seletividade frente ao que pode ou não permear. A queratina é dividida em vários tipos, dentre eles o 5 e o 14 são mais comuns na camada basal e o 1 e o 10 são mais comuns na camada espinhosa (ALAM et al., 2011; IVANOVA et al., 2016).

A próxima camada é o estrato granuloso, onde os queratinócitos formam grânulos querato-hialinos que são compostos por queratina e profilagrina que é o precursor da filagrina, responsável pela agregação e o alinhamento dos filamentos da queratina para que esta fique bem compactada servindo de matriz para os corneócitos quando chegarem ao estrato córneo, além de serem responsáveis pela impermeabilização da pele (BRAGULLA; HOMBERGER, 2009; JANG; LEE, 2016).

É nele também que se sintetiza a pró-proteína pró-filagrina, que é desfosforilada e se transforma em filagrina através de enzimas dependentes de cálcio (calmodulina e imunofilina). A filagrina tem por função agrupar as lamelas que constituem o estrato córneo, organizando-as de forma paralela e compacta. Após terminar esse trabalho, a filagrina é degradada pelas cisteínapetidases gerando fatores naturais de hidratação, tais como a ureia, o ácido urocânico e o ácido pirrolidônico carboxílico, que promovem a captação de água e manutenção do pH ácido da pele para a prevenção da entrada de microrganismos (SANT'; ADDOR; AOKI, 2010).

Dependendo da região do corpo, há o estrato lúcido que fica logo abaixo do estrato córneo. Ele existe em locais de maior atrito da pele, como as solas do pé e palmas das mãos e, dependendo do autor, essa camada é considerada parte do estrato córneo e não uma camada distinta (NG; LAU, 2015).

O estrato córneo é a camada externa da epiderme, nela há corneócitos embebidos em uma matriz lipídica responsável por formar e fazer a manutenção da barreira da pele contra a desidratação e agentes xenobióticos. É também responsável pela função de barreira seletiva da pele devido a sua organização molecular, composta basicamente por lipídios saturados

intermoleculares que estão principalmente no estado sólido em temperatura ambiente e umidade relativa normal, fazendo com que haja seletividade ao que irá permear ou não (VAN SMEDEN et al., 2014; MATSUI; AMAGAI, 2015).

A organização desses lipídios é bastante densa podendo gerar interações com organização cristalina ortorrômbica, onde suas cadeias alifáticas tendem a adotar conformação *trans*, formando uma estrutura cristalina hexagonal. Entretanto, há também uma fração líquida onde há maior permeabilidade, uma vez que devido as isomerizações de *Gauche* (que aumentam a energia conformacional), a matriz cristalina é completamente perdida (BARBA et al., 2019).

O estrato córneo possui em sua constituição ceramidas, ácidos graxos e colesterol, sendo organizado de forma ordenada para que a função de barreira da pele seja mantida (SAHLE; BODO; WOHLRAB, 2015). O principal componente celular são os corneócitos, que são queratinócitos anucleados, já no estágio final de diferenciação dessa linhagem celular. Os corneócitos têm como função reter os filamentos de queratina junto à matriz de filagrina, organizando e cimentando a matriz extracelular rica em lipídeos e, ao contrário dos queratinócitos, células nesse estágio perdem a sua capacidade proliferativa e em determinado momento ativam a apoptose, gerando a descamação da pele (ÉVORA et al., 2021).

O estrato córneo é dividido em duas camadas, sendo a primeira o *stratum disjunctum* que é a parte mais superficial e com os lipídeos menos compactados, enquanto que a segunda é o *stratum compactum* com lipídeos mais compactados tendo maior disposição para a organização cristalina (PIÉRARD et al., 2015).

O colágeno, a elastina e a fibronectina, são sintetizados pelos fibroblastos e têm por função diminuir a viscoelasticidade da pele, a tornando mais rígida e firme, o que faz com que as células fiquem aderidas à matriz, além de serem importantes para a cicatrização cutânea. Com o passar do tempo a produção destes componentes é diminuída e o que foi produzido fica susceptível à degradação, o que pode tornar a pele mais frouxa e capaz de formar rugas (SCHALKA et al., 2017).

Outro composto importante para manter a integridade da pele é o ácido hialurônico, produzido por queratinócitos e fibroblastos. Ele forma um bloco coeso entre as células capaz de manter hidratação e elasticidade da pele em condições normais (SANDOVAL; CAIXETA; RIBEIRO, 2015).

2.2 INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório pode ser dividido em agudo e crônico, sendo que as principais diferenças são de acordo com a duração e se há ou não um estímulo externo. Sendo assim, a inflamação aguda dura apenas alguns dias ou semanas, ocorrendo somente enquanto há a presença de um estímulo externo, enquanto que a crônica ocorre quando há uma intensa infiltração de células do sistema imune mesmo após a destruição do xenobiótico, podendo persistir por meses ou até anos (ABUDUKELIMU et al., 2018).

A inflamação é um processo degenerativo intenso, ao ponto de causar o acúmulo local de produtos catabólicos, sendo estas moléculas de baixa massa molecular, o que leva ao aumento de pressão osmótica, aumentando o edema da região, podendo causar também elevação da temperatura. Ocorre devido a

reação do corpo contra infecções, irritações ou outras injúrias (STANKOV, 2012).

O processo inflamatório está atrelado ao sistema complemento, que é a principal resposta humoral (realizada por anticorpos) envolvida, participando de praticamente todas as etapas da fase efetora da inflamação (onde há a resposta ao antígeno). Dentre estas atividades estão a fagocitose, a opsonização, o aumento da permeabilidade vascular, entre outras (DUNKELBERGER; SONG, 2010).

Ao ser desencadeada a inflamação, além da produção de IgE, ocorre a ativação das vias TH2 e TH22, além de aumentar as atividades das vias TH1 e TH17 no início da fase aguda, sendo que com a persistência dessas vias (exceto a TH 17) por mais de 48 h ocorre então o aparecimento dos biomarcadores IL4 e IL13 (interleucinas) que fazem parte das citocinas, assim como as quimiocinas CCL17, CCL18, CCL19, CXCL9, CXCL 10 e CXCL 11. Outros biomarcadores também associados à essa condição são IL4 e IL13, ambos associados à espongiose. O TSLP (linfopietina do estroma tímico) afeta negativamente a produção de filagrina, o que compromete a barreira epidérmica. Além disso, o TSLP junto à IL31, são responsáveis pela indução do prurido (FARIA et al., 2017).

A inflamação aguda começa quando ocorre o estímulo nocivo diretamente na pele dando início à fase irritativa que é onde ocorre a liberação dos leucócitos para que haja o combate ao xenobiótico. Com isso, inicia-se a fase vascular que causa o aumento da vascularização e da permeabilidade do local afetado para que os leucócitos possam chegar até seu alvo. Após isso, ocorre a fase exudativa formando o edema. A próxima fase é a necrótica, onde ocorre a apoptose do tecido inflamado. Em seguida, há a fase de reparação onde o tecido começa a se regenerar, havendo a regeneração (substituição das células antigas por outras novas semelhantes) ou a cicatrização (onde é formado o tecido fibroso) (PATIL et al., 2019).

No caso da inflamação aguda ela ocorre assim que o xenobiótico é opsonizado e ocorre a ativação dos macrófagos, o quais iniciam a síntese de citocinas e quimiocinas, tais como as interleucinas (IL) 1 e 6, assim como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), que, dentre todas as suas ações, são capazes de fazer com que ocorra a vasodilatação no local, assim como o aumento do fluxo sanguíneo e o aumento do recrutamento dos leucócitos (YAHFOUFI et al., 2018; KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019).

Com a sua liberação, essas proteínas são capazes de ativar as células endoteliais que por sua vez expressam as selectinas (moléculas de adesão) que têm por função se ligar aos neutrófilos e monócitos que estão passando pela corrente sanguínea para os conduzir até o local onde devem fazer sua ação. Após isso, elas expressam as integrinas que fazem a adesão dos neutrófilos e monócitos que através do processo de rolamento se ligam fortemente ao endotélio fazendo com que se inicie o processo de diapedese, no qual os leucócitos adentram o espaço intersticial através das janelas e alcançam o tecido acometido (MULLER, 2013).

Ao chegarem até o local onde se encontra o agente xenobiótico, os leucócitos liberam mais quimiocinas e citocinas para amplificar a resposta ativando uns aos outros. Com isso, inicia-se o processo de fagocitose, no qual os leucócitos englobam o agente estranho e o digerem através da liberação de óxido nítrico, espécies reativas de nitrogênio e lisozimas. Após destruírem o

agente agressor, os leucócitos passam a destruir o tecido lesionado/necrosado e dá início à limpeza e regeneração tecidual (HIRAYAMA; IIDA; NAKASE, 2018).

Caso o agente desencadeador da inflamação for persistente (acima de 72 horas), observa-se o início da inflamação crônica. Histologicamente, trata-se de um infiltrado de células mononucleares em conjunto com destruição tecidual e de cicatrização incompleta contendo tecido conjuntivo fibroso. Pode também ser uma inflamação granulomatosa, onde se observa um acúmulo de macrófagos ativados (FURMAN et al., 2019).

São exemplos de eventos desencadeadores de inflamação cutânea: infecções bacterianas, fúngicas e virais (ZACHARY, 2020); fraturas e entorses (LOI et al., 2016); exposição a estresse térmico ou causado por radiação ultravioleta (LOPES; MCMAHON, 2016); doenças alérgicas, agudas e crônicas como a dermatite e a psoríase (AKDIS, 2012).

2.3 DERMATITE ATÓPICA

A dermatite atópica é uma doença inflamatória crônica e não-contagiosa que acomete a pele, sendo assim um tipo de eczema. Ela ocorre em indivíduos com predisposição genética. Nela ocorre o prurido, a xerose cutânea, lesões eczematosas, além de danos na barreira epidermal e desregulação do sistema imune (BARBAROT et al., 2018).

Estima-se que nos países desenvolvidos a prevalência de dermatite atópica esteja em crescimento, podendo chegar a acometer entre 10 e 20% das crianças na Europa e em países como Estados Unidos, Japão e Austrália, enquanto que em adultos essa taxa cai para entre 1 e 3%. Essa taxa tende a cair em países menos industrializados, especialmente em áreas rurais (LEITE; LEITE; COSTA, 2007).

No Brasil, a prevalência da doença varia de 8,9 a 11,5% e tem maior frequência em crianças no Norte e no Nordeste, sendo que sua origem pode ser tanto de origem idiopática quanto por contato com alergênicos e agentes infecciosos (CASTRO, 2006; LIMA; NUNES, 2015). Dentre os agentes desencadeadores mais comuns estão o níquel, o cromo, as fragrâncias nos perfumes e em produtos de higiene pessoal e a *para*-fenilenodiamina presente em tinturas capilares (PEISER et al., 2012).

Outros fatores desencadeantes do eczema são a pré-disposição genética do indivíduo (incluindo o fumo de cigarros durante a gravidez), produtos contendo detergentes, fibras têxteis (como a lã e o nilon), perfumes, alimentos, pó de sujeira, grama, pólen, pelos de animais como de cães e gatos (SM et al., 2014).

A dermatite não só gera problemas físicos como também é capaz de desencadear eventos psicossomáticos como a alexitimia (incapacidade de caracterizar verbalmente as sensações), além de dificuldades com autoimagem e autoestima (DOS SANTOS-SILVA; LUIZ RODRIGUES; ELIZABETH BAKAL ROITBERG, 2017).

Nela, ocorre a produção de resposta imune através da produção de IgE para combater alérgenos ambientais e/ou alimentícios, podendo não apenas desencadear a inflamação cutânea mas também asma e a rinite alérgica (LEITE; LEITE; COSTA, 2007), bem como hiperplasia epidérmica e infiltração

vascular de células T o que acarreta na espongiose (edema intercelular) (EICHENFIELD et al., 2012).

A dermatite atópica é caracterizada por ser uma inflamação crônica, ou seja, que se inicia a partir de uma inflamação aguda e evolui, tendo duração prolongada, podendo chegar a durar anos e onde ocorrem simultaneamente os processos de inflamação ativa, destruição e reparo tecidual (RERKNIMITR et al., 2017), sendo que durante esse processo, existem alterações vasculares (edema e infiltrado) capazes de aumentar a quantidade de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e os plasmócitos causando destruição tecidual, assim como há também a angiogênese e fibrose ocorrendo ao mesmo tempo tendo também a presença de linfócitos T secretores de citocinas (STEINHOFF et al., 2006).

Seu início se dá muitas vezes de forma assintomática, podendo ser desencadeada devido à infecções persistentes, exposição prolongada à alérgenos e produtos potencialmente tóxicos e autoimunidade, e muitas vezes sinais clínicos comuns à inflamação aguda como edema e eritema podem não ser observados (KIM; KIM; LEUNG, 2019).

Sendo uma doença alérgica, a dermatite atópica sofre diferenciação celular tanto na derme quanto na epiderme. Na epiderme ocorre a exossese que é a inflamação seguida de acúmulo de células pró-inflamatórias no local, levando a um quadro de espongiose podendo se estender da camada basal até a granular e causar a ruptura das junções desmossomais entre as células, causando o aparecimento de vesículas onde pode haver a migração de células pró-inflamatórias (linfócitos, neutrófilos polimorfonucleares e eosinófilos). Com isso, a inflamação e a espongiose aumentam ao ponto de causar rupturas na pele (LACHAPELLE; MAROT, 2011).

Na derme, com a inflamação causada, os capilares podem ser comprimidos acumulando sangue em alguns locais, podendo também haver a dilatação dos vasos linfáticos, tendo uma densa infiltração de células mononucleadas (principalmente linfócitos e macrófagos) nos espaços perivasculares, além da derme também ser passível de se romper devido a espongiose (LACHAPELLE; MAROT, 2011).

Os neutrófilos ou células polimorfonucleares são as células leucocitárias advindas da medula óssea e são as células em maior concentração no sangue humano tendo sua contagem global aumentada em casos de processos inflamatórios ou alérgicos como as dermatites. São originados das células-tronco através de um processo de maturação celular leucopoese a qual acontece no tórax (NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020)

Os linfócitos são células do sistema imunológico ativadas quando há a necessidade de resposta contra agentes infecciosos ou a xenobióticos. Podem ser classificados como células T, B e natural killers (NK). As T são mediadoras naturais do sistema imune, sendo necessárias para manter a autotolerância e evitar problemas autoimunes. As B, por sua vez, participam da produção dos anticorpos e citocinas, bem como funcionam como apresentadoras de antígenos. Por fim, as NK possuem grânulos grandes e providenciam resposta imune contra agentes infecciosos, além de responderem atacando o crescimento tumoral (ORAKPOGHENOR et al., 2019).

Os macrófagos são mediadores da homeostase tecidual, respondendo a presença de patógenos no reparo tecidual após a eliminação do agente estranho, uma vez que conseguem se guiar pelos vasos sanguíneos através do

gradiente de sinais parácrinos e endócrinos liberados pelas células injuriadas tais como proteínas celulares, bem como através das proteínas e antígenos de superfície de microrganismos, podendo assim os fagocitar e lisar com suas enzimas (LASKIN et al., 2011; URIBE-QUERO; ROSALES, 2017). Quanto à reparação tecidual, esta ocorre devido à liberação de fatores de crescimento tais como o TNF α , VEGF e PDGFA, além de citocinas anti-inflamatórias como o IL-10 e o TGF- β (LANDSKRON et al., 2014).

Por fim, os eosinófilos são ativados em casos de reações alérgicas e são responsáveis por liberar proteínas catiônicas armazenadas em seus grânulos citoplasmáticos durante o processo de degranulação para destruir possíveis agentes desencadeadores de alergias e irritações. Dentre suas proteínas estão a proteína básica principal 1, proteína eosinófila catiônica, neurotoxina derivada do eosinófilo e a eosinofina peroxidase, além de que é capaz de produzir a IL-5 (WELLER; SPENCER, 2017).

2.4. ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS

A aplicação cutânea tem como local de administração as camadas superficiais da pele, sendo a permeação de acordo com a primeira Lei de Difusão de Fick, devendo o fármaco permear apenas a epiderme e parte da derme, não entrando em contato com os vasos sanguíneos e nem ser absorvido por eles, exercendo assim um efeito local (KAUR et al., 2016). Na administração transdérmica, por sua vez, o fármaco além de poder chegar até o tecido subcutâneo, deve ser absorvido pelos capilares sanguíneos e com isso exercer um efeito sistêmico (SERAFIM et al., 2013).

Sendo assim, o efeito tópico trata desordens cutâneas, tais como doenças inflamatórias (incluindo as dermatites), psoríase e o lúpus eritematoso, enquanto que a aplicação transdérmica pode ser utilizada para tratamentos de problemas nos músculos, ossos e articulações e até outros órgãos. Ensaios *in vitro* podem comprovar se um novo sistema farmacêutico em desenvolvimento é capaz de ter efeito tópico ou sistêmico, dentre eles podem ser citadas as técnicas de permeação e retenção cutânea, assim como avaliações *ex vivo* utilizando por exemplo a pele da orelha de porco (RUELA et al., 2016).

Após a aplicação de uma formulação sobre a pele, os compostos voláteis são perdidos, formando assim um filme oclusivo sobre a pele, o que concentra o fármaco até chegar ao nível de supersaturação o que causa o aumento do influxo do fármaco para a pele aumentando a atividade termodinâmica da formulação sem alterar a estrutura da pele, o que diminui a possibilidade de irritação ou de efeitos colaterais (KATHE; KATHPALIA, 2017).

A permeação de fármacos pode ser dividida em vias do estrato córneo e dos apêndices cutâneos. A via do estrato córneo possui as rotas: transcelular/intracelular (permeação através dos corneócitos até a epiderme viável) sendo a mais comum, e a intercelular/paracelular (permeação através dos lipídeos do espaço intersticial). Pela via dos anexos cutâneos, pode haver a permeação pelos folículos pilosos (permite a permeação de fármacos de alta massa molecular), pelos ductos sudoríparos e pelas glândulas sebáceas (SUGIBAYASHI, 2017; BAVELONI et al., 2021).

A permeação é afetada por algumas características do fármaco, tais como sua lipofilia, seu grau de ionização, o valor de pKa do fármaco, o pH da

formulação e o pH de pele. De um modo geral, quanto mais lipofílico e menor for a proporção ionizada do fármaco, maior é sua permeação (PRADAL, 2020).

De mesma forma, o pKa de fármacos ligeiramente ácidos tende a aumentar a permeação se comparado com os ligeiramente básicos, uma vez que o pH da pele é ácido e com isso o fármaco se encontra predominantemente em sua forma não-ionizada, facilitando sua permeação principalmente pela rota transcelular. A permeação tende a aumentar ainda mais quando o fármaco se encontra em uma formulação de pH ligeiramente ácida, pois também favorece sua forma não-ionizada (AKULA; LAKSHMI, 2018).

É importante também considerar que toda substância capaz de permear a pele estará susceptível a ser metabolizada pelas enzimas da pele, uma vez que este tecido tem uma alta atividade metabólica. Os processos de biotransformação ocorrem principalmente aumentando a hidrossolubilidade dessas substâncias, aumentando assim suas taxas de excreção ou de eliminação. O metabolismo ocorre principalmente na epiderme, uma vez que os fármacos ficam pouco tempo presente na derme, devido ao rápido *uptake* pelos capilares sanguíneos (PYO; MAIBACH, 2019)

O metabolismo ocorre através de duas etapas. A primeira é a etapa de funcionalização, onde grupamentos polares são ou gerados ou expostos no fármaco através de reações redutivas, oxidativas ou hidrolíticas. Após isso, há a fase de conjugação, na qual pequenas moléculas endógenas como o ácido glicurônico ou sulfatos são ligados covalentemente, sendo que a massa molecular do fármaco sempre será aumentada, além da sua hidrofília, fazendo com que o metabólito passe mais rápido para a corrente sanguínea (PYO; MAIBACH, 2019).

Dentre as enzimas envolvidas na fase I da metabolização cutânea, há a álcool desidrogenase, a monooxigenase flavina-dependente, aldeído desidrogenase, aldocetorreductase, carboxilesterase, esterase e COX. Quanto às enzimas de fase II, temos glutathione-S-transferases (GUT), UDP-glicuronosiltransferases (UGT), sulfotransferases (SULT), N-aciltransferases (NAT), e metiltransferases (KAZEM; LINSSEN; GIBBS, 2019).

De acordo com um estudo feito por Murakami e colaboradores, (2014), ao avaliar amostras de diferentes órgãos de camundongos através da cromatografia líquida com espectrômetro de massas, foi possível encontrar 123 metabólitos do resveratrol após este ser aplicado via cutânea sendo comparada sua permeação de acordo com diferentes formas farmacêuticas e um controle contendo o composto dissolvido em etanol. Após 4 horas, a maioria dos metabólitos foi encontrada no sangue ou em órgãos como o fígado, sendo que na própria pele foi encontrado o resveratrol ainda não metabolizado e pequenas quantidades dos metabólitos sulfato de dihidro-resveratrol e os isômeros *cis* e *trans* do resveratrol-3-O-glicuronida, demonstrando que ao serem metabolizados, estes metabólitos passam rapidamente para a corrente sanguínea para então sofrerem excreção renal.

2.5 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS DA DERMATITE ATÓPICA

Quanto ao tratamento, primeiramente é necessária uma combinação entre *skin care*, com o uso diário de emolientes para a restauração da barreira

epidérmica através da reposição de lipídeos no estrato córneo como ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol, que causam a oclusão da pele e diminuem a perda de água transepidermal que está aumentada quando ocorrem rachaduras na pele prejudicada, associado a cosmecêuticos emolientes e a anti-inflamatórios corticosteroides tópicos. Também, deve-se evitar o contato com sensibilizantes e alergênicos. Podem ser usados também inibidores tópicos de calcineurina (tacrolimus e pimecrolimus) (NOWICKI et al., 2015; HON et al., 2018)

É importante observar a lavagem, uma vez que temperatura do banho e o tipo de produto de higiene podem piorar a condição da pele, causando o ressecamento, inflamação e prurido. Produtos contendo detergentes sintéticos como sabonetes, shampoos, condicionadores ou até detergentes de limpeza aumentam a presença de queratinócitos granulares responsáveis pela defesa da pele, mas também pela disfunção da propriedade de barreira. O ideal é que no banho se utilize água morna e sabonetes sem detergentes, próprios para indivíduos com eczema (DEGUCHI et al., 2015).

Um fator importante a ser levado em consideração é que, apesar de a radiação solar causar melhora aparente na condição dos indivíduos durante os momentos de crise, ainda assim isso é questionável uma vez que a radiação UV pode impactar na barreira da pele por gerar radicais livres, capazes de danificar lipídeos, proteínas e o DNA das células, causando não apenas o aumento da inflamação e irritação, como também a pré-disposição a outras doenças como o câncer de pele, sendo então importante o uso de fotoprotetores para evitar este tipo de exposição. Outros cuidados com a pele são para evitar exposição à grandes variações de temperatura e umidade relativa (PIQUERO-CASALS et al., 2021).

Uma vez que a pele afetada pela dermatite deixa estes pacientes mais susceptíveis a infecções, patógenos como *Staphylococcus aureus* passam a expressar fatores de virulência, com ao α -toxina, capaz de clivar a E-caderina presente nas junções celulares e causar a morte de queratinócitos e a proteína A, capaz de ativar o TNFR-1 e induzir resposta inflamatória em queratinócitos. Além disso, esta bactéria também é capaz de produzir proteases que irão afetar o estrato córneo e criar condições favoráveis a formação de biofilme (GEOGHEGAN; IRVINE; FOSTER, 2018). Sendo assim, as infecções também precisam ser tratadas junto com a inflamação.

É possível tratar essas infecções com pomadas contendo antibióticos como a mupirocina, bem como imunossupressores sistêmicos incluindo a ciclosporina, metotrexato, azatiotropina e o mofetil micofenolato, também sendo recomendados banhos contendo 5% de hipoclorito de sódio (MÁRCIA; SILVA, 2018).

Pode-se incluir antibióticos tópicos e sistêmicos quando for constatado que há a presença de infecção. Dentre os antibióticos tópicos mais comuns há o ácido fusídico associado com corticóides, como valerato de betametasona, acetato de hidrocortisona e butirato de clobetasona. Quanto aos tratamentos via oral, os principais são flucloxacilina, penicilina e eritromicina (FRANCIS et al., 2017).

Outra alternativa é a suplementação da vitamina D, uma vez que esta tem efeitos imunomoduladores e está relacionada com a produção da catelicidina, um peptídeo anti-infectivo que pode auxiliar no combate das

infecções por *S. aureus* que agravam ainda mais a dermatite (LIMA et al., 2015).

A calcineurina é uma proteína situada no citoplasma de diversos tipos celulares, incluindo linfócitos e células dendríticas, e quando ativada induz a transcrição das interleucinas pró-inflamatórias dependentes de calmodulinas e imunofilinas. Os inibidores interagem com imunofilinas diferentes exercendo um nível diferente de efeito farmacológico dependendo de qual imunofilina é inibida, sendo que o tacrolimus por exemplo, se liga à proteína FK506 podendo reduzir a síntese de IL-2, 3, 4 e 5 e o TNF α , enquanto que o pimecrolimo à microfilina 12 (ou FKBP-12), o qual pode inibir as IL-2, 4 e 10, assim como o interferon γ (FRACARO; AUGUSTO, 2000).

Existe também a opção de se utilizar fármacos biológicos aprovados pelo FDA para o tratamento da dermatite atópica. Atualmente, os mais utilizados via sistêmica são: o omalizumabe (anticorpo humanizado, 95% humano e 5% murino), um bloqueador de mastócitos e basófilos que impede a cascata enzimática do sistema complemento; o dupilumabe (anticorpo 100% humano), o qual reduz a produção de biomarcadores Th2 e de outros genes associados a ativação de células T, sendo útil para controle de dor e prurido, bem como no reestabelecimento da função barreira da pele (DELEANU; NEDELEA, 2019).

Existem também fármacos produzidos por processos biotecnológicos (mas sem ser considerados biofármacos) de administração tópica, como no caso da pomada de crisaborol 2%, a qual pode ser usada em crianças a partir de 2 anos reduzindo a inflamação e o prurido, um inibidor boro-mediado da enzima PDE4 que causa o aumento da adenosina monofosfato cíclica intracelular (cAMP) que é um regulador negativo de citocinas pró-inflamatórias (MCDOWELL; OLIN, 2019).

Os corticosteroides tópicos são os fármacos mais bem aceitos para o tratamento das dermatites, uma vez que são anti-inflamatórios, anti-proliferativos e supressores de células produtoras de citocinas como os neutrófilos, monócitos, linfócitos, células de Langerhans e das interleucinas (proteínas produzidas por leucócitos como os linfócitos T, responsáveis pela ativação da inflamação) como a IL-1 α , IL-1 β e IL-2, o fator de necrose tumoral (TNF- α , sendo citocinas capazes de induzir células à apoptose), fator estimulador de colônias de granulócitos humanos (GM-CSF, responsável pelo aumento de neutrófilos liberados pela medula óssea), além de poderem ter a habilidade de induzir a produção de proteínas anti-inflamatórias como a lipocortina, vasocortina e vasorregulina (MAYBA; GOODERHAM, 2017).

Quanto aos anti-inflamatórios tópicos, o mais comum é o uso de corticosteróides tópicos, sendo fármacos utilizados para o alívio de sintomas e não para a cura de doenças como dermatites e psoríase. A permeação desses fármacos depende da espessura do estrato córneo, pois quanto mais fino, mais fácil será a permeação. Porém, o uso de corticosteroides deve ser por períodos curtos, pois ao serem utilizados à longo prazo estes podem causar ardências e atrofias na pele e dependendodo local provocar o surgimento de estrias e acne. Por isso o tempo de tratamento deve ser de até 2 semanas na face e de até 3 semanas no restante do corpo (LEAL et al., 2015).

Devido aos problemas associados ao uso de corticosteróides, torna-se interessante o uso de alternativas terapêuticas para o tratamento de dermatites, tais como o uso de fitocompostos como o *trans*-resveratrol.

2.6. TRANS-RESVERATROL

O resveratrol (3,5,4'-stilbenotriol) é um composto fenólico não-flavonoide da classe estilbenoide, além de ser uma fitoalexina. Possui forma molecular $C_{12}H_{14}O_3$ e massa molecular de 228,47 g/mol, é também um composto altamente lipofílico e cristalino. Seu pKa é 8,99 e logP é de 3,4 tendo boa solubilidade em etanol e DMSO mas não sendo facilmente solubilizado em água, sendo a sua solubilidade em água de 3 mg/100 mL e em tampão fosfato pH 7,4 de 100 µg/mL (RICCIO et al., 2020a).

Por ser um fitonutriente, ele pode ser encontrado em diversas fontes alimentares, tais como uvas (e seus derivados vinhos e sucos), amendoins, pistaches, mirtilos, amoras, cranberries e nas raízes da planta *Polygonum cuspidatum*, tendo diversos efeitos benéficos para a saúde e baixa toxicidade (RICCIO et al., 2020b).

Dentre esses efeitos estão diminuição de taxa de risco cardíaco, agente antioxidante, anti-inflamatório, hipoglicemiante, antimicrobiano, antitrombótico e quimiopreventivo, assim como pode ser utilizado como coadjuvante para o tratamento de doenças neurodegenerativas tais como Alzheimer e Parkinson (KURŠVIETIENĖ et al., 2016).

Sua biossíntese ocorre em espécies vegetais quando sofrem algum dano físico, químico, microbiológico ou mecânico. A síntese do *trans*-resveratrol se inicia a partir das moléculas de fenilalanina que sofrem a ação da enzima fenilalanina amonialiase, ou a partir de moléculas de tirosina na qual a enzima tirosina fenilalanina amônia liase as transformam em moléculas de fenilalanina para dar prosseguimento à biossíntese. Após ação enzimática, duas moléculas de fenilalanina se tornam molécula de ácido cinâmico que então sofre a ação de uma outra enzima, a 4-cumaroil-CoA ligase, formando uma molécula de *para*-cumaroil-CoA. Por fim, essa se condensa com três moléculas de malonil-CoA sob a ação da enzima estilbeno sintase, formando então uma molécula de *trans*-resveratrol (JEANDET et al., 2013).

O resveratrol pode ser encontrado na forma de dois isômeros: o *trans* e o *cis*, como demonstra a Figura 3. A estilbeno sintase sintetiza apenas o isômero *trans* quando sob algum tipo de stress e, ao entrar em contato com a radiação ultravioleta, esse isômero pode atenuar a radiação se tornando no seu isômero *cis*, o que faz com que em plantas frescas se tenha quase que somente o isômero *trans*, enquanto que produtos derivados possuam uma proporção mais significativa do *cis*, o qual é também bioativo, porém com menor potencial terapêutico (ZHAO et al., 2015; FLIEGER; TATARCZAK-MICHALEWSKA; BLICHARSKA, 2017).

O *trans*-resveratrol possui em sua estrutura grupamentos fenoxil (anéis fenila com 6 carbonos com fórmula C_6H_5 ligados a -OH) com as ligações C-H substituídas nas posições 3, 4' e 5 por grupamentos hidroxila (-OH). Há também a presença de uma ponte de etileno (-C=C-) ligando as duas fenilas. São ambas as fenilas que o tornam uma molécula hidrofóbica, porém a presença das hidroxilas permitem com que ele possa apresentar certo grau de polaridade (BENAYAHOU; AMIRA-GUEBAILIA; HOUACHE, 2015).

Na imunoterapia, o resveratrol é capaz de modular diversas enzimas pertencentes às classes das quinases, lipoxigenases, ciclooxigenases e as sirtuínas, algumas delas diretamente relacionadas à inflamação. Acredita-se que seu mecanismo de ação ocorre com a ativação das deacetilases de histona tipo 2 e a SIRT-1 que são proteínas que removem as acetilas das

histonas do DNA, o que altera a transcrição das citocinas pró-inflamatórias como o NF- κ B ao deacetilar sua subunidade RelA/p65, afim de induzir o fator transcricional KLF-2 (Kröppel-like factor 2), fator esse com participação na modulação não só da inflamação, mas também da angiogênese em células epiteliais como as da epiderme, afim de ter efeito como agente vasodilatador e antitrombótico (TAO et al., 2016).

Segundo Shaito e colaboradores, (2020), o *trans*-resveratrol possui diversos efeitos benéficos para a saúde não apenas na imunoterapia, porém altas doses podem levar a efeitos contrários aos que se é esperado. Um exemplo é a atividade antioxidante, a qual ocorre em baixas concentrações, porém quando em maiores quantidades, este composto pode passar a de comportar como um pró-oxidante. Outro exemplo de problemas deletérios causados pelo efeito dose-dependente do composto é o antiproliferativo não seletivo, podendo inclusive a causar citotoxicidade sobre linhagens celulares de fibroblastos, conforme afirmam Maccario e colaboradores (2012).

Trata-se também de uma molécula pouco estável, sendo de difícil incorporação em formas farmacêuticas. Um desses problemas que precisa ser resolvido é sua isomerização de *trans* pra *cis*-resveratrol, uma vez que este composto fotoisomeriza rapidamente, principalmente quando sob a o espectro de luz completo (UV/Vis). O *trans*-resveratrol ainda pode formar outros produtos de degradação devido a dois mecanismos distintos: o ataque da radiação aos seus grupamentos hidroxila, podendo gerar produtos tais como o 4-hidroxibenzaldeído, 3,5-dihidroxibenzaldeído, o 4-ácido dihidroxibenzóico e ao 2-(3,5-dihidroxifenil)-2-ácido hidroxiacético (SILVA et al., 2013).

O resveratrol também é passível de ser oxidado, uma vez que as moléculas de O₂⁻ (ânion superóxido) podem atacar seus grupamentos hidroxila (principalmente o na posição 4' da fração fenólica) e gerar produtos de oxidação tais como o 3,5-ácido dihidroxibenzóico, *para*-hidroxibenzaldeído, 3,5-dihidroxibenzaldeído e o piacetanol (CAMONT et al., 2012).

Devido à sua baixa solubilidade e alta cristalinidade em soluções aquosas, o resveratrol tem dificuldade em ser incorporado em algumas formas farmacêuticas, isso se dá por ele ser um composto classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, ou seja, de baixa solubilidade e alta permeabilidade intestinal, o que então pode prejudicar sua biodisponibilidade não só na administração via oral mas também em outras vias, incluindo a cutânea (ZHOU et al., 2016). Para isso, algumas soluções podem ser propostas, dentre elas a diminuição do tamanho de partícula, formação de sais do fármaco ou pró-fármacos com maior solubilidade, o uso de tensoativos e o emprego das dispersões sólidas (KAMALAKKANNAN et al., 2010).

Por fim, este pode ser vantajoso frente ao tratamento com corticóides, uma vez que estes não irão causar os problemas de uso prolongados observados nos corticóides e têm menor chance de sensibilização com o passar to tempo, o que significa que pode ser utilizado como produto dermatológico para o tratamento basal da dermatite atópica, usando ele após encerrar o tratamento com os corticóides.

2.7 CRISTALINIDADE DE FÁRMACOS

Formas farmacêuticas sólidas têm alguns desafios muito recorrentes, tais como a necessidade de se ter a solubilidade, a taxa de dissolução, a

morfologia e, dependendo da via de administração, a compressibilidade adequada às suas finalidades. No caso tanto da solubilidade quanto da taxa de dissolução, estas podem estar intimamente ligadas à cristalinidade dos materiais, incluindo o fármaco (TAYLOR; BRAUN; STEED, 2021).

Um cristal se forma quando suas moléculas em estado sólido se arranjam de forma regular se repetindo nas mesmas posições de forma tridimensional, enquanto que um sólido amorfo tem suas moléculas distribuídas aleatoriamente, formando interações entre si de modo desordenado (DATTA; GRANT, 2004).

Fármacos em sua forma cristalina possuem menor energia livre, enquanto que ao serem amorfizados eles tendem a ter maior energia livre, sendo esse fator de relevância para o aumento da sua molhabilidade e, conseqüentemente, solubilidade. Porém, durante o armazenamento, o fármaco tende a voltar para o seu estado de menor energia, o que causa sua recristalização com o passar do tempo, tornando o sistema instável (ASGREEN et al., 2020).

Existem diversas formas nas quais um fármaco cristalino pode se apresentar: polimórfica, em forma de co-cristais, de solvatos e hidratos. Cada forma possui uma solubilidade e taxa de dissolução diferente das demais, mesmo que se trate do mesmo composto, desde que este esteja puro e seja avaliados esses parâmetros sob as mesmas condições de temperatura, concentração e pH (MURDANDE et al., 2011).

A molhabilidade de um pó é o pré-requisito para que hajam ações como solubilização, dissolução, desintegração e a dispersão de fármacos sendo este fenômeno determinado pela energia do pó em questão. Porém, pós muitas vezes têm grãos de morfologias e proporções de componentes diferentes, fazendo com que muitas vezes não seja possível determinar exatamente se irão se molhar ou não (PURI et al., 2010).

A solubilidade é uma propriedade onde um sólido, líquido ou gás pode ser dissolvido em um ou mais solventes que podem também estar em um desses três estados físicos da matéria, desde que haja um equilíbrio dinâmico. Um material pode ser dissolvido em outro até o momento no qual ele atinja a concentração de saturação, onde se perde o equilíbrio dinâmico (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012).

Tanto a molhabilidade quanto a solubilidade são diminuídas quando o sólido em pó está em formato cristalino, pois devido às interações intermoleculares desse sólido, seus átomos não estão disponíveis para formar ligações de hidrogênio com o solvente, diminuindo assim a interação com o solvente (SALUJA et al., 2016; WANG et al., 2021).

Existem diversos modos de se amorfizar um fármaco, dentre elas há os métodos de super congelamento de líquidos, moagem, liofilização, *spray drying* e a desidratação de líquidos cristalinos. Os processos de amorfização de fármacos se dividem em duas principais categorias: fornecimento de energia termodinâmica que torna as moléculas termodinamicamente instáveis (como através do fornecimento de calor ou da dissolução) tais como a liofilização e o *spray drying*; ou a conversão dos cristais em materiais amorfos através de métodos físicos que causem a ruptura molecular, tais como a moagem (EINFAL; PLANINŠEK; HROVAT, 2013).

Durante o desenvolvimento e a produção em escala industrial, a recristalização pode ser controlada de diversas maneiras. A primeira é através

de sensores *in situ* detectados por softwares tais como o gCRYSTAL[®], DynoChem[®] e COMSOL Multyphysics[®]. Pode-se também fazer análises de controle de qualidade durante todas as etapas de produção e no produto acabado através da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada (ATR-FTIR) e espectroscopia RAMAN. É possível também fazer o controle através da própria formulação pelo ajuste de fatores como concentração, supersaturação, proporção fármaco e solventes (controle de concentração) e controle da nucleação (impedindo assim o crescimento de novos cristais). Por fim, é possível aplicar modelos algorítmicos preditivos para saber o tempo de estabilidade de uma formulação (GAO et al., 2017).

2.8 DISPERSÕES SÓLIDAS

Apesar de fármacos altamente cristalinos terem alta pureza e estabilidade, eles sofrem de problemas de solubilização, sendo necessárias técnicas capazes de amorfizar o fármaco. As dispersões sólidas (DS) são sistemas geralmente em formato de pós nos quais o fármaco altamente cristalino é misturado a uma matriz inerte (polímeros hidrofílicos) e juntos sofrem algum determinado processo que faz com que as moléculas do fármaco sejam dispersas entre as cadeias poliméricas passando para o estado amorfizado, o que pode aumentar sua solubilidade aparente (WILSON et al., 2020).

O polímero serve para estabilizar o fármaco em consequência de fatores como as interações moleculares, barreira contra o processo de cristalização e efeito antiplastificante. Além disso, por serem utilizadas moléculas hidrofílicas e, devido ao aumento de solubilidade, conseqüentemente há aumento na dissolução do fármaco (SINGH; MOOTER, 2015).

O aumento de solubilidade aparente pode ocorrer ao se adicionar tensoativos que poderão acelerar a solubilidade aparente aquosa do fármaco. Dentre os tensoativos mais comuns, pode-se citar o lauril sulfato de sódio (aniônico), cetrimida e cloreto de benzalcônio (catiônicos), os poloxamers e os polissorbatos (não-iônicos), bem como a polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS) e o Soluplus[®] (anfotéricos) (CHAUDHARI; DUGAR, 2017).

As dispersões sólidas são classificadas por gerações: a primeira contém um carreador cristalino e possui baixa estabilidade; a segunda possui carreadores amorfos capazes de amorfizar o fármaco, possuindo assim uma taxa de dissolução mais elevada, porém também tem baixa estabilidade e o fármaco pode precipitar se estiver supersaturado; a terceira geração contém carreador amorfo hidrofílico e tensoativos que aumentam a solubilidade e a taxa de dissolução, diminuindo a precipitação quando sob supersaturação; a quarta, por fim, possui um polímero insolúvel em água capaz de intumescimento (Soluplus[®]) com dissolução acelerada e liberação controlada do fármaco (TAMBOSI et al., 2018).

Existem diversos estudos que desenvolveram DS contendo fármacos anti-inflamatórios, dentre eles os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) tais como o naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, aceclofenaco, flurbiprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, rofecoxibe, etoricoxibe e o celecoxibe, além de anti-inflamatórios esteroidais tais como a dexametasona, prednisona, prednisolona e a hidrocortisona. Dentre os polímeros mais utilizados para obtenção de

dispersões sólidas contendo esses fármacos, há a quitosana e a PVP (MAESTRELLI; BRAGAGNI; MURA, 2016).

As dispersões sólidas podem, desta forma, aumentar a solubilidade de fármacos utilizados para o tratamento da dermatite, como demonstrado nos estudos envolvendo o rizabeno, fármaco antialérgico também utilizado para os tratamentos de asma brônquica, rinite atópica, queloides, que possui baixa solubilidade e é passível de fotodegradação (assim como o resveratrol). Com isso, esse fármaco sofreu o tratamento com moagem por via úmida e isso fez com que se obtivesse dispersões sólidas cristalinas desse fármaco, o que aumentou sua solubilidade e conseqüentemente sua atividade farmacocinética (ONOUÉ et al., 2011).

Acredita-se que ao atingir o estado de supersaturação de uma dispersão sólida, é possível aumentar a concentração de fármaco livre, o que conseqüentemente aumenta a atividade termodinâmica do soluto (fármaco) e faz com que haja um gradiente de concentração de fármaco entre dispersão sólida e a membrana plasmática das células, favorecendo assim o transporte passivo do fármaco e com isso aumentando a biodisponibilidade (LI; TAYLOR, 2018).

Quanto à estabilidade das dispersões sólidas, é necessário avaliar algumas características. A primeira é a escolha do polímero e da metodologia empregada. O polímero deve ter uma alta temperatura de transição vítrea (T_g) para que este promova o efeito de antiplastificação, o que causa a desaceleração da mobilidade molecular e previne a recristalização do fármaco. Por outro lado, quando o sistema atinge temperaturas maiores que a T_g , ocorre o efeito de plastificação, acelerando a mobilidade molecular e causando a pré-disposição para a recristalização do fármaco (KNAPIK-KOWALCZUK et al., 2020).

Outro problema que estes materiais podem enfrentar é a higroscopia, fenômeno no qual uma substância pode adsorver ou absorver a umidade do ar. Ao absorver a umidade, o material hidrossolúvel pode vir a iniciar sua solubilização, afetando assim a estabilidade do sistema e podendo fazer com que as moléculas de fármaco voltem a fazer interações entre si até recristalizar. Além disso, a umidade pode levar a eventos físicos como o *caking* ou a reações químicas como a plastificação do carreador ou a hidrólise do material (TERESHCHENKO, 2015).

Quanto ao armazenamento das dispersões sólidas, existem vários fatores a serem considerados para manter sua estabilidade. De acordo com Baghel e colaboradores (2016) além de ser necessária a preservação da umidade e do calor, também ocorre que, de modo geral, quanto menor o tempo de contato do material com a fonte de calor do processo e mais devagar o resfriamento do material, maior será a estabilidade do sistema.

2.9 SPRAY DRYING

Existem diversas técnicas para a produção de dispersões sólidas, sendo que as mais utilizadas são extrusão a quente, remoção de solvente com fluido supercrítico, liofilização, o uso de *spray dryer*, leiteo fluidizado e do evaporador rotativo. O *spray dryer* é um equipamento capaz de promover a operação unitária de secagem de materiais que levam solventes orgânicos e polímeros com altas temperaturas de transição vítrea, sendo um método extremamente

rápido de evaporação de solvente, transformando quase que instantaneamente uma solução em partículas sólidas de tamanho pequeno e com boa padronização (GOHEL et al., 2009; SWATI; WANG, 2014).

Tem vantagens frente às outras técnicas, pois causa a remoção rápida de solvente, com uniformidade de tamanho de partícula relativamente maior, gerando partículas nanométricas ou com alguns micrômetros. É uma técnica que admite o uso de solventes orgânicos para otimização da solubilização dos materiais sólidos e melhorar a secagem, como também é possível controlar o tamanho das gotas de formulação a serem secas, uma vez que quanto menor o diâmetro do bocal de atomização, menor será o tamanho da gota e menor será o tamanho da partícula seca (JAMES et al., 2018).

A evaporação rápida do solvente permite que ocorra o aumento da viscosidade do sistema, o que acarreta no aprisionamento cinético do fármaco na matriz inerte do carreador, o que geralmente faz com que se tenha uma dispersão molecular supersaturada levando à formação de sistemas como as dispersões sólidas, sistemas sólidos autoemulsificantes e nanodispersões (ZHANG et al., 2018).

O fluido de alimentação é levado por meio de bomba peristáltica para um atomizador pneumático que o dispersa em finas gotículas no interior de uma câmara de secagem. As gotículas encontram uma corrente de ar quente (ou outro fluido de secagem) que determina a evaporação instantânea do solvente. As partículas sólidas assim formadas são separadas do vapor no ciclone e coletadas na forma de pó. O vapor é levado para fora do sistema por um sistema de vácuo controlado (PAUDEL et al., 2013).

Como as dispersões sólidas consistem em fármacos hidrofóbicos e cristalinos, é importante levar em consideração a escolha dos solventes orgânicos utilizados. Um solvente orgânico tem como função causar a quebra das interações moleculares e conseqüentemente da estrutura cristalina do fármaco para solubilizá-lo. Outro fator importante é que se utilize solventes de fácil volatilização para facilitar o processo de secagem e manter o material o mais seco possível para que este fique estável por mais tempo (SINGH; MOOTER, 2016).

Deve-se também levar em consideração sempre que possível a utilização preferencial de solventes “verdes” ou *eco-friendly*, ou seja, com menor potencial de serem nocivos ao meio-ambiente (CAPELLO; FISCHER; HUNGERBÜHLER, 2007).

2.10. QUITOSANA

Dentre os polímeros usados para a obtenção das dispersões sólidas está a quitosana, cuja estrutura está representada na Figura 5. Trata-se de um biopolímero derivado da desacetilação da quitina que é extraída do exoesqueleto de crustáceos como os camarões, krills, lagostas e os carangueijos após passar pelos processos de desmineralização e desproteínização, sendo um derivado hidrossolúvel (ELIEH-ALI-KOMI; HAMBLIN, 2016).

É difícil determinar características da quitosana, tais como massa molecular ou ponto de fusão, devido a diferentes processos extrativos e produtivos, que geralmente produzem diferentes massas moleculares e graus de desacetilação do material. A quitosana comercializada é geralmente

proveniente dos exoesqueletos de camarões (*Crangon crangon*), de carangueijos (como o *Scylla serrata*) e de escamas de peixes como *Labeo rohita* (KUMARI et al., 2017).

Sua estrutura é basicamente composta por copolímeros de D-glicosamina (porção desacetilada) e N-acetil-glicosamina (porção acetilada) sendo interligados por ligações β -1,4-glicosídicas. Dentre seus grupamentos funcionais em cada monômero estão hidroxilas primárias como substituintes nas posições 2 e 6 nas unidades desacetiladas, bem como hidroxilas secundárias na posição 3 tanto nas unidades acetiladas quanto nas desacetiladas (sendo esses grupamentos responsáveis pelas interações com outros componentes bem como pela protonação do composto, causando assim sua solubilidade em meio ácido). Também existem amins primárias na posição 2 das unidades desacetiladas (ALJAWISH et al., 2015).

Trata-se de um polímero muito utilizado como excipiente em formas farmacêuticas, tais como desintegrante em comprimidos (RASOOL; FAHMY; GALEEL, 2012) e como material de revestimento em cápsulas (SONG et al., 2020).

Este material também pode ser usado para a produção de diversos sistemas de liberação controlada de fármacos, como por exemplo nanopartículas e micropartículas poliméricas (TIYABOONCHAI, 2003; ZHAO et al., 2018), dispersões sólidas (ZHONG et al., 2013), membranas poliméricas (HOMEZ-JARA et al., 2018), hidrogéis (FU; YANG; GUO, 2018) e como material de revestimento de lipossomas (SEBAALY et al., 2021).

Dentre suas vantagens para o uso em medicamentos, a quitosana se demonstra atóxica, biocompatível, com funções antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, mucoadesiva, hemocompatível e imunomoduladora (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016). Na pele, a quitosana pode ter efeito cicatrizante por modular o crescimento de fibroblastos (FENG et al., 2021), na promoção da permeação cutânea (quando utilizada a de baixa massa molecular) e boa bioadesividade (LIU et al., 2018).

2.11. POLOXAMER® 407

O Poloxamer 407® ou Pluronic® (INCI name: Poly(ethylene glycol)-block-poly(propylene glycol)-block-poly(ethylene glycol); Figura 6), é um tensoativo cristalino não iônico de característica hidrofílica que pode ser utilizado em dispersões sólidas como coadjuvante na amorfização do fármaco.

Trata-se de um copolímero composto por blocos de três monômeros diferentes consistindo em um bloco de poli (óxido de etileno) (PEO) de característica hidrofílica em meio à monômeros de poli (óxido de propileno) (PPO) de característica hidrofóbica sendo assim um composto anfifílico. Dentre suas características se destacam o aumento de solubilidade de fármacos pouco solúveis, estabilização de formulações, além de ser um composto atóxico. O Poloxamer pode ter massa molecular de 2000 a 20000 g/mol (GUMASTE; GUPTA; SERAJUDDIN, 2016; BODRATTI; ALEXANDRIDIS, 2018).

Pode funcionar como tensoativo capaz de formar agregados de micelas quando acima de sua concentração micelar crítica (CMC) e temperatura micelar crítica (TMC) sendo que em concentrações muito altas pode vir a formar géis. Acima da CMC e da TMC, os blocos de PPO têm sua solubilidade

em água diminuída, formando micelas onde o PPO fica orientado para o lado da fase hidrofóbica e os blocos de PEO ficam orientados para a fase hidrofílica, fazendo assim contato com a água (KHIMANI et al., 2020).

Além de tensoativo, pode também ter emprego como agente emulsificante, solubilizante, dispersante de suspensões e agir como promotor de absorção (PATEL; PATEL; PATEL, 2009).

2.12. VITAMINA E - TPGS

O D- α -tocoferil succinato de polietileno glicol, também conhecido como Vitamina E TPGS (Figura 7), tem sido utilizado em sistemas de liberação de fármacos devido ao seu emprego como agente solubilizante, promotor de permeação e atividade antitumoral (uma vez que inibe a P-glicoproteína ATP dependente relacionada à tumorigênese) (YANG et al., 2018). Devido às suas atividades solubilizante e promotor de permeação, torna-se um excipiente conveniente para a produção das dispersões sólidas na formulação.

Sendo o TPGS um derivado de vitamina E e PEG, ele se comporta como um material anfifílico e sua ação como tensoativo ocorre a partir da sua CMC, ocorrendo a formação de micelas nas quais a vitamina E (cadeia alquila) por ser hidrofóbica se volta para a fase com maior concentração de material lipofílico, enquanto que a parte do PEG faz interação com a fase aquosa do sistema (MENG et al., 2017).

Geralmente é utilizada no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada tais como micelas, lipossomas e nanopartículas lipídicas (ZHANG; TAN; FENG, 2012).

2.13. MEMBRANAS POLIMÉRICAS

Membranas poliméricas ou filmes poliméricos são sistemas de liberação de fármacos para administração tópica (cutânea, bucal e oftálmica) ou sistêmica (transdérmica, oral e sublingual). Trata-se basicamente de uma camada polimérica fina e flexível. Algumas de suas vantagens são a boa capacidade de incorporação de fármacos, aumento da biodisponibilidade por evitar o metabolismo pré-sistêmico e a não-invasividade (KARKI et al., 2016). Podem ser utilizadas para a cobertura de feridas na pele e para o tratamento de pele alterada devido a problemas como a dermatite (BOUTHILLETTE et al., 2019).

São sistemas vantajosos ao se comparar com formas farmacêuticas convencionais, tais como os semissólidos, devido a não terem a necessidade de aplicações múltiplas e por não serem passíveis de remoção acidental durante a lavagem ou através do atrito com as roupas, por exemplo (PÜNNEL; LUNTER, 2021).

Um filme precisa ter algumas características adequadas ao seu uso, tais como ser atóxico, biocompatível, biodegradável, com boas características mecânicas como a maleabilidade (que pode ser obtida através do uso de plastificantes), ter propriedades de barreira (para evitar a perda exacerbada de água no local da ferida e ainda assim permitir a troca gasosa), além de uma superfície lisa e tamanho uniforme (para evitar a entrega desproporcional de fármaco) (KARKI et al., 2016).

Podem ser classificadas como sistemas reservatório ou matricial. Quando sistema reservatório, o fármaco fica retido em uma camada no interior da membrana, devendo ultrapassar as demais camadas até haver sua liberação. No caso do sistema matricial o fármaco fica disperso em meio às cadeias poliméricas. Quanto a forma de liberação, esta pode ser por difusão passiva do fármaco ou por erosão da membrana (PARK et al., 2018; PETERSEN et al., 2020).

Sendo assim, os filmes poliméricos podem ter aplicação tópica para que haja o efeito cutâneo. Através do processo de difusão, um gradiente de concentração do fármaco é criado entre os meios interno e externo (pele) da membrana, podendo ser um sistema de liberação controlada e constante, o que pode ser uma boa opção para farmacoterapias onde o fármaco possui tempo de meia-vida curto (BATHE; KAPOOR; BATHE, 2015).

No caso da liberação por erosão, ocorrem mudanças nas propriedades físico-químicas do material, tais como intumescimento, deformação e desintegração, sendo a dissolução um fator importante para que ocorra a liberação do fármaco nesse sistema. A liberação por erosão é uma estratégia conveniente quando o fármaco possui baixa solubilidade aquosa (RASOOL; MOHAMMED; SALEM, 2021).

2.14. SOLUTION CASTING

As membranas poliméricas podem ser obtidas por diferentes técnicas, tais como o *solvent casting*, extrusão a quente e electrospinning. Podem ser constituídas de diversos polímeros, dentre eles a quitosana, PVP, álcool polivinílico (PVA), polietilenoglicol (PEG), hidroxipropilcelulose (HPC), hidroximetilpropilcelulose (HPMC), carboximetilcelulose (CMC), entre outros (JANI; PATEL, 2014; GHOSAL et al., 2018).

O método de *solution* ou *solvent casting* consiste em dissolver o polímero e os demais componentes (tais como o fármaco, plastificante e conservante microbiano) em um solvente adequado e então colocar essa mistura sobre uma superfície onde então o solvente é evaporado, moldando o polímero de acordo com essa superfície. Algumas vantagens dessa tecnologia são distribuição da espessura dos filmes que pode ser controlada e uniforme, produção de filmes planos, porém maleáveis, o que pode aumentar a área de contato com o tecido desejado (ANBUKARASU; SAUVAGEAU; ELIAS, 2015).

Ao ser utilizado, deve-se tomar alguns cuidados, tais como solubilizar o polímero e os demais componentes em um solvente adequado e que seja volátil para que haja sua evaporação, deve ser feita uma solução completa do material, evitando assim uma grande proporção de componentes sólidos ou de viscosidade alta ao ponto de não haver a volatilização do solvente e o uso de uma plataforma adequada para que ocorra a secagem, afim de que haja a maior homogeneidade possível das membranas formadas (SIEMANN, 2005).

É necessário também verificar a temperatura de secagem, uma vez que não apenas uma temperatura muito baixa pode não promover uma secagem uniforme, como também uma temperatura alta pode causar degradação do material, mas também é necessário avaliar a Tg dos polímeros utilizados. A Tg tende a diminuir quanto menor for a espessura do filme e pior for a interação entre os seus componentes (uma vez que uma mistura tem Tg diferente do material puro) e, ao se chegar a esta temperatura, o fármaco tenderá a

recristalizar (ERIKSSON; GOOSSENS; PEIJS, 2015; MCKECHNIE et al., 2020).

2.15. POLIVINILPIRROLIDONA

Dentre os polímeros formadores de membranas poliméricas, a PVP, Figura 8, é uma opção interessante tendo em vista que se trata de um material atóxico, não iônico, de alta solubilidade em água e em vários solventes orgânicos, com alta constante dielétrica, sendo um polímero amorfo. Pode ser utilizada na confecção de comprimidos, peletes, grânulos, géis, hidrogeis, membranas poliméricas e em cápsulas gelatinosas (TEODORESCU; BERCEA, 2015).

Possui uma composição fortemente hidrofílica na sua fração 2-pirrolidona (anel lactama com 4 carbonos e um nitrogênio, sendo um dos carbonos fazendo ligação dupla com um oxigênio) e um grupamento hidrofóbico principal que é a sua alquila. Tem excelente solubilidade em água e outros solventes polares devido ao seu grupo amida, do anel pirrolidona, e ao seu grupamento metina (VORONOVA et al., 2018; URANTA et al., 2019).

Sua síntese ocorre a partir da reação de acetileno com formaldeído gerando 1,4-butanodiol, que é então desidrogenado se tornando butanodiol. Após, esse composto sofre ciclização oxidativa e então sofre reação com amônia para a remoção de água, resultando em moléculas de pirrolidona. Por fim, ocorre a introdução do grupamento vinila (-CH=CH₂) finalizando a síntese da PVP (TEODORESCU; BERCEA, 2015).

A PVP é capaz de promover a liberação controlada de fármacos, aumentando a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água, além de protegê-los de agentes externos, como por exemplo temperatura, pH e oxidação. Além disso é um material capaz de mascarar odor e sabor de componentes das formulações (FRANCO; DE MARCO, 2020).

Trata-se de um polímero interessante para ser usado como agente formador das membranas nesse caso, uma vez que ele pode dificultar o rearranjo cristalino do *trans*-reveratrol, bem como conferir a elas características de barreira e mecânicas de alta resistência (KOCZKUR et al., 2015; BASHA et al., 2017).

2.16. GLICERINA

A glicerina ou glicerol (Figura 9) é o principal componente da classe dos ácidos graxos encontrados na gordura animal e no óleo vegetal, sendo utilizada na produção de sabão desde o século XXVIII. É solúvel em solventes tais como o álcool, etilenoglicol, o PEG, acetona e acetato de etila, sendo um material viscoso (1,41 Pa), temperatura de fusão de 18 °C e pH neutro (QUISPE; CORONADO; CARVALHO, 2013).

A glicerina é trihidroxi álcool que possui em sua estrutura um propano com as estruturas 1, 2 e 3 substituídas por hidroxilas, sendo estas responsáveis pela sua higroscopia e hidrossolubilidade. Na pele humana possui efeitos como a manutenção da barreira lipídica do estrato córneo, bem como participa da cicatrização (FLUHR; BORNKESSEL; BERARDESCA, 2005).

No desenvolvimento de membranas poliméricas, a glicerina pode atuar como um agente plastificante, dando assim maleabilidade às formulações. Ela também pode servir como agente solubilizante, veículo para formas farmacêuticas líquidas, além de possuir algumas propriedades úteis para aplicação cutânea como ser emoliente, ceratolítico, anti-irritante e ter efeito promotor de permeação (FLUHR; DARLENSKI; SURBER, 2008).

2.17. POLIETILENOGLICOL (PEG 400)

O PEG (Figura 10) é uma substância anfifílica e biocompatível e com alta capacidade de hidratação. O PEG 400 tem esse nome devido à sua massa molecular, sendo que entre o PEG 100 e o 700 todos têm uma massa molecular baixa o suficiente para se apresentarem líquidos na temperatura ambiente. É um composto altamente hidrossolúvel podendo também ser solubilizado em solventes orgânicos, formando uma monocamada de interface ar-água (D'SOUZA; SHEGOKAR, 2016).

Os PEG são oligômeros de óxido etileno, são polímeros sintéticos produzidos por reações de policondensação em meio ácido ou básico e possuem diversos grupamentos éter ($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$) com grupamentos hidroxila (OH) nos dois terminais de suas cadeias. Quanto maior a quantidade de éteres, maior o tamanho de cadeia e a massa molecular e assim maior a hidrofobia (FOSTER, 2010).

Em medicamentos, o PEG 400 é comumente utilizado como co-solvente por aumentar a solubilidade de substâncias e promotor de permeação e absorção (MA et al., 2017).

Em membranas poliméricas, o PEG 400 pode ser utilizado para a melhora das propriedades mecânicas e térmicas das formulações, tendo efeito como plastificante (PIVSA-ART et al., 2016). Em um estudo publicado (RICCIO et al., 2021), foi possível constatar que ao se desenvolver membranas de quitosana com e sem PEG 400, a presença desse material induziu poros nas formulações, sendo assim, com a utilização desse material nas membranas de PVP foi possível observar novamente a formação de poros nas formulações desenvolvidas.

2.18. BENZOATO DE SÓDIO

O benzoato de sódio (Figura 11), é um composto utilizado como conservante microbiológico de medicamentos, alimentos e bebidas. Trata-se do sal sódico do ácido benzóico sendo um conservante estável em meio aquoso com propriedades bacteristáticas e fungistáticas, impedindo assim a proliferação desses microrganismos na formulação (KHOSHNOUD et al., 2018).

Sua estrutura é composta de um fenol ligado a um grupo carboxila ($\text{O}=\text{C}-\text{OH}$), no qual o próton do hidrogênio é substituído pelo Na^+ e seu mecanismo de ação ocorre a partir do momento que este é absorvido pelo microrganismo em meio ácido. Este então causa uma diminuição do pH intracelular para pH 5 ou menos, diminuindo rapidamente a fermentação anaeróbica da glicose através da enzima fosfofrutoquinase que é inibida, impedindo então a produção de metabolitos necessários para a multiplicação do microrganismo (PONGSAVEE, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar membranas poliméricas de PVP incorporadas com dispersões sólidas de *trans*-resveratrol constituídas de quitosana contendo ou não Poloxamer ou TPGS para aplicação na pele, com potencial ação anti-inflamatória.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver dispersões sólidas de *trans*-resveratrol constituídas de quitosana contendo ou não um tensoativo (Poloxamer 407 ou TPGS), bem como formulações controle (sem tensoativo) através de *spray dryer*, avaliar suas características macroscópicas e calcular seus rendimentos;

- Desenvolver e validar metodologia analítica em CLAE para a quantificação do *trans*-resveratrol nas dispersões sólidas e avaliar a solubilidade e o perfil de dissolução das DS;

- Avaliar as propriedades macroscópicas das dispersões sólidas, calcular seus rendimentos em *spray dryer* e avaliar suas características, como umidade, ângulo de repouso, MEV, DRX, TGA, DSC, FTIR, teor de *trans*-resveratrol e solubilidade em água;

- Desenvolver membranas de PVP incorporadas com as dispersões sólidas mais apropriadas;

- Avaliar as características macroscópicas das membranas e as propriedades de espessura, permeação ao vapor d'água, intumescimento, propriedades mecânicas, MEV, DRX, TGA, DSC e FTIR;

- Realizar estudos *in vitro* de bioadesão, perfil de liberação do *trans*-resveratrol, permeação e retenção cutânea *in vitro* em orelha de porco;

- Avaliar a citotoxicidade das formulações em linhagem de fibroblastos e a atividade anti-inflamatória em modelo de edema de orelha de camundongo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS UTILIZADOS

Ácido acético glacial (Qhemis), água purificada, álcool etílico absoluto (Êxodo Científica), D-succinato de α -tocoferol polietileno glicol 1000 (TPGS, Sigma-Aldrich), extrato 100% resveratrol (Galena), Poloxamer[®] 407 (Sigma-Aldrich), quitosana poli-D-glucosamina de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich), Acetonitrilo (J.T. Backer), ácido acético glacial (J. T. Backer), metanol (Synth), ácido acético glacial (Qhemis), água purificada, álcool etílico absoluto (Êxodo Científica), benzoato de sódio (Pantec), glicerina (Synth), polietilenoglicol 400 (Synth), PVP 360 (Sigma-Aldrich).

4.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Agitador hematológico de tubos AP22 Phoenix[®] (LMP Produtos e Equipamentos para Laboratórios, Brasil), agitador magnético (Nova

Instruments, Brasil), analisador de textura TA-XT Plus® (Stable Micro Systems, Reino Unido), analisador de umidade IV 2500® (Gehaka, Brasil) aparelho dissolutor de comprimidos Q850® (Quimis Aparelhos Científicos, Brasil), balança analítica (BEL Engineering, Itália), banho ultrassônico Ultrasonic Cleaner® (Unique, Brasil), calorímetro exploratório diferencial TGA/DSC 3+® (Mettler Toledo, Brasil), coluna cromatográfica C18 Agilent Eclipse® Plus (Agilent, EUA) com dimensões de 4,6 mm x 250 mm e 5 µm, cromatógrafo líquido de alta eficiência Alliance HPLC® (Waters, EUA), dermatomizador TCM 300® (Nouvag, EUA), difratômetro de raios-X D500® (Siemens, Alemanha), espectrofotômetro de microplacas EPOCH® (Biotek Agilent, EUA), espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier VERTEX® 70 (Bruker, EUA), espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier IR PRESTIGE-21® (Shimadzu, Japão), estufa modelo 702.780® (Quimis, Brasil), micrômetro digital Great MT-04513® (Mitutoyo Sul Americana, Brasil), microscópio eletrônico de varredura JSM 7500F® (Jeol, Japão), microscópio JSM 7500F (Jeol, Japão), sistema automático com células de difusão vertical de Franz Microette Plus® (Teledine Hanson Instruments, EUA), sistema de purificação de água MilliQ Plus® com condutividade 12,3 µS/cm⁻¹ (Millipore, EUA), spray dryer MSD 1.0® (LabMaq, Brasil).

4.3. MÉTODOS

4.3.1. PRODUÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS

As dispersões sólidas foram preparadas dispersando a quitosana em 150 mL de solução aquosa de ácido acético 15% sob agitação magnética a 700 rpm durante 1 hora. Após isso, foi adicionado Poloxamer® ou TPGS à solução e agitado novamente sob as mesmas condições. O *trans-resveratrol* foi dissolvido em 135 mL de álcool etílico e adicionado à solução e novamente com agitação sob as mesmas condições descritas. Ao final, as soluções tiveram seus volumes ajustados em cálices de 300 mL e agitadas com o auxílio de bastão de vidro, sendo armazenadas em frascos âmbar com tampa e batoque. As soluções foram então levadas ao *spray dryer* MSD 1.0, LabMaq do Brasil, possuindo sistema fechado e dispositivo de circulação de gás inerte (inert loop) de modo a evitar explosões ao serem secas soluções contendo alto teor de etanol.

O equipamento operou sob as seguintes condições: pressão de -50 mmHg, temperatura de entrada de 180 °C, temperatura de saída de 120 °C, blower 1,5, alimentação de 0,3 L/h sendo então as dispersões sólidas obtidas recolhidas e acondicionadas em frascos âmbar com tampa. A Tabela 1 apresenta as proporções utilizadas na obtenção das dispersões sólidas. As formulações elaboradas estão presentes nas Tabelas 2 e 3, as quais apresentam as diferentes concentrações empregadas.

Tabela 1: Proporções utilizadas na elaboração das dispersões sólidas.

Componentes	Concentrações	
<i>Trans</i> -resveratrol:quitosana	1:9	1:3
Poloxamer/TPGS	0,5%	1%

Tabela 2: Composição das dispersões sólidas contendo Poloxamer® 407.

Formulações	<i>Trans</i> -resveratrol:quitosana	Poloxamer (%)
DS-1:9-PX0.5	1:9	0,5
DS-1:9-PX1	1:9	1
DS-1:3-PX0.5	1:3	0,5
DS-1:3-PX1	1:3	1

Tabela 3: Composição das dispersões sólidas contendo TPGS.

Formulações	<i>Trans</i> -resveratrol:quitosana	TPGS (%)
DS-1:9-TPGS0.5	1:9	0,5
DS-1:9-TPGS1	1:9	1
DS-1:3-TPGS0.5	1:3	0,5
DS-1:3-TPGS1	1:3	1

Além disso, duas outras formulações foram feitas sem esses tensoativos e utilizadas para fins comparativos, sendo elas DS-1:9-C e DS-1:3-C (nas duas proporções utilizadas de acordo com a Tabela 1).

4.3.2. RENDIMENTO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS

O rendimento do processo foi calculado imediatamente após os experimentos de secagem com base no peso do frasco coletor acoplado ao *spray dryer*. O frasco foi devidamente seco e manuseado com luvas sendo pesado antes do processo e, após a secagem das dispersões sólidas, esse frasco foi novamente pesado com o material obtido, sendo subtraído o seu peso inicial. As análises de rendimento foram realizadas em triplicata e os cálculos de rendimento foram obtidos de acordo com a Equação 1 (SAQUIB HASNAIN; NAYAK, 2012).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa de sólidos após secagem}}{\text{Massa de sólidos inicial}} \times 100$$

Equação 1: Rendimento da produção das dispersões sólidas por *spray dryer*.

4.3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS

4.3.3.1. TEOR DE UMIDADE

O teor de umidade de pós foi determinado para as dispersões sólidas e para o *trans*-resveratrol e a quitosana livres. As análises foram feitas em triplicata pesando 1,0 g de amostra em balança infravermelho com lâmpada de halogênio acoplada, sendo a perda de massa computada como percentagem de teor de umidade (VOGL; OSTERMANN, 2006).

4.3.3.2. ÂNGULO DE REPOUSO ESTÁTICO (α)

O ensaio foi realizado conforme o descrito por Lamolha e Serra (2007). Foi utilizado um funil de 140 mm de diâmetro superior e 11 mm de diâmetro inferior, sendo preso por garra e suporte fazendo com que a base do funil ficasse 250 mm acima da superfície onde o pó ficou acondicionado após o fluxo. Com isso, logo abaixo do funil, colocou-se papel pardo para facilitar a visualização do pó e, com uma régua, mediu-se a altura (h) e o diâmetro (d) do pó. Os valores de α foram calculados através do uso de h e d realizando-se o cálculo da hipotenusa.

4.3.3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os pós foram tridimensionalmente avaliados usando microscópio eletrônico de varredura (MEV) em microscópio JSM[®] 7500F (Jeol, Japão). O preparo das amostras consistiu na deposição de uma camada fina de carbono, a fim de torná-las condutoras. As fotomicrografias de cada amostra foram obtidas com ampliação de 2000, 35000 e 50000 x (BARUD et al., 2015).

4.3.3.4. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

As medidas de DRX foram executadas em difratômetro de raios-X D5000 (Siemens, Alemanha) à temperatura ambiente, com radiação de Cu-K α ($\lambda=1,5406$ Å), com voltagem de 40 kV e corrente elétrica de 40 mA. Os difratogramas foram obtidos sob varredura de raios-X de ângulo aberto 2θ de 2 a 40° e velocidade do goniômetro de 0,05% (SETHIA; SQUILLANTE, 2003). Também foram preparadas misturas físicas entre os principais componentes das formulações na proporção de 1:1 (1 g de cada) para avaliar se houve mudança no perfil cristalino do *trans*-resveratrol.

4.3.3.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Foram identificados os grupos funcionais pela mistura do pó das matérias-primas ou dispersões sólidas com KBr para formar as pastilhas na proporção de 4 mg de amostra para 200 mg de KBr. As pastilhas foram analisadas em equipamento Shimadzu[®] IR PRESTIGE-21 (Kioto, Japão), com 32 scans.min⁻¹ na faixa de onda de 4000 a 400 cm⁻¹ (MERLIN; LIMA; SANTOS-TONIAL, 2015).

4.3.3.6. TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (TG-DSC)

As análises foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório TGA/DSC 3+ (Mettler Toledo, EUA). As análises foram conduzidas sob atmosfera de gás nitrogênio (50 mL/min), sendo colocados cerca de 5 mg de

amostra em cadinhos de porcelana sem tampa, havendo outro cadinho vazio como referências para ser avaliada a diferença de perda de massa e os eventos térmicos. As amostras foram aquecidas de 30 a 330 °C com razão de aquecimento de 10 °C/min (ELOY et al., 2012).

4.3.3.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE *TRANS-RESVERATROL*

A metodologia de quantificação de teor foi descrita por Eloy et al. (2012). Para a análise, foi pesado o equivalente a 5 mg do fármaco (tanto livre quanto o correspondente a essa massa em cada dispersão sólida) para determinar o teor de *trans-resveratrol* nas dispersões sólidas. As dispersões foram então solubilizadas em 2 mL de acetonitrila. As amostras foram homogeneizadas em agitador de vórtice por 10 minutos (para extração do fármaco da matriz) e, em seguida, uma amostra de 1 mL foi transferida para um frasco volumétrico âmbar de 10 mL e preenchido com acetonitrila. As soluções foram filtradas em membranas de seringa de PTFE (0,45 µm), colocadas em frascos âmbar e analisadas em CLAE (Apêndices A e B). Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.3.3.8. TESTE DE SOLUBILIDADE

A solubilidade tanto das dispersões sólidas quanto do *trans-resveratrol* livre foi determinada de acordo com Park et al., 2013, pela adição de um excesso de pó (o correspondente a 10 mg de *trans-resveratrol* em cada formulação) em 10 mL água deionizada. As amostras foram submetidas à agitação por 48 horas em agitador hematológico de tubos a 50 rpm na temperatura controlada de 32±0,5 °C (temperatura da pele) e filtradas em membrana de seringa de politetrafluoretileno (0,45 µm). Em seguida, as soluções obtidas foram diluídas em acetonitrila por diluições seriadas até atingir a faixa de trabalho obtida pela curva de linearidade do método validado por CLAE (Apêndices A e B).

4.3.4. PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS DE PVP

Foram selecionadas duas formulações de dispersões sólidas para incorporação nas membranas de PVP: DS-1:9-TPGS1 e DS-1:3-TPGS1, ambas com TPGS na mesma proporção, diferenciando apenas na concentração fármaco:polímero, conforme a Tabela 4.

Tabela 4: Dispersões sólidas selecionadas para a incorporação nas membranas de PVP.

Formulações	Fármaco:polímero	TPGS (%)
DS-1:9-TPGS1	1:9	1
DS-1:3-TPGS1	1:3	1

Membranas de PVP foram feitas contendo 1% do polímero, 0,1% de benzoato de sódio, 0,05% de glicerina e 0,05% de PEG 400 e 1% de dispersão sólida (Tabela 5). Foram também feitas membranas controle, sem o fármaco e contendo quantidade correspondente de quitosana e TPGS.

Tabela 5: Planejamento para a produção das membranas de PVP.

Formulações	Resveratrol (g)	Quitosana (g)	TPGS (g)
M-1:9-TPGS1-C	-	0,9	0,1
M-1:3-TPGS1-C	-	0,75	0,1
M-SD-1:9-TPGS1	0,10	0,9	0,1
M-SD-1:3-TPGS1	0,25	0,75	0,1

As formulações foram feitas com uma solução de 50% de álcool etílico e 50% água purificada e então colocadas em balão volumétrico com 1% de ácido acético. Essa solução foi primeiramente utilizada para solubilizar as dispersões sólidas/quitosana, sendo agitadas a 700 rpm por uma hora. Após isso, o PVP e os demais componentes foram acrescentados e agitados sob as mesmas condições. As soluções finais foram vertidas em placas de Petri de plástico (30 g) e levadas para secar em estufa a 40 °C. Ao final, as membranas foram retiradas das placas com uma pinça de metal e acondicionadas em *bags* papel alumínio, sendo armazenadas abrigadas da luz e de variações de temperatura.

4.3.5. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

4.3.5.1. ESPESSURA

A espessura foi avaliada com o uso de micrômetro digital Great MT-04513[®] sendo avaliados 6 pontos diferentes em cada membrana e cada formulação sendo avaliada em triplicata para então serem feitas as médias (em µm) e os desvios padrão de cada amostra (MENEGUIN et al., 2017).

4.3.5.2. PERFIL DE INTUMESCIMENTO

A avaliação do perfil de intumescimento das membranas se deu através de uso do Funil de Enslin (MENEGUIN et al., 2017), onde o dispositivo do funil foi acoplado à uma pipeta volumétrica de 1 mL sendo sua ponta vedada para evitar o extravasamento do meio utilizado. Uma solução tampão fosfato pH 7,4 foi adicionada ao sistema percorrendo desde a marca 0,0 mL da pipeta até a placa de vidro sinterizada do funil, sendo retirado o excesso e calibrado o menisco da pipeta. As membranas foram então seccionadas em fragmentos de 1 cm² de área e pesadas, sendo cada uma então disposta sobre a placa sinterizada e o funil tampado com plástico filme. O volume de líquido absorvido foi avaliado em função do tempo, sendo os tempos avaliados os seguintes: 1, 5, 10, 30, 60, 90 e 120 minutos. Cada formulação foi analisada em triplicata.

Os resultados foram expressos em percentagem de líquido absorvido em relação à massa pesada de cada amostra, conforme a equação 2:

$$I\% = V \cdot m$$

Equação 2: Cálculo de percentagem de intumescimento.

Onde:

I% é a percentagem de instumescimento da membrana;

V é o volume do meio absorvido em mL;

m é a massa pesada do fragmento da membrana em g.

4.3.5.3. TAXA DE TRANSMISSÃO DE VAPOR D'ÁGUA (TTVA) E PERMEABILIDADE AO VAPOR D'ÁGUA (PVA)

A permeabilidade das membranas ao vapor d'água foi determinada gravimetricamente, de acordo com Akhtar et al. (2019). Seções circulares de cada filme foram recortadas e tiveram suas espessuras determinadas por micrômetro digital Great MT-04513 (Mitutoyo, Japão) e então firmemente fixadas no topo de frascos de vidro com capacidade para 20 mL e tampas contendo um orifício interno com abertura de 1,1 cm. Os frascos foram preenchidos com 10 mL de água destilada (100% UR) e as membranas foram presas firmemente entre a boca dos frascos e as tampas para evitar que houvesse espaços abertos por onde o vapor d'água pudesse passar. Após a montagem dos sistemas, os frascos foram pesados, tiveram seus pesos anotados e colocados em dessecador contendo sílica gel (0% UR). Em tempos pré-determinados (24, 48, 72, 96 e 120 horas) os frascos foram retirados do dessecador para serem pesados e anotados os valores. Após a obtenção destes valores, foi plotado um gráfico tempo *versus* massa para a determinação do TTVA.

O PVA foi calculado para cada amostra pela equação 3:

$$PVA = TTVA \cdot \frac{X}{A \cdot P_0(RH1 - RH2)}$$

Equação 3: Determinação da PVA.

Onde:

TTVA é a taxa de transmissão de vapor d'água de acordo com a inclinação da curva massa por tempo;

X é a espessura da membrana em milímetros;

A e a área de superfície da membrana exposta ao permeante (vapor d'água)

P₀ é a pressão de vapor da água pura (3,159 kPa a 25 °C);

RH1 e RH2 são o gradiente de umidade relativa.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os resultados foram tratados pela análise de variância (ANOVA), assim como por comparações múltiplas pelo método de Tuckey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4.3.5.4. PROPRIEDADES MECÂNICAS

As propriedades mecânicas das membranas foram determinadas em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, EUA) sendo equipado com sonda de aço inoxidável e de ponta esférica (diâmetro de 2,5 cm). Secções dos filmes foram usadas para realizar as análises em quintuplicata (MENEGUIN et al., 2017). As amostras foram fixadas em suporte metálico com um orifício circular com diâmetro de 0,5 cm e a análise se deu iniciando a sonda a uma distância de 25 mm do suporte metálico. A sonda desceu perpendicularmente à superfície das membranas a uma velocidade constante de $0,10 \text{ mm/s}^{-1}$ e força de gatilho de 0,005 Kg. Com isso, através do *software* conectado ao equipamento, foram feitas curvas de força *versus* deslocamento, sendo a força necessária para romper cada membrana registrada até a perfuração do material. Com essas curvas, foi possível determinar as propriedades mecânicas, tais como a resistência à perfuração (R_p), alongamento durante a perfuração (A_p) e energia na perfuração por unidade de volume (E_p), que foram calculados de acordo com as equações 4, 5 e 6, respectivamente.

$$R_p = \frac{F}{A}$$

Equação 4: Resistência à perfuração das membranas.

Onde:

F é a força necessária para romper a membrana;

A é a área de secção transversal das membranas ($A = 2 \cdot r \cdot d$, sendo r o raio do orifício e d a espessura da membrana).

$$A_p(\%) = \sqrt{r^2 + d^2} - Rr \times 100$$

Equação 5: Alongamento durante a perfuração das membranas.

Onde:

r é o raio da membrana sobre o orifício da placa;

d é o deslocamento do dispositivo no ponto de contato até a ruptura da membrana.

$$E_p = \frac{AUC}{V}$$

Equação 6: Energia na perfuração por unidade de volume das membranas.

Onde:

AUC é a área sob a curva de força versus deslocamento;

V é o volume da membrana ($V=nr^2h$) sobre o orifício da placa.

4.3.5.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise se deu sob as mesmas condições que para as amostras de dispersões sólidas, conforme o item 4.3.3.3.

4.3.5.6. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

A análise se deu sob as mesmas condições que para as amostras de dispersões sólidas, conforme o item 4.3.3.4.

4.3.5.7. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (ATR)

Foram identificados os grupos funcionais através da avaliação direta das membranas através do uso do ATR VERTEX® 70 Bruker. As membranas foram avaliadas em meio de reflexão total atenuada utilizando raio polarizado de KBr, detector DLaTGS, acessório de amostragem de placa de diamante e faixa de leitura de 4000 a 400 cm^{-1} (GRÉGOIRE et al., 2020).

4.3.5.8. TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (TG-DSC)

A análise se deu sob as mesmas condições que para as amostras de dispersões sólidas, conforme o item 4.3.3.6.

4.3.5.9. BIOADESÃO *IN VITRO*

Foi utilizado um analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, EUA) no modo *adhesion test*. As peles de porco foram dermatomizadas em 500 μm com o uso de dermatômetro TCM® 300 (Nouvag, Suíça), hidratadas com solução de NaCl 0,9% por 15 min a 32° C (temperatura da pele) e fixadas na sonda com anéis de borracha. Fragmentos de membranas com área de 1 cm^2 foram colocados sobre plataforma com orifício de 1 cm de diâmetro. A descida da sonda se deu em velocidade constante a 1 mm/s^{-1} até o encontro da pele com a formulação, sendo mantido com uma força de 0,05 N por 300 seg. A pele foi então separada da formulação com subida a 1 mm/s^{-1} , registrando a força de resistência das membranas, gerando uma curva força *versus* tempo, da qual o trabalho e o pico de adesão foram calculados. O teste foi feito em quintuplicata (SCHROEDER et al., 2007).

4.3.5.10. LIBERAÇÃO DO TRANS-RESVERATROL *IN VITRO*

O perfil de liberação do fármaco presente nas membranas poliméricas foi avaliado em equipamento automático de permeação HANSON MICROETTE® 0700-1251 (Teledyne Hanson Research, EUA), sendo as formulações colocadas sobre membranas sintéticas de acetato de celulose (0,45 µm) e 7 mL de solução receptora constituída de tampão fosfato pH 7,4 nas condições *sink* determinadas pelo estudo de solubilidade. As formulações foram cortadas de modo padronizado e colocadas sobre a membrana sintética disposta na célula de Franz com área de exposição de 1,77 cm², sendo presas por presilhas próprias do equipamento. Os experimentos foram realizados a 32 °C com agitação constante da solução receptora a 300 rpm. Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos de 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas (PRIMO et al., 2008). A quantificação do *trans*-resveratrol na solução receptora foi realizada por CLAE (Apêndices A e B), utilizando a curva analítica obtida na validação do método.

4.3.5.11. PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Foi realizada nas mesmas condições do ensaio de liberação. A pele de orelha de porco foi utilizada como meio *ex vivo* para a mimetização da pele humana, sendo dermatomizada até 500 µm deixando o estrato córneo em contato com as formulações e 7 mL da solução receptora de tampão fosfato pH 7,4 nas condições *sink* determinadas, de modo semelhante ao conduzido no ensaio de liberação *in vitro*. A quantificação foi feita pela análise das alíquotas de líquido receptor em CLAE nas condições validadas (Apêndices A e B) (RUELA et al., 2016).

4.3.5.12. RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Após a análise de permeação cutânea, as peles de porco utilizadas foram retiradas das células de Franz. As peles foram lavadas com água destilada e secas com papel absorvente. Em seguida, foi realizada o *tape stripping* para a remoção do estrato córneo com 16 fitas adesivas (Scotch 750 3M), descartando a primeira. As fitas foram colocadas em tubos de ensaio com 5 ml de acetonitrila e agitação em vórtex por 1 min sendo então as soluções submetidas ao banho de ultrassom por 15 min. As soluções foram filtradas e analisadas por CLAE sob as condições validadas para a quantificação do fármaco retido no estrato córneo. Fragmentos das peles foram colocados em tubos com 5 ml da solução de acetonitrila com agitação em vórtex por 2 min, em homogeneizador de alto cisalhamento Ultra Turrax® por 1 min e em seguida em lavadora ultrassônica por 30 min. O conteúdo foi então filtrado em membrana (0,45 µm) e analisado por CLAE nas condições pré-estabelecidas (Apêndices A e B) (PRIMO et al., 2008).

4.3.5.13. CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

A partir da cultura celular de fibroblastos, realizou-se uma suspensão celular na concentração de 2×10^5 células ml⁻¹. Posteriormente foram pipetados 4 ml

desta suspensão em cada poço (3,5 cm de diâmetro) das placas de 6 poços (Costar®), em meio Dulbecco's com 5% de soro fetal bovino. Estas placas permaneceram em estufa, a 37° C com 5% de CO₂, por 48 horas, para permitir a adesão e a confluência da monocamada celular. A viabilidade celular mínima para a realização do ensaio foi de 85%.

Após 48 horas, o meio de cultura foi aspirado e realizou-se a lavagem dos poços com 2 ml de tampão fosfato pH 7,4 (PBS). Logo após, o PBS foi aspirado e 1 ml do meio de cobertura foi adicionado em cada poço. Este meio de cobertura foi composto por ágar a 1,8%, adicionado do corante vermelho neutro a 0,01% e DMEM 2X concentrado (1:1 v/v). Tanto o ágar quanto o meio de cultura permaneceram em banho-maria a 40 °C até serem colocados em contato com a monocamada de células. As placas permaneceram na capela de fluxo laminar por 15 minutos, aguardando a solidificação do ágar, à temperatura ambiente. Fragmentos padronizados das membranas foram colocados com pinças cirúrgicas no centro do poço contendo ágar, bem como foi adicionada uma solução de *trans*-resveratrol 3 mg/mL em DMSO (m/v) para comparação em outros poços. Para o controle celular, o primeiro poço recebeu apenas o meio de cobertura. Para o controle negativo, foi utilizado disco de papel filtro embebido em meio de cultura DMEM, e para o controle positivo, foi utilizado disco de papel filtro embebido em TRITON-X. Todas as formulações e a solução do fármaco em DMSO foram testadas em triplicata. As placas foram embrulhadas em papel de alumínio, para evitar o dano celular por fotoativação do vermelho neutro e levadas à estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas. Após a incubação, os poços foram macroscopicamente observados, e a formação de um halo claro ao redor das amostras e dos controles positivos, evidenciou os efeitos relativos à citotoxicidade. A extensão da área descolorada foi dividida em 4 quadrantes, a partir do disco de papel filtro contendo as amostras. Os quadrantes foram mensurados visualmente, através de transparências milimetradas sob as placas e paquímetro, e então registradas (RODERO et al., 2018).

4.3.5.14. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

Para o estudo de atividade anti-inflamatória *in vivo* foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) machos da linhagem Swiss pesando entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu, UNESP. O experimento foi realizado no biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos, FCFAr/UNESP. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno em condições controladas de temperatura (23±1 °C), umidade (55±5%) e luz (ciclo de 12 horas claro/escuro), com água e ração *ad libitum*. A utilização destes animais para realização do experimento foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, Protocolo CEUA/FCF/CAr n° 31/2020.

Para que o teste fosse iniciado, os animais foram anestesiados com injeção de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin Syntec®, Brasil) com uma dose equivalente a 145 mg/Kg, administrada via interperitoneal. Cada grupo com 6 animais recebeu um tratamento específico, conforme o disposto a seguir, na Tabela 6.

Tabela 6: Divisão do grupos de acordo com os tratamentos realizados.

Grupo	Tratamento
1	Suspensão de <i>trans</i> -resveratrol (3 mg/mL) contendo 0,2% (p/v) de lauril sulfato de sódio
2	M-SD-1:3-TPGS1
3	M-SD-1:9-TPGS1
4	M-1:9-TPGS1-C
5	M-1:3-TPGS1-C
6	Controle positivo: creme comercial de dexametasona (1 mg/g)
7	Controle negativo: sem tratamento

Administraram-se fragmentos de membranas de 1 cm de diâmetro (cerca de 20 mg de formulação) na orelha direita dos animais, sendo que o grupo do controle negativo não recebeu nenhum tratamento e o grupo do controle positivo foi tratado com uma formulação comercial de dexametasona. A indução ao processo inflamatório cutâneo ocorreu pela administração tópica de 20 μ L de óleo de cróton (2,5% v/v) dissolvido em acetona, sendo aplicado na superfície interna da orelha direita dos camundongos (de cerca de 1 cm²) após receber o tratamento com as formulações já administradas. A orelha esquerda permaneceu sem tratamento (MAS *et al.*, 2016). Após seis horas de observação, os animais foram submetidos à eutanásia por dióxido de carbono (CO₂) via inalatória. Após a eutanásia, as orelhas diretas e esquerdas foram seccionadas em circunferências de 6,0 mm de diâmetro usando um *punch* dermatológico e pesadas. A resposta edematosa foi medida de acordo com a diferença de peso entre a circunferência das orelhas direita e esquerda de cada camundongo. A atividade anti-inflamatória foi expressa de acordo com a percentagem de redução do edema ao se comparar os pesos das duas orelhas, bem como houve a comparação por ANOVA dos camundongos tratados em comparação com os camundongos dos grupos controle (BARICEVIC *et al.*, 2001).

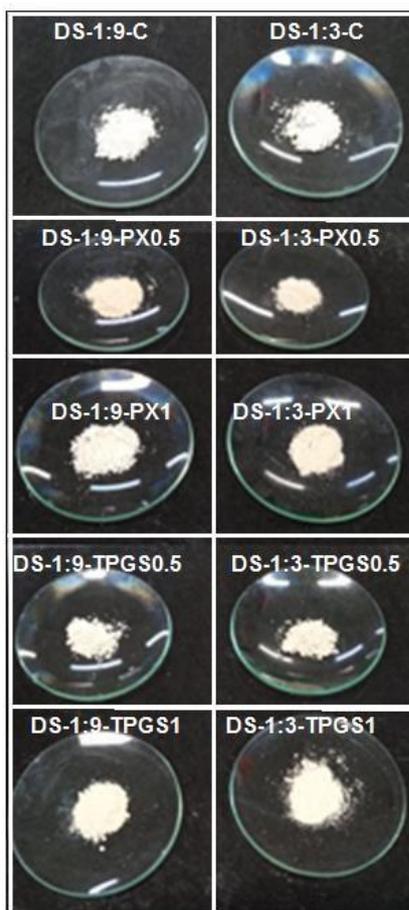
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS

5.1.1. ASPECTO DAS DISPERSÕES SÓLIDAS

As dispersões sólidas obtidas podem ser visualizadas na Figura 1. Elas se demonstraram como pós finos, higroscópicos (susceptíveis ao *caking*), contendo coloração amarela clara (mais clara que a quitosana pura). Um odor residual de ácido acético também foi notado.

Figura 1: Aspecto visual das dispersões sólidas.



Os pós obtidos se apresentaram finos, sendo que isso pode se correlacionar com o baixo conteúdo de sólidos na dispersão antes da secagem, o que gera gotículas menores e então partículas menores. Outro fator relevante é que o uso de solventes orgânicos pode ter impactado no tamanho de partícula obtida devido à baixa tensão superficial que gera com o bico aspersor do *spray dryer* (PATEL et al., 2015).

Outro fator importante foi a escolha do sistema de solventes orgânicos. Ao escolher o sistema solvente, foi levado em consideração que a mistura de solventes atendesse à constante dielétrica tanto do fármaco quanto da quitosana, fazendo com que ambos estivessem solubilizados no sistema. Menos álcool causou a precipitação do *trans-resveratrol*, fazendo com que a solução obtivesse um aspecto perolado, de rápida separação de fases e uma menor concentração de ácido acético causava a demora e a dificuldade de solubilização da quitosana, sendo que menores concentrações de ácido acético causaram a precipitação da quitosana ao entrar em contato com o álcool devido à diluição deste no sistema, o que resultou na formação de halo amarelo no fundo do frasco de armazenamento. Apesar de homogêneos, durante a secagem, os materiais no estado líquido ficaram em agitação por agitador magnético a 500 rpm para verificar se a uniformidade do sistema se manteria e para que houvesse a uniformidade no material seco, assim como evitar o possível entupimento do bico aspersor do *spray dryer*.

Apesar de o processo de *spray drying* ser um dos processos mais eficientes para a remoção do solvente e secagem de pós, é comum a sobra

residual desses solventes, o que pode deixar as dispersões sólidas com o odor característico, o que poderia ser resolvido com uma técnica secundária de secagem (KUMARI et al., 2017) tais como o uso de um secador a vácuo podendo conter ou não solventes (como pequenas proporções de soluções hidroalcoólicas, o que aumenta a eficiência da secagem secundária) (SHEPARD et al., 2020).

A formação do *cake* está relacionada à alta higroscopia e provavelmente ao residual de solventes presente nas formulações. Também há a tendência de ocorrer esse fenômeno quando há o armazenamento incorreto sob temperatura e umidade relativamente altas, assim como por características do próprio pó sua composição química (se altamente hidrofílica), distribuição de tamanho e características morfológicas, uma vez que ocorre a umidificação de sua superfície que gera atração entre as partículas, levando à coesão entre elas. Se ao estarem em contato elas são resfriadas ou secas, forma-se uma coesão forte o suficiente para causar o empedramento (PELEG, 2020).

Partículas sólidas amorfas contendo uma porção cristalina são passíveis de sofrer sinterização, processo no qual as partículas ao serem expostas à temperatura de transição vítrea (T_g) de seus compostos sofrem o relaxamento das cadeias poliméricas que passam a apresentar um estado viscoso o qual tende a se equilibrar novamente, fazendo ligações viscosas com a umidade atmosférica para que haja a diminuição desse estado viscoso. Ao fazer interação com a água atmosférica, esta atua como um plastificante na matriz amorfa que diminui a T_g causando a pegajosidade das partículas e então o *caking* (SCHREYER; PALZER, 2007).

De acordo com o observado por Dong e colegas (2004), não existe um consenso quanto à T_g da quitosana, porém a maioria dos autores observa esse fenômeno a partir dos 150 °C (tendo pouca correlação com o grau de desacetilação do material), algo que não deve ter ocorrido devido à temperatura de secagem ter sido abaixo desse valor (120 °C).

5.1.2. RENDIMENTO DO PROCESSO EM *SPRAY DRYER*

Os valores médios e desvio padrão de cada uma das formulações desenvolvidas estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7: Rendimentos médios e desvios padrão dos processos produtivos.

Formulações	Médias (%)
DS-1:9-C	43,23±3,16
DS-1:3-C	34,27±4,61
DS-1:9-PX0.5	42,11±3,90
DS-1:9-PX1	50,01±2,44
DS-1:3-PX0.5	46,47±3,58
DS-1:3-PX1	53,53±3,64
DS-1:9-TPGS0.5	39,89±2,92
DS-1:9-TPGS1	56,98±5,19
DS-1:3-TPGS0.5	42,10±3,14
DS-1:3-TPGS1	48,25±5,23

De acordo com os resultados obtidos, não houveram diferenças estatísticas entre as amostras, porém, é possível notar um ligeiro aumento nas médias das formulações contendo menor proporção de quitosana e de adjuvante farmacêutico (seja ele Poloxamer ou TPGS).

Isso se deve principalmente ao fato de que a quitosana é um material higroscópico e que possui adesividade quando em contato com superfícies, principalmente quando eletricamente carregada (pré-requisito para sua solubilização em solução ácido acético) podendo se manter ainda carregada positivamente durante a passagem pelo sistema do *spray dryer* o que causa uma considerável adesividade em superfícies como as paredes do ciclone do equipamento (MUNAWIROH; LIPIPUN; RITTHIDEJ, 2018; CHANDRASEKHARAN et al., 2019).

A umidade residual tende a aumentar quanto menor for a taxa de aspiração do *spray dryer*; logo, é possível que se houvesse uma menor umidade das formulações, haveria também um maior rendimento por diminuir sua adesão às paredes do equipamento, porém, é preciso notar que uma taxa de aspiração menor aumenta o rendimento do processo (que nesse caso foi de 0,3 L/h), o que faz com que seja difícil de prever qual dos dois fatores pode ter impactado mais no rendimento do processo. Outra questão é a alta viscosidade gerada pela adição da quitosana, fazendo com que o conteúdo de sólidos fosse baixo para não tornar as suspensões tão viscosas. A baixa proporção de sólidos comparada com a proporção de solventes também causa aumento na umidade final dos produtos, pois há uma diminuição de transferência de calor e massa, diminuindo a temperatura de *outlet* do equipamento, não secando completamente as dispersões sólidas (OGUNJIMI; FIEGEL; BROGDEN, 2020).

O fato de ter sido escolhido o álcool como um dos solventes orgânicos pode ter sido também favorável ao aumento de rendimento do processo. Kaupinnen et al., 2018 relataram que ao se comparar os rendimentos na produção de dispersões sólidas de quitosana contendo etanol, etil acetato ou apenas água, o etanol apresentou valores maiores no rendimento do produto.

5.1.3. TEOR DE UMIDADE

O teor de umidade está relacionado com o potencial higroscópico dos pós. Cada pó possui uma constituição química que pode realizar interações com a umidade atmosférica em maior ou menor grau. Pós capazes de realizar maiores interações com a umidade do ar (como a adsorção de água) podem estar mais susceptíveis à problemas de estabilidade, tais como a hidrólise, o *caking* e o crescimento bacteriano. A Tabela 8 traz as médias das percentagens de umidade para cada pó analisado.

Tabela 8: Médias de percentagem de umidade.

Formulações	Umidade (%)
<i>Trans-resveratrol</i>	5,9±0,12
Quitosana	14,4±0,12
DS-1:9-C	6,4±0,00
DS-1:3-C	4,0±0,06
DS-1:9-PX0.5	5,8±0,10
DS-1:9-PX1	4,9±0,00
DS-1:3-PX0.5	5,3±0,06
DS-1:3-PX1	6,1±0,15
DS-1:9-TPGS0.5	6,8±0,12
DS-1:9-TPGS1	6,0±0,06
DS-1:3-TPGS0.5	6,2±0,06
DS-1:3-TPGS1	5,8±0,10

Inicialmente, foi possível observar que mesmo após ficar 5 dias em dessecador, o pó da quitosana de baixo peso molecular se apresentou com um alto teor de umidade (14,4±0,12%) o que pode ocorrer devido à natureza deste polímero. A quitosana tem característica altamente higroscópica devido a uma grande quantidade de grupamentos livres (grupos hidroxilas e aminas) capazes de fazer ligações de hidrogênio com a água atmosférica, o que faz com que apresente umidade relativamente alta (até 11%, por exemplo) mesmo sob condições adequadas de armazenamento (SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2015).

Quanto ao *trans-resveratrol*, este demonstrou uma umidade relativamente menor (5,9±0,12%) e mais condizente com os valores encontrados para as formulações. Sendo este um composto hidrofóbico, sua superfície tende a repelir a umidade atmosférica e com isso o pó acaba apresentando uma quantidade relativamente menor de umidade mesmo em condições de armazenagem que contenha uma maior umidade relativa do ar (ZHOU et al., 2016).

De acordo com a literatura, é comum que após a secagem de dispersões sólidas em *spray dryer* se tenha a presença residual dos solventes orgânicos utilizados no processo, sendo que este valor varia comumente entre 1 e 10%, podendo haver o odor dos solventes orgânicos bem como a necessidade de secagem adicional (SHEPARD et al., 2020). É necessário também observar que mesmo que as dispersões sólidas tenham a quitosana como principal componente, estas apresentaram cerca de metade do teor de umidade que a quitosana livre. Isso pode estar intimamente ligado às interações entre o *trans-resveratrol* e a quitosana, uma vez que esses quando em contato podem fazer ligações de hidrogênio entre si através dos seus grupamentos hidroxilas, o que resulta numa menor disponibilidade desse grupo a fazer interações com a umidade atmosférica (PENG et al., 2010).

5.1.4. ÂNGULO DE REPOUSO ESTÁTICO

O ângulo de repouso se correlaciona com a interação de um pó com o solvente. A Tabela 9 apresenta os valores obtidos em triplicata e as médias para o ângulo de repouso (α) obtido de cada amostra.

Tabela 9: Resultados de ângulo de repouso (α) das amostras analisadas, de acordo com Zhang *et al.* (2014).

Formulações	Ângulo (α)	Classificação
DS-1:9-C	30,46	Boa
DS-1:3-C	29,20	Excelente
DS-1:9-PX0.5	27,22	Excelente
DS-1:9-PX1	29,20	Excelente
DS-1:3-PX0.5	28,74	Excelente
DS-1:3-PX1	19,86	Excelente
DS-1:9-TPGS0.5	21,80	Excelente
DS-1:9-TPGS1	25,20	Excelente
DS-1:3-TPGS0.5	25,20	Excelente
DS-1:3-TPGS1	23,38	Excelente
Resveratrol	16,50	Excelente
Quitosana	48,18	Ruim

Se o ângulo de inclinação for largo o suficiente para superar as forças de fricção, significa que o pó tem coesão e adesão fracas e que com isso uma partícula pode deslizar sobre outra com maior facilidade, aumentando assim o fluxo e a molhabilidade do material, algo que pode então ser correlacionado com uma maior difusão do fármaco, ou seja, um material cujas partículas são muito coesas, pode ter sua molhabilidade e tempo de dissolução prejudicados (MAXIMIANO *et al.*, 2010).

Sendo assim, o ângulo de repouso está relacionado à fricção entre as partículas de pó, sendo também ligado à coesão interparticular, ocorrendo por forças de van der Waals não específicas, o que aumenta se o tamanho de partícula for menor, assim como se houver uma umidade relativa maior. Além disso, as partículas, em virtude da força eletrostática gerada devido ao atrito, apresentam dificuldade de fluxo uma vez que se aumentam as forças de coesão interparticulares e de adesão à outras superfícies, o que implica também em uma menor solubilidade do pó (LI *et al.*, 2004).

Partindo desse princípio, foi possível notar com os dados que a quitosana possui um $\alpha=48,8^\circ$ demonstrando que sua molhabilidade é considerada ruim de acordo com a literatura (VADIYAR *et al.*, 2016) não sendo adequada para uma solubilização espontânea. Exceto pela formulação DS-1:9-C (que possui a maior proporção de quitosana e não possui surfactante), as demais amostras obtiveram valores entre 19,86 e 29,20° demonstrando que todas têm boas ou excelentes condições de molhabilidade.

A presença de tensoativos pode aumentar a molhabilidade de compostos hidrofóbicos como o *trans*-resveratrol e, conseqüentemente, das dispersões sólidas (FENG *et al.*, 2018). Além disso, tensoativos não-iônicos tais como o Poloxamer (PERCIVAL *et al.*, 2018) e o TPGS (PHAM; CHO, 2017) tendem a aumentar a molhabilidade das dispersões sólidas através da solubilização micelar e formação de complexo fármaco-polímero (RAHMAN *et al.*, 2020), o que pode também influenciar nos resultados.

5.1.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O *trans-resveratrol* (Figura 2) demonstrou superfície lisa e formato irregular, ora tendendo ao formato esférico, ora tendendo ao retangular, sendo ambos apresentados em diversos tamanhos, o que pode ser relacionado ao fato do material poder ser encontrado parte amorfizado e parte em seu estado cristalino. Já o pó de quitosana (Figura 3) apresentou formato de escamas, indicando seu arranjo molecular amorfo.

Figura 2: Fotomicrografia do *trans-resveratrol* 35000x.

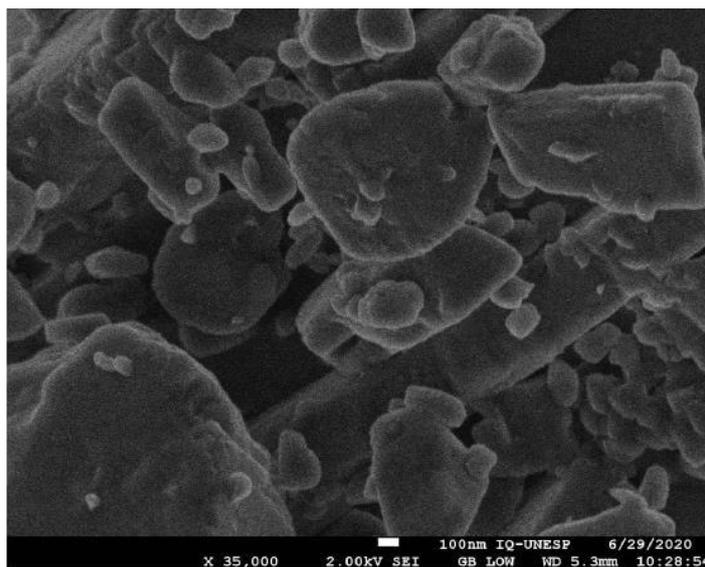
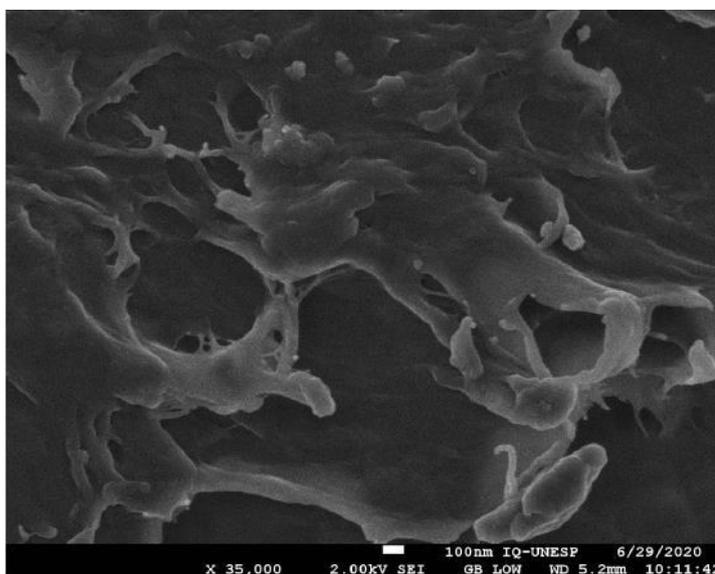
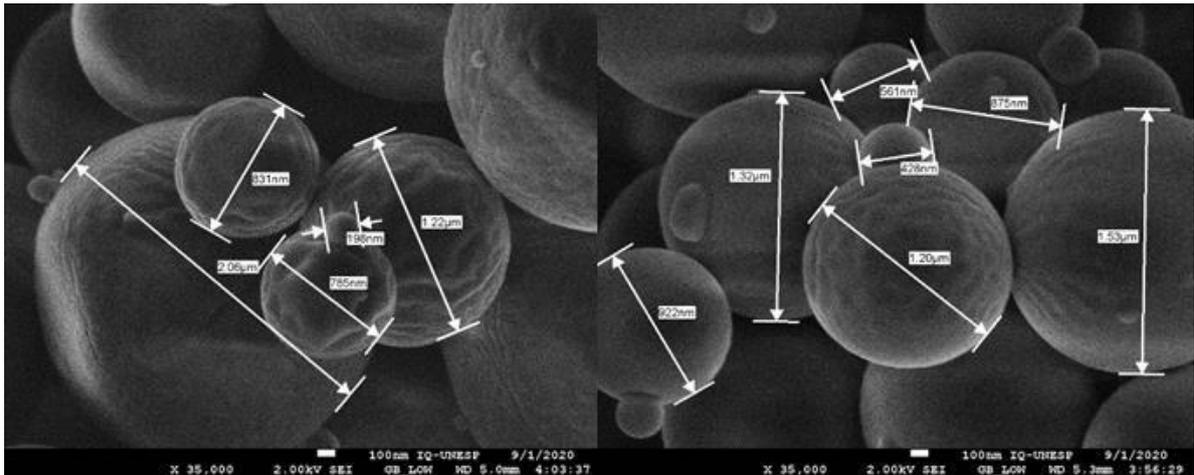


Figura 3: Fotomicrografia da quitosana 35000x.



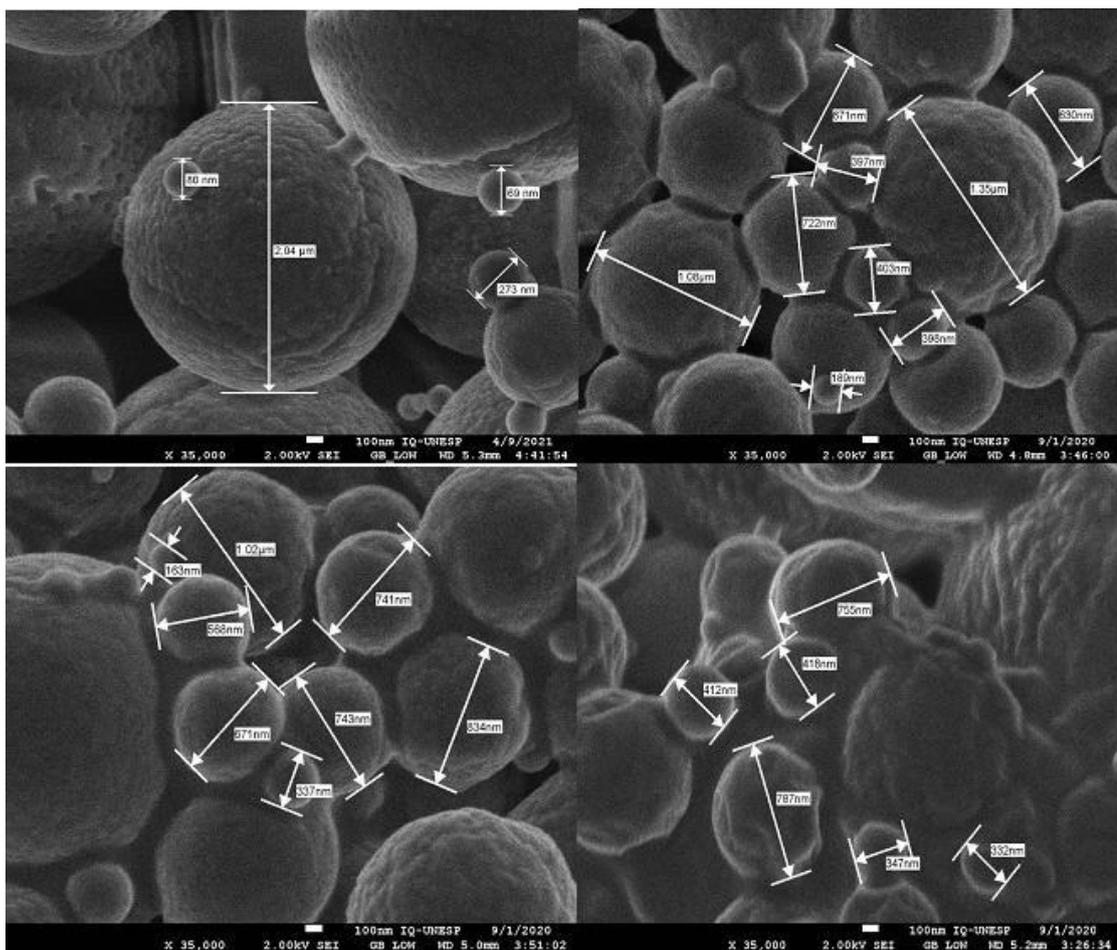
No que diz respeito às formulações, as amostras DS-1:9-C e DS-1:3-C (Figura 4) demonstraram formato esférico e formação de pequenos agregados (sem visualização de ligação entre as partículas).

Figura 4: Fotomicrografias das formulações DS-1:9-C e DS-1:3-C 35000x.



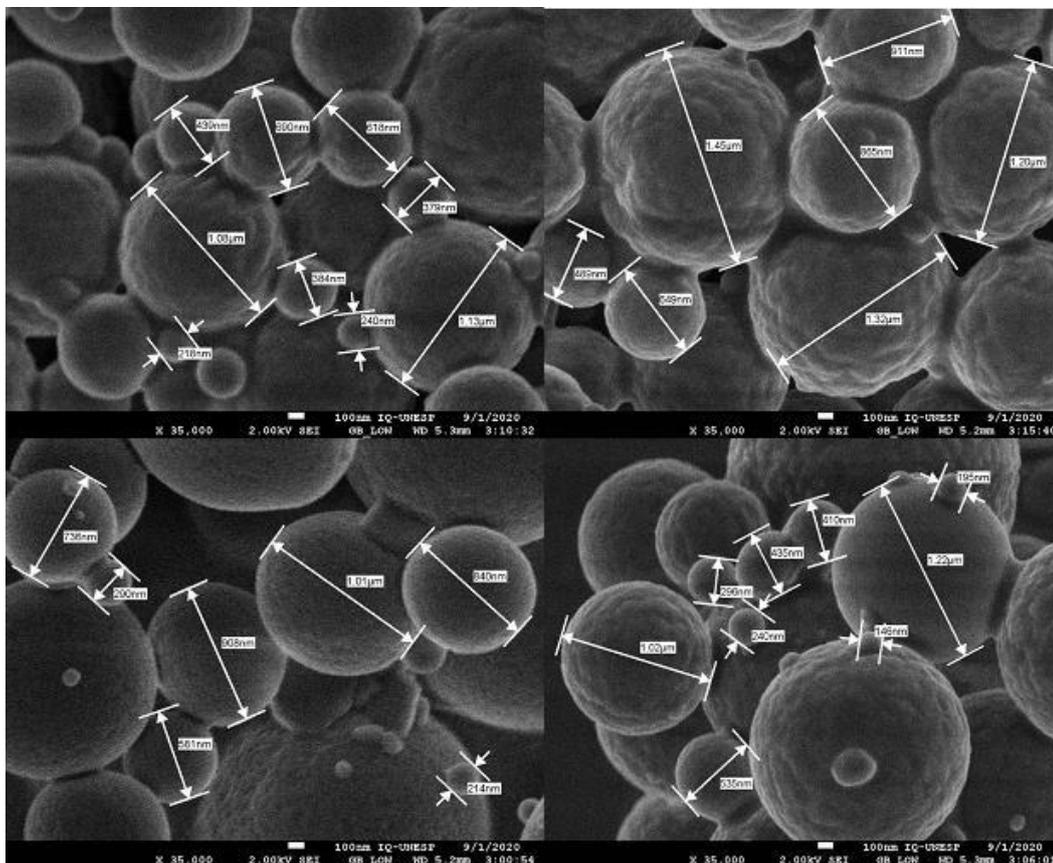
As formulações contendo Poloxamer® 407, por sua vez, demonstraram novamente estruturas esféricas, porém com a existência de ligação física entre as partículas, o que é indício de que estas formulações formam agregados incapazes de serem dissociados, como pode ser visto na Figura 5.

Figura 5: Fotomicrografias das formulações contendo Poloxamer® 407, 35000x.



As Formulações contendo TPGS também tenderam a formar grandes agregados compostos de pequenas partículas esféricas, como podem ser vistos na Figura 6.

Figura 6: Fotomicrografias das formulações contendo TPGS 35000x.



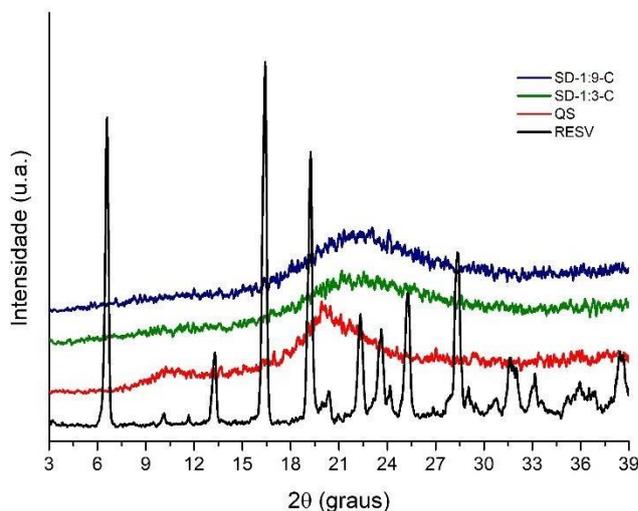
De fato, uma forma esférica mais bem definida (como as formulações DS-1:9-C e DS-1:3-C) pode melhorar as características do pó obtido, porém não apenas esse fato deve ser levado em conta. As formulações contendo Poloxamer® 407 ou TPGS, apesar de formarem agregados, podem ser também interessantes uma vez que formam um pó menos fino e com menor chance de ser levado junto do ar do *spray dryer* durante a secagem das dispersões sólidas. O fato das demais formulações terem morfologia parecida torna possível avaliar outros parâmetros mais relevantes, como a proporção fármaco:polímero das formulações, o que é interessante do ponto de vista terapêutico, uma vez que pode acarretar numa necessidade de uma concentração menor de dispersões sólidas para que seja alcançado o índice terapêutico (PATRA et al., 2018).

As partículas das formulações analisadas demonstraram ter tamanhos em sua maioria nanométricos indo até 2 µm, sendo que partículas com tamanho inferior a 10 µm indicam alta tendência de aglomeração de partículas e maior resistência ao fluxo, o que pode também explicar o motivo do rendimento da produção do *spray dryer* não ser tão alto. Além disso, partículas com formato mais grosseiro como no caso da quitosana podem implicar num rendimento menor, uma vez que elas têm maior capacidade de sofrerem intravamento mecânico e com isso terem seu fluxo comprometido (GELDART; ABDULLAH; VERLINDEN, 2009).

5.1.6. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

Os dados referentes ao DRX do fármaco, da quitosana e das formulações controle podem ser vistos na Figura 7.

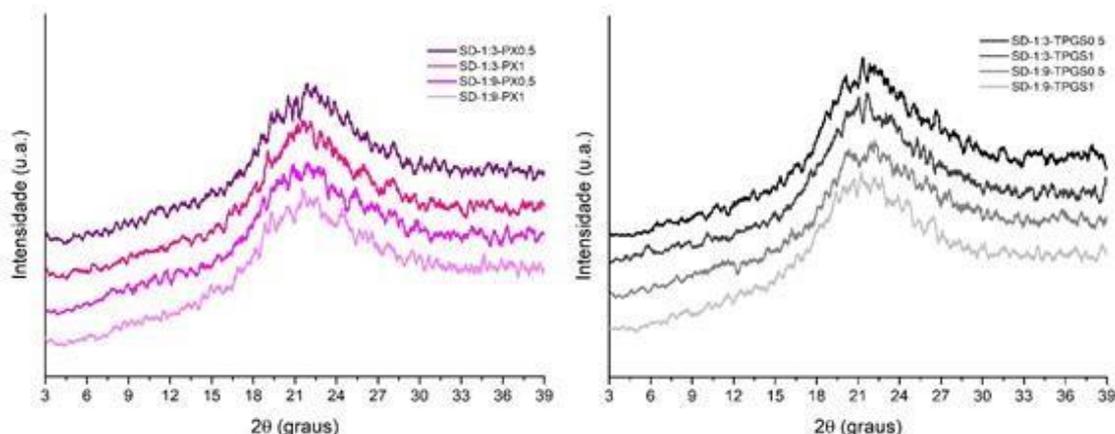
Figura 7: DRX das matérias-primas e das formulações DS-1:9-C e DS-1:3-C.



É possível ver que o *trans*-resveratrol possui uma estrutura altamente cristalina, apresentando picos bem-definidos e estreitos (HUANG et al., 2017), enquanto que a quitosana apresenta uma estrutura mais amorfa, tendo apenas duas bandas extensas e pouco definidas em 10° e entre os 18 e os 23° no difratograma indicando que na verdade sua estrutura é semicristalina (KUMAR et al., 2012). As dispersões sólidas DS-1:9-C e a DS-1:3-C, por sua vez não apresentam os picos do fármaco, porém demonstram traços da estrutura semicristalina da quitosana, o que demonstra a efetividade na amorfização do fármaco, podendo ser indício de que as formulações poderão aumentar a solubilidade deste.

Na Figura 8, é possível ver as demais formulações (contendo Poloxamer ou TPGS, respectivamente).

Figura 8: DRX das formulações contendo Poloxamer® 407 ou TPGS, respectivamente.

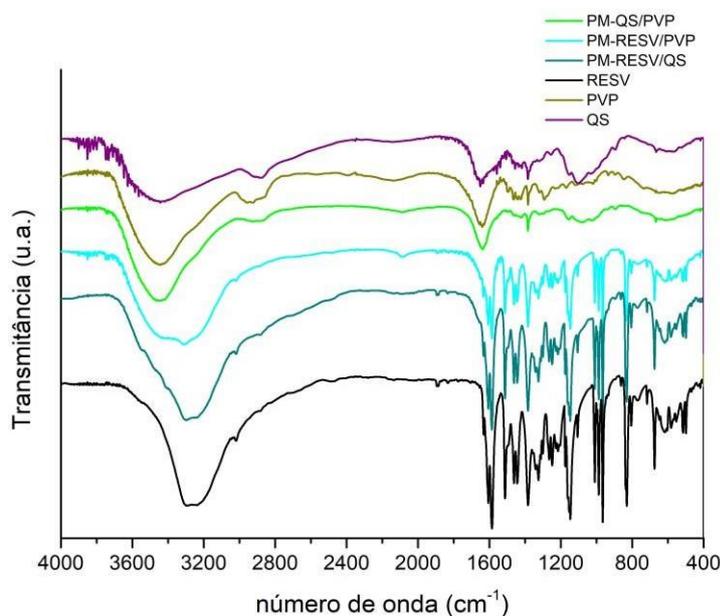


Nelas, também é possível notar a banda característica da presença da quitosana, sem haver os picos cristalinos característicos do fármaco, indicando que o *trans*-resveratrol foi amorfizado durante esse processo.

5.1.7. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As 10 amostras foram submetidas à análise de FTIR, sendo agrupadas em 3 grupos para melhor visualização. O primeiro grupo foi o das formulações SD-1:9-C e SD-1:3-C, além do *trans*-resveratrol e quitosana (Figura 9), o segundo foi o das 4 formulações contendo Poloxamer® 407 (Figura 10) e o terceiro grupo foi o das 4 formulações contendo TPGS (Figura 11).

Figura 9: FTIR das matérias-primas e misturas físicas 1:1 (PM).



De acordo com literatura, o *trans*-resveratrol possui bandas características entre 1500 e 1400 cm^{-1} devido à presença de alcenos (ligações C=C) que estão presentes ligados aos anéis aromáticos e também na dupla ligação em meio à ponte de metileno que liga esses dois anéis aromáticos. Outras bandas podem ser observadas entre 1300 e 1000 cm^{-1} , que correspondem a presença de ligações C-O (que indicam a presença dos fenóis) e, por fim, outra banda característica do composto está presente entre 800 e 550 cm^{-1} indicando ligações =CH que indicam a presença dos anéis aromáticos (SHEU et al., 2013). As bandas estão indicadas com a cor preta na Figura 20.

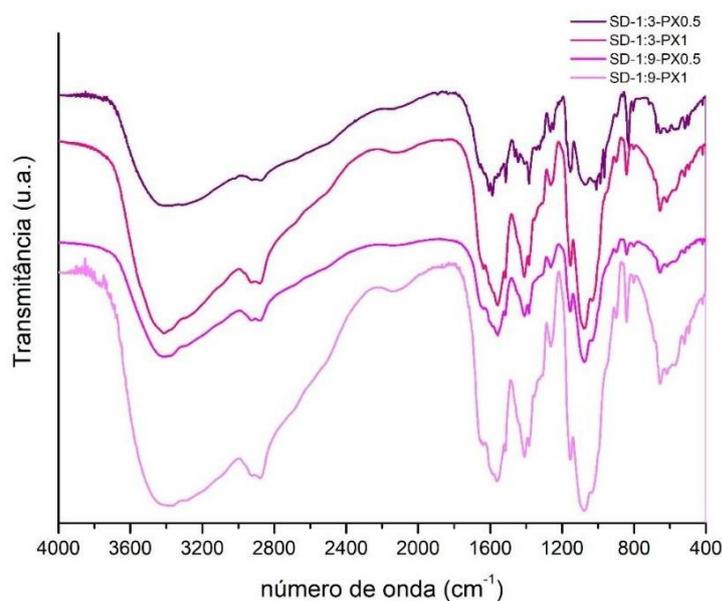
A quitosana (Figura 20, indicado em roxo), por sua vez, possui como principais características uma banda em 3433 cm^{-1} (estiramento -OH do grupamento hidroxila), 2919 e 2876 cm^{-1} (estiramento C-H), 1647 cm^{-1} (estiramento N-H correspondendo à amina primária existente em cada unidade de glicose), em 1378 cm^{-1} (estiramento indicando ponte de O responsável pela ligação de cada monômero de glicose ao seu adjacente) e em 1100 cm^{-1} (estiramento C-O, que pode significar a ligação entre o monômero de glicose e as hidroxilas) (SATHIYASEELAN et al., 2014).

É possível observar ainda na Figura 20 (formulações DS-1:9-C e DS-1:3-C) o aparecimento de bandas em 1409 cm^{-1} e em 1556 cm^{-1} que podem ser indício dos alcenos que representam a presença do *trans*-resveratrol nas formulações, o mesmo pode ser observado na banda em 1080 cm^{-1} , que pode se correlacionar com os fenóis presentes no *trans*-resveratrol, assim como a banda em 659 cm^{-1} que se relaciona com seus anéis aromáticos. As bandas de estiramento em 2931 cm^{-1} e em 2880 cm^{-1} , que são típicas das ligações C-H da quitosana também estão presentes, bem como o surgimento da banda em 3395 cm^{-1} que pode indicar o estiramento de suas hidroxilas (AL-JUMAILY; HAMID; ALI, 2014).

Essas bandas alargadas correspondem à sobreposição das bandas do *trans*-resveratrol e da quitosana, podendo indicar um possível alargamento da banda referente ao *trans*-resveratrol. Ainda assim, os espectros não sugerem a presença de reações químicas entre os componentes das formulações.

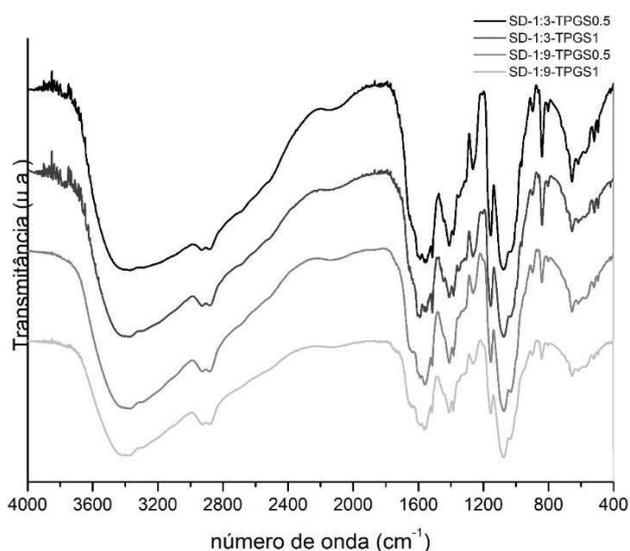
É possível também notar o desaparecimento da banda do *trans*-resveratrol em 3293 cm^{-1} nas formulações, bem como os deslocamentos das bandas de 1587 cm^{-1} para 1556 cm^{-1} e de 1383 cm^{-1} para 1409 cm^{-1} , o que é sugestivo de amorfização do fármaco. Isso ocorre quando há o deslocamento ou a diminuição da intensidade de suas bandas podendo indicar aumento do seu grau de amorfização, podendo chegar inclusive a situações onde suas bandas podem até desaparecer, como é caso das bandas em questão (CATENACCI et al., 2020).

Figura 10: FTIR das dispersões sólidas contendo Poloxamer®407.



O Poloxamer 407 é caracterizado principalmente por uma banda de absorção em 2893 cm^{-1} (estiramento alifático C-H), 1355 cm^{-1} (dobramento planar O-H), e em 1114 cm^{-1} (estiramento da ligação C-O) (GARALA et al., 2013). Na Figura 11 é possível verificar as bandas referentes à sobreposição do *trans*-resveratrol e da quitosana, em 659 , 1080 , 1409 , 1556 , 2880 , 2931 e 3395 cm^{-1} . Além disso, é possível observar a presença de um estiramento em 2894 cm^{-1} , característico da presença do estiramento alifático C-H do Poloxamer 407. Assim, os espectros das dispersões sólidas preparadas com Poloxamer não indicam a ocorrência de reações químicas entre os seus componentes.

Figura 11: FTIR das dispersões sólidas contendo TPGS.

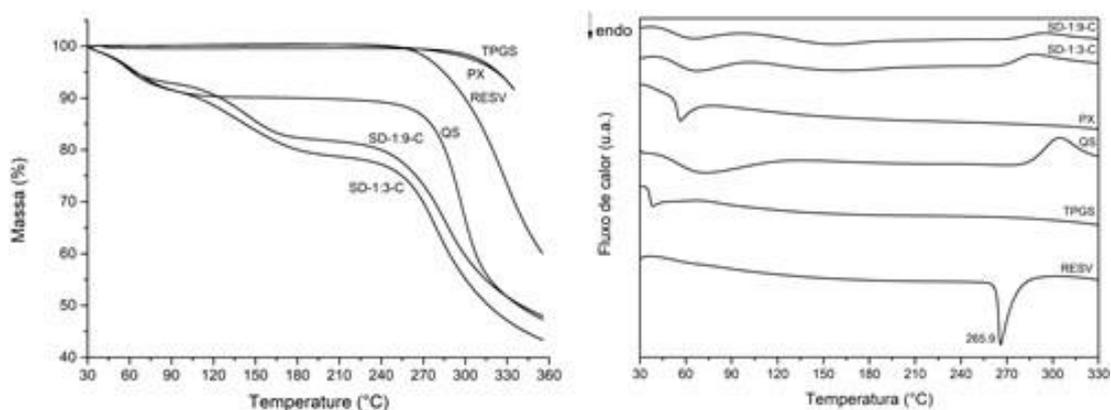


As bandas do TPGS aparecem em 1745 cm^{-1} (banda da ligação carbonila C=O), uma banda de absorção em 3452 cm^{-1} (devido ao grupamento hidroxila O-H terminal) (HA et al., 2021). Na Figura 22, as bandas referentes a sobreposição do características ao *trans*-resveratrol e da quitosana em $659, 1080, 1409, 1556, 2880, 2931$ e 3395 cm^{-1} estão presentes, assim como a banda em 1745 cm^{-1} do TPGS, como um ombro nas dispersões sólidas. Da mesma forma, os espectros das dispersões sólidas preparadas com TPGS não indicam a ocorrência de intrações químicas entre os seus componentes.

5.1.8. TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (TG-DSC)

De acordo com o termograma de gravimetria da Figura 12, foi possível avaliar a decomposição térmica das matérias-primas, bem das formulações SD-1:9-C e SD-1:3-C.

Figura 12: TGA e DSC das matérias-primas e formulações SD-1:9-C e SD-1:3-C.



A partir dos 270 °C *trans*-resveratrol teve perda de massa por volta dos 40%. Já no que diz respeito ao termograma de DSC, o *trans*-resveratrol se manteve estável durante a maior parte da análise e apresentou pico endotérmico e estreito em $265,9\text{ °C}$, algo que vai de encontro com literatura, uma vez que esse evento também foi evidenciado por Silva e colaboradores, (2017), que obtiveram o mesmo pico em $267,0\text{ °C}$. O aparecimento de pico estreito está relacionado não apenas a pureza, mas também à cristalinidade do composto.

A quitosana já inicia sua perda de massa a partir dos 30 °C até chegar aos 100 °C , quando desidrata totalmente. Após isso, é possível notar outra perda de massa a partir dos 250 °C , o que vai de encontro com a literatura, que demonstra que a partir dos 248 °C se inicia uma degradação térmica não-oxidativa correspondente à desacetilação desse material e formação de estruturas insaturadas nos grupos amina, o que vai até cerca de 600 °C (DEY et al., 2016). Quanto ao DSC, segundo também Dei e colaboradores, 2016, ocorre o aparecimento de um evento endotérmico entre os 65 e 80 °C que pode se correlacionar com a saída de umidade do material. Há também um pico exotérmico em cerca de 300 °C que pode se relacionar a sua degradação

térmica, onde ocorre a clivagem das ligações glicosídicas e as decomposições das unidades tanto acetiladas quanto desacetiladas.

O Poloxamer® 407 apresentou um pico endotérmico próximo aos 56 °C, o que indica seu ponto de fusão, o mesmo pode ser visto no TGA, uma vez que houve uma pequena perda de massa condizente (EI-BADRY et al., 2013).

O TPGS, por sua vez, apresentou um pico endotérmico em 39 °C, o que vai de encontro com Lee *et al.* (2015), que encontraram o mesmo pico em 39,7 °C, o qual descrevem como a cristalinidade desse composto.

Ao comparar as dispersões sólidas (presentes também na Figura 24, assim como nas Figuras 13 e 14), é possível observar que elas obtiveram um perfil semelhante ao da quitosana (uma vez que este é o principal composto nas formulações), havendo tanto o pico endotérmico quanto o exotérmico deste composto. Quanto ao TGA, ocorreu a perda de massa antes dos 100 °C indicando a perda de umidade (podendo nesse caso também se correlacionar com a volatilização de traços dos solventes que podem ter ficado após a produção destas), além disso, é possível notar uma perda de massa de cerca de 8% em relação a umidade, valor próximo aos resultados obtidos na análise utilizando a balança infravermelho.

Ainda no TGA, possível notar uma perda de massa por volta dos 160 °C e outra por volta dos 245 °C, podendo se correlacionar com o início da degradação da quitosana. Devido a grande perda de massa das dispersões sólidas antes de 265 °C (referente ao início da degradação do fármaco) é possível inferir que o *trans*-resveratrol está amorfizado nas formulações e por isso inicia sua degradação em uma temperatura menor se comparado com ele puro e em forma cristalina.

Figura 13: TGA e DSC das formulações contendo Poloxamer® 407.

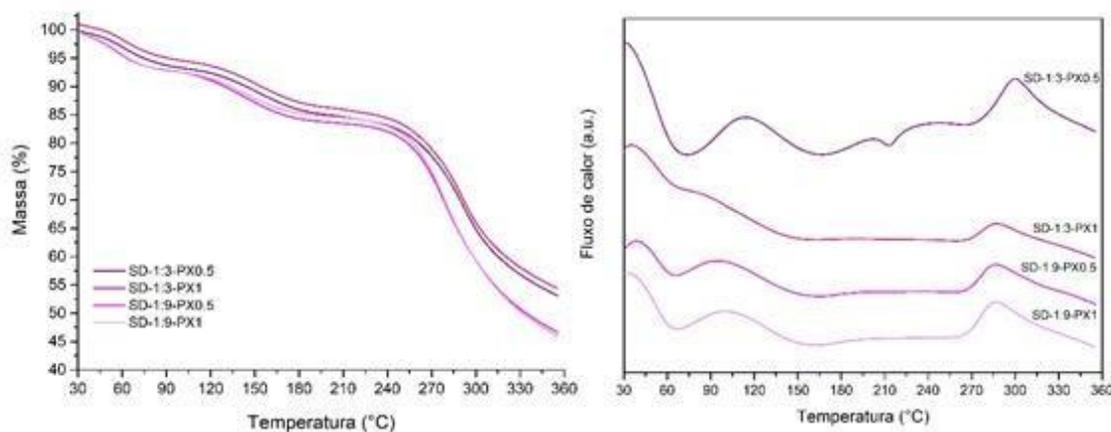
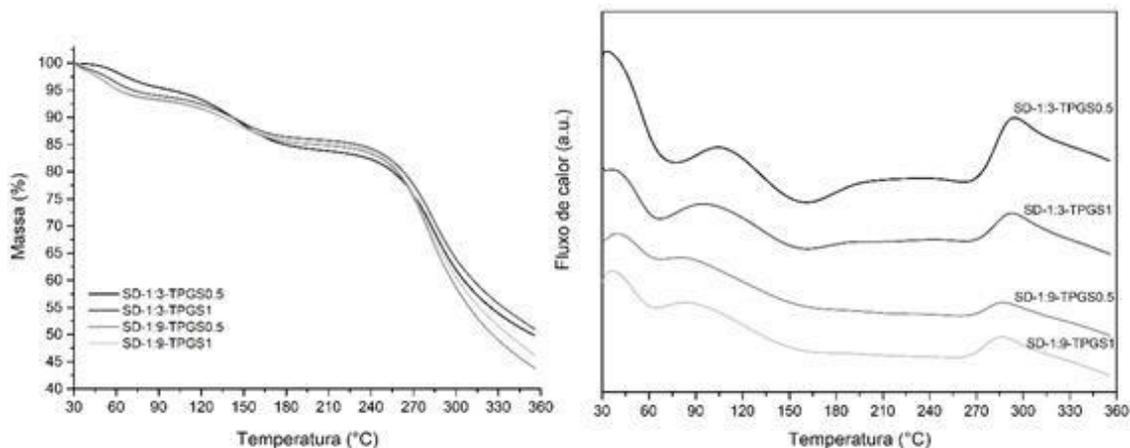


Figura 14: TGA e DSC das formulações contendo TPGS.



Nas Figuras 13 e 14, é possível visualizar que as dispersões demonstraram perfil muito parecido entre si. Em ambos os TGA houve perda de massa pouco expressiva até os 100 °C, referente à perda de umidade que foi entre 5 e 7% de modo semelhante à análise de teor de umidade, como também de possíveis traços dos solventes orgânicos utilizados (e, no caso das formulações contendo Poloxamer, provavelmente houve a fusão deste em cerca de 55 °C), bem como o início da degradação das formulações foi por volta dos 270 °C, podendo indicar a amorfização do fármaco, uma vez que este sozinho apresentou perda de massa em temperatura superior a esta, como dito anteriormente.

Além disso, é possível observar alguns eventos nos termogramas de DSC, tais como um evento endotérmico em cerca de 65 °C e um exotérmico iniciando por volta dos 250 °C, semelhantes aos apresentados pela quitosana. O pico endotérmico em 265 °C, referente ao *trans*-resveratrol desapareceu em todas as formulações, podendo indicar assim sua amorfização nelas.

5.1.9. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE *TRANS*-RESVERATROL

A determinação do teor de fármaco presente nas dispersões sólidas variou entre 92,91% e 108,41% (Tabela 10), significando proximidade dos valores obtidos com os valores teóricos das formulações, o que demonstra a eficiência da técnica de preparo.

Tabela 10: Determinação do teor de *trans*-resveratrol nas dispersões sólidas e suas percentagens de recuperação.

Formulações	Teor ($\mu\text{g/mL}$)	% recuperação
DS-1:9-C	9,29 \pm 2,01	92,91
DS-1:3-C	25,63 \pm 0,88	102,53
DS-1:9-PX0.5	10,84 \pm 0,48	108,41
DS-1:9-PX1	10,67 \pm 0,59	106,70
DS-1:3-PX0.5	23,83 \pm 0,15	95,32
DS-1:3-PX1	25,20 \pm 1,02	100,81
DS-1:9-TPGS0.5	10,41 \pm 1,04	104,11
DS-1:9-TPGS1	10,45 \pm 1,03	104,54
DS-1:3-TPGS0.5	26,78 \pm 1,54	107,11
DS-1:3-TPGS1	24,76 \pm 0,87	99,03

Segundo o Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira (ANVISA, 2012), a análise de teor de princípio ativo não deve ultrapassar a faixa entre 90 a 110% do valor declarado na formulação, sendo assim todas as formulações se encontram dentro do preconizado, demonstrando que o processo produtivo não causou a degradação ou perda do conteúdo de fármaco nas formulações desenvolvidas.

5.1.10. TESTE DE SOLUBILIDADE

De acordo com a Tabela 11, as concentrações obtidas através do ensaio de solubilidade variaram de 8,74 $\mu\text{g/mL}$ (*trans*-resveratrol livre) até 22,58 $\mu\text{g/mL}$ (DS-1:9-TPGS1), não havendo a observação de precipitado refringente (semelhante ao *trans*-resveratrol livre em suspensão).

Tabela 11: Médias e desvios padrão das concentrações de *trans*-resveratrol no ensaio de solubilidade.

Formulações	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)
Resveratrol livre	8,74 \pm 0,11
DS-1:9-C	13,48 \pm 0,19
DS-1:3-C	13,22 \pm 0,92
DS-1:9-PX0.5	14,46 \pm 0,02
DS-1:9-PX1	15,19 \pm 1,27
DS-1:3-PX0.5	16,87 \pm 0,22
DS-1:3-PX1	16,47 \pm 0,08
DS-1:9-TPGS0.5	16,29 \pm 0,10
DS-1:9-TPGS1	22,58 \pm 0,46
DS-1:3-TPGS0.5	14,39 \pm 1,14
DS-1:3-TPGS1	15,79 \pm 0,12

As amostras correspondentes às formulações não apresentaram diferenças estatísticas entre si, porém algumas formulações tiveram solubilidade média de pelo menos o dobro se comparado com o *trans*-resveratrol livre, demonstrando que as formulações de fato foram capazes de aumentar a solubilidade do fármaco. Dentre elas, se destacou a formulação DS-1:9-TPGS1, a qual além de ter uma solubilidade maior que as demais formulações contendo tensoativo, ainda conseguiu quase triplicar a solubilidade do fármaco.

Estudos como o de Ha e colaboradores (2021), demonstraram que dispersões sólidas de *trans*-resveratrol em Eudragit® E (polímero ácido metacrílico) atenuado com HCl também na proporção de 1:9 foi capaz de aumentar a solubilidade em pH 6,8 com alto grau de supersaturação deste fármaco, o que vai ao encontro com o observado neste estudo.

5.2. ESCOLHA DAS FORMULAÇÕES A SEREM INCORPORADAS NAS MEMBRANAS DE PVP

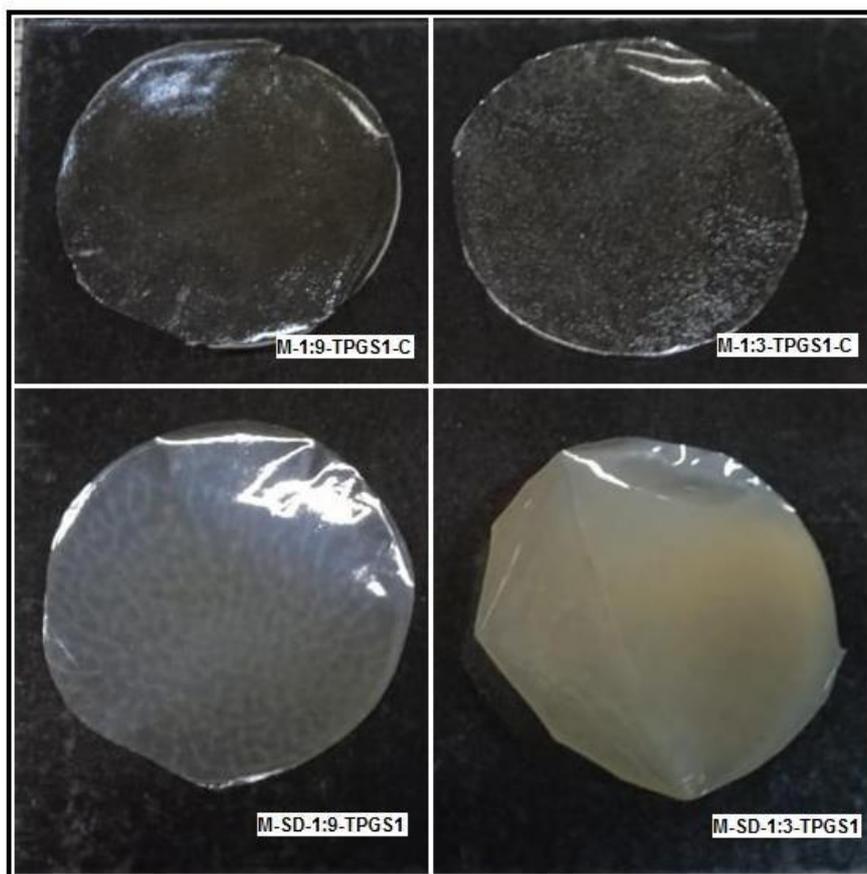
Inicialmente, a maioria das análises foi feita comparando os grupos de formulações com Poloxamer® 407 e com TPGS entre si. Em muitas das análises, as formulações não mostraram diferenças satisfatórias que justificassem qual o melhor grupo a ser escolhido, sendo então a principal análise para o embasamento dessa escolha o ensaio de solubilidade, no qual, além de ficar comprovado que as dispersões sólidas aumentam a solubilidade do fármaco em água, também foi possível ver uma maior tendência ao grupo contendo TPGS de promover maior solubilização do fármaco..

Sendo assim, a escolha se baseou principalmente no ensaio de solubilidade. A formulação DS-1:9-TPGS1 promoveu maior solubilidade do *trans*-resveratrol sendo a melhor candidata para haver uma boa incorporação de fármaco nas membranas poliméricas. Para motivos de comparação, foi escolhida também a formulação DS-1:3-TPGS1, pois também apresentou alta solubilidade e porque essa formulação poderia gerar respostas interessantes, ao possuir composição muito semelhante à DS-1:9-TPGS1, uma vez que a diferença entre as duas é somente da proporção fármaco:polímero. Também é interessante mencionar que o TPGS atua como promotor de permeação cutânea (TAVARES LUIZ et al., 2021), conforme discutido anteriormente na revisão bibliográfica.

5.3.1. ASPECTO DAS MEMBRANAS DE PVP

As membranas tiveram aspectos diferentes dependendo da sua composição. A Figura 15 demonstra como elas ficaram visualmente.

Figura 15: Aspecto visual das membranas obtidas.



De um modo geral, as membranas se apresentaram relativamente transparentes e bem maleáveis. Entretanto, diferenças puderam ser observadas entre elas, tais como a formulação M-1:3-TPGS1-C que se mostrou ligeiramente opaca. As membranas sem dispersões sólidas (M-1:9-TPGS1-C e M-1:3-TPGS1-C) não obtiveram coloração e apresentaram superfície áspera, enquanto que as com dispersões sólidas (M-SD-1:9TPGS1 e M-SD-1:3TPGS1) apresentaram coloração amarelada e superfícies lisas e brilhantes. Foi também notado um odor residual de ácido acético.

A uniformidade é uma característica importante para as membranas, pois irá garantir que a cobertura da área afeada será igual independentemente da porção da membrana administrada, assim como a liberação do fármaco irá ocorrer de forma homogênea, proporcionando maior segurança e eficácia no tratamento, desde que o fármaco também esteja uniformemente disperso (ARORA; MUKHERJEE, 2002).

As membranas também se mostraram maleáveis (principalmente as contendo dispersões sólidas). A flexibilidade ocorre com a adição de plastificantes (como a glicerina) que fazem com que as cadeias poliméricas ou partes delas aumentem o seu afrouxamento devido a mudanças em suas forças intermoleculares (as interações secundárias entre as cadeias poliméricas passam a ser entre polímero e plastificante) o que geralmente causa aumento da flexibilidade, da resistência mecânica e do alongamento antes da ruptura, diminuindo assim o módulo de Young. Além disso, uma flexibilidade maior causa a diminuição da temperatura de transição do polímero

e o torna mais resistente a rachaduras e rompimento, o que afetaria a cobertura da área afetada e a eficácia terapêutica (GÜNGÖR; ERDAL, 2011).

5.3.2. ESPESSURA

Quanto à espessura, as membranas sem fármaco tiveram espessuras maiores que as contendo o *trans*-resveratrol, como pode ser visto na Tabela 12.

Tabela 12: Espessuras médias das membranas obtidas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras (Test-t, $p > 0,05$).

Formulações	Médias (μm)
M-1:9-TPGS1-C	157 \pm 5,39 ^a
M-1:3-TPGS1-C	163 \pm 8,35 ^a
M-SD-1:9-TPGS1	123 \pm 5,18 ^b
M-SD-1:3-TPGS1	122 \pm 4,74 ^b

Foi possível observar diferença estatística entre os valores das formulações contendo dispersões sólidas e as formulações sem este material. As membranas controle (M-1:9-TPGS1-C e M-1:3-TPGS1-C) tiveram valores muito maiores de espessura do que as duas contendo dispersões sólidas e, conseqüentemente, os fármacos (M-SD-1:9-TPGS1 e M-SD-1:3-TPGS1).

As medições foram feitas em 3 membranas de cada formulação, sendo que cada membrana teve 6 pontos medidos, com valores muito próximos, indicando boa uniformidade de espessura. Quando uma membrana possui espessura uniforme ao longo de sua extensão, as variações em suas características são minimizadas, diminuindo a observação de diferentes resultados frente às suas propriedades mecânicas e de barreira, bem como a concentração de fármaco poderá variar menos ao longo de sua extensão. De modo geral, membranas com variação em suas espessuras tendem a ter resultados superestimados em porções mais grossas e subestimados nas partes mais finas, além de poderem prejudicar o andamento do tratamento por não cobrirem adequadamente a área da pele afetada, podendo levar a uma dose de fármaco desuniforme (HAO et al., 2020), algo que provavelmente não deve ocorrer nas formulações desenvolvidas, visto sua boa uniformidade.

Algo interessante observado por Cherukuri e colaboradores (2017) foi que a espessura de membranas poliméricas pode estar intimamente relacionada com a solubilidade dos componentes poliméricos no sistema de dispersão, algo que é mais lento quanto maior for a espessura. Sendo assim, ao serem comparadas as membranas obtidas, pode-se observar que provavelmente a quitosana presente nas dispersões sólidas (formulações M-SD-1:9-TPGS1 e M-SD-1:3-TPGS1) dispersou melhor devido a talvez já estar em sua forma protonada, sendo capazes de fazer mais interações com o PVP, compactando as cadeias poliméricas e tornando as membranas mais finas. Esse fenômeno pode-se relacionar também com a superfície áspera das membranas com a quitosana livre (sem dispersão sólida, controle), pois

provavelmente essa quitosana não dispersou tão bem dando à elas esse aspecto e diminuindo a interação com o PVP, o que causou uma menor compactação das cadeias poliméricas e com isso maior espessura. Isso também vai de encontro com os achados na análise de DRX e análises térmicas das dispersões sólidas, as quais mostram que as dispersões sólidas são mais amorfas que a quitosana na forma bruta. Além disso, ao observar que as membranas contendo fármaco possuem espessuras bem semelhantes, é esperado que a espessura não seja um fator que gere diferença na taxa de liberação do fármaco.

5.3.3. PERFIL DE INTUMESCIMENTO

Em meio aquoso ou em alta umidade, as cadeias de polímeros hidrofílicos tendem a formar ligações de hidrogênio com as moléculas de água, que leva o arranjo estrutural do material intumescer, aumentando seu tamanho e peso se comparado com a membrana em condições normais (MURALTER; PERROTTA; COCLITE, 2018).

A capacidade de intumescimento permite prever a taxa de difusão e liberação do fármaco através das cadeias poliméricas, algo que depende da natureza e concentração do polímero. Sendo assim, o intumescimento depende de fatores físicos e químicos, tais como a capacidade de penetração de líquido na matriz polimérica e, dependendo do caso, a capacidade de erosão da formulação (CARBINATTO et al., 2012).

Dentre os fatores que levam ao intumescimento de uma membrana polimérica, há o fato de que a espessura impacta na área de superfície do fragmento de membrana. Membranas mais finas possuem maior área de contato e então têm uma proporção maior de polímero em contato com o líquido, hidratando e intumescendo mais rápido do que formulações mais espessas (MUKHERJEE et al., 2013).

O intumescimento depende da quantidade de polímeros e natureza das interações intermoleculares que estes são capazes de fazer com os demais componentes. Além disso, devido ao uso de ácido acético na produção tanto de dispersões sólidas quanto das membranas, a quitosana presente pode ficar ionizada causando repulsões eletrostáticas entre as suas cadeias poliméricas e assim aumentar a hidofilicidade da formulação, além do espaço entre essas cadeias, o que faz com que a membrana tenha uma tendência a uma maior porcentagem de intumescimento (MARINIELLO et al., 2010).

O perfil de intumescimento deve ser avaliado até que não haja a observação de aumento de intumescimento e estabilização deste, o que indica que houve o equilíbrio entre a formulação e o meio, não ocorrendo aumento expressivo do intumescimento (KOZIARA et al., 2016), o que foi observado em 120 minutos.

Os valores de intumescimento obtidos após 120 min de análise se encontram na Tabela 13.

Tabela 13: Médias de intumescimento após 120 minutos. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras (Test-t, $p > 0,05$).

Formulações	Média de intumescimento (%)
M-1:9-TPGS1-C	1579,59±31,16 ^a
M-1:3-TPGS1-C	760,78±52,64 ^b
M-SD-1:9-TPGS1	983,94±49,90 ^c
M-SD-1:3-TPGS1	606,69±27,10 ^{b,c}

Tanto o PVP quanto a quitosana têm capacidade de intumescer em meio aquoso por serem altamente hidrofílicos. No caso do PVP, este reduz a cristalinidade da blenda e tem mais afinidade pela água (devido às suas metilas) do que a quitosana (por causa das suas hidroxilas), porém quando em associação eles aumentam ainda mais essa capacidade de afinidade e intumescimento na água (POONGUZHALI; BASHA; KUMARI, 2017).

Ao avaliar as diferenças estatísticas, foi possível notar intumescimento maior para a membrana M-1:9-TPGS1-C, isso provavelmente se correlaciona com a grande quantidade de quitosana e o fato desta não fazer interações com o *trans*-resveratrol por este estar ausente (deixando as hidroxilas do polímero livres) e pelo fato de que provavelmente algum residual desse polímero não dispersou adequadamente, como já discutido, também reduzindo a interação com o PVP e o deixando livre para interagir com a água.

As membranas contendo dispersões sólidas intumesceram menos, porém seguiram a mesma tendência. Apesar de não haver diferença estatística entre elas, a formulação com mais quitosana em sua composição (1:9) teve um intumescimento maior que a outra formulação (1:3); entretanto, ambas tiveram valores menores de intumescimento que as suas formulações controle correspondentes, o que mostra novamente que o *trans*-resveratrol provavelmente diminui a quantidade de OH livre na quitosana que pode reagir com o PBS. Sabendo que o intumescimento é um mecanismo de controle da liberação de fármacos, esse resultado pode indicar uma ligeira vantagem na liberação do fármaco para a formulação M-SD-1:3-TPGS1, algo que será melhor discutido no ensaio de liberação *in vitro*.

5.3.4. TAXA DE TRANSMISSÃO DE VAPOR D'ÁGUA (TTVA) E PERMEABILIDADE AO VAPOR D'ÁGUA (PVA)

A Tabela 14 traz a perda de massa de água (g) em função do tempo para as quatro membranas desenvolvidas.

Tabela 14: TTVA e PVA calculadas após 120 horas.

Formulações	TTVA (g/h.m ²)	PVA (g/Pa.s.m)
M-1:9-TPGS1-C	1,56 x 10 ⁻⁶	1,73 x 10 ⁻⁵
M-1:3-TPGS1-C	1,56 x 10 ⁻⁶	1,75 x 10 ⁻⁵
M-SD-1:9-TPGS1	1,33 x 10 ⁻⁶	1,14 x 10 ⁻⁵
M-SD-1:3-TPGS1	1,37 x 10 ⁻⁶	1,17 x 10 ⁻⁵

Muitos polímeros, principalmente aqueles que possuem polaridade tais como o PVP e a quitosana, demonstram uma alta permeabilidade ao vapor de água, devido à característica de aumentar o coeficiente de permeabilidade e o

intumescimento quando sob alta umidade relativa devido aos fenômenos de isoterma de adsorção e de intumescimento (TURAN, 2021).

De acordo com Ivanova e colaboradores (2016), o intumescimento polimérico respeita a Lei de Fick, a qual postula que o fluxo de determinado solvente passa de regiões de maior concentração para regiões de menor concentração devido à diferença de gradiente de pressão osmótica. Sendo assim, o meio saturado com vapor de água no frasco acaba passando para o meio menos concentrado, que no caso são as cadeias poliméricas das membranas de PVP.

A permeabilidade é um parâmetro importante para se entender os mecanismos de transferência entre massa e soluto bem como as interações entre os polímeros e deles com o fármaco. Alguns fatores que impactam na permeabilidade são a natureza hidrofílica ou hidrofóbica do material (uma vez que isso vai definir a resistência à passagem do vapor d'água), presença de poros e fissuras (que impactarão na retenção de água dentro da estrutura polimérica), bem como a tortuosidade do filme (que irá impactar na uniformidade da passagem do vapor) (ANATOLY et al., 2020).

Para um polímero, a transmissão de vapor d'água ocorre através do seguinte mecanismo: primeiramente, as moléculas do vapor d'água adsorvem sobre a superfície da membrana, com isso essa água será absorvida passando para o interior das cadeias poliméricas e irá difundir por essas cadeias de acordo com o gradiente de concentração. Em determinado momento, com a concentração alta no interior da membrana, essas moléculas de água serão liberadas para atmosfera evaporando da membrana. Esse mecanismo pode não ocorrer no caso de membranas com a presença de grandes poros (SPENCE et al., 2011).

Ao absorver a água, as membranas modificam sua conformação polimérica e se tornam cada vez mais flexíveis e permeáveis. Plastificantes hidrofílicos, tais como o PEG 400 e a glicerina, podem aumentar a permeabilidade de gases e do vapor d'água uma vez que têm afinidade à solventes polares e alteram o equilíbrio de solubilidade interfacial, o que facilita a difusão das moléculas de água pelas cadeias poliméricas (SANTANA; KIECKBUSCH, 2013) aumentando assim a PVA das membranas desenvolvidas.

Algo interessante de se notar, é que de acordo com Jiang *et al.* (2020), quanto maior a massa molecular do PVP usado para formar as membranas, menor é o tamanho dos poros, até sendo possível não visualizá-los (como será discutido na análise de MEV mais a frente), algo que pode prejudicar a transmissão do vapor de água pela membrana. Além disso, conforme Mondal e colaboradores (2013), a presença de PVP diminui a cristalinidade de outros polímeros, o que permite uma maior interação com as moléculas d'água, aumentando assim a permeação ao vapor. Porém, esses autores também discutem que a presença de materiais hidrofóbicos pode servir como obstáculo para que as moléculas de água se difundam e passem pelas membranas, o que explicaria a taxa de permeação ser ligeiramente menor nas formulações contendo o *trans-resveratrol*.

Ainda de acordo com a Tabela 14, foi possível perceber que há uma tendência das membranas contendo o fármaco perderem menos água. Isso pode ser relacionado ao fato de que polímeros hidrofílicos como o PVP e a quitosana têm maior afinidade pela água e podem absorver o vapor d'água de

forma mais rápida e conseqüentemente esse conteúdo pode secar e evaporar as membranas (GRUBE; SIEGMANN; HIRAYAMA, 2015; SANGEETHA; NARAYANAN; DHAMODHARAN, 2021), gerando uma perda mais rápida da massa do sistema do que aqueles que possuem as dispersões sólidas, o que pode ser explicado também pelo fato de que há o *trans*-resveratrol nas formulações M-SD-1:9-TPGS1 e M-SD-1:3-TPGS1 o que pode diminuir a interação do PVP e da quitosana presentes nessas formulações com a água, uma vez que o fármaco se trata de um material hidrofóbico, sendo capaz de diminuir a interação com as moléculas de água adsorvidas na superfície das membranas, como qualquer composto hidrofóbico quando adicionado nesse tipo de sistema (PAMELA et al., 2018), além de que seus grupamentos hidroxila podem estar preferencialmente fazendo interações com as moléculas do fármaco, não estando disponíveis para interagir com o vapor d'água, como discutido anteriormente.

É possível também notar que as membranas contendo fármaco, além de terem menor TTVA e PVA, também apresentaram menores valores para o intumescimento, isso pode se correlacionar com o fato de que quanto maior o intumescimento, maior é a permeação ao vapor d'água, sendo que este vai evaporando mais rápido conforme permeia mais rápido, gerando assim um aumento também no valor do TTVA (OTHMAN et al., 2017; TURAN, 2021)

Por fim, é possível também observar que há correlação entre espessura e permeação ao vapor d'água, pois as membranas contendo dispersão sólida obtiveram tanto espessuras menores quanto também TTVA e PVA menores. Segundo Miranda e colaboradores, 2004, filmes com maior espessura abrigam uma maior quantidade de vapor d'água em seu interior, necessitando assim de uma concentração maior até atingir o seu equilíbrio de umidade, o que resulta numa permeação maior. Além disso, uma espessura maior indica menor empacotamento das cadeias poliméricas, deixando maiores espaços que serão menos efetivos na propriedade de retenção de água no interior dessas membranas mais espessas (membranas controle), resultando assim em um TTVA maior, sendo possível também correlacionar que quanto maior a quantidade de moléculas de água que podem ser abrigadas no interior da membrana, menor então será sua propriedade de barreira (OTHMAN et al., 2017).

5.3.5. PROPRIEDADES MECÂNICAS

Os dados obtidos das análises mecânicas podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados das propriedades mecânicas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras para cada parâmetro (Test-t, $p > 0,05$).

Formulações	Rp (MPa)	Ep (kJ/mm ³)	Ap (%)
M-1:9-TPGS1-C	30,36±2,05 ^a	32,2 x10 ⁵ ±7,9 x10 ^{5a}	13,41±2,45 ^a
M-1:3-TPGS1-C	22,99±5,37 ^{a,c}	16,8x10 ⁵ ±6,5 x10 ^{5b}	12,70±3,78 ^a
M-SD-1:9-TPGS1	32,20±3,88 ^b	42,4x10 ⁵ ±11,1x10 ^{5a,c}	15,43±6,93 ^a
M-SD-1:3-TPGS1	39,25±2,67 ^{a,b}	52,8x10 ⁵ ±3,0 x10 ^{5a,b,c}	14,72±3,18 ^a

*Rp = resistência à perfuração; Ep = Energia na perfuração; Ap = alongamento durante a perfuração.

Ao avaliar os resultados das membranas, é possível notar que, apesar de não haver diferença estatística para todos os parâmetros avaliados, as membranas contendo as dispersões sólidas apresentaram valores maiores em todos os parâmetros avaliados. Dessa forma, a adição das dispersões sólidas pode ter atuado como um material de reforço às membranas de PVP tornando-as mais resistentes, o que é algo interessante ao se comparar com os resultados de espessura, pois isso indica que além de mais resistentes essas formulações também se mostraram menos espessas, assim como tiveram um aspecto mais maleável.

De acordo com Galdeano e equipe (2013), a força de punção se correlaciona também com a espessura da membrana, em geral sendo necessária uma força maior para romper membranas mais grossas (sendo muitas vezes uma correlação linear). Ainda assim, outros fatores podem mudar essa tendência, tais como a concentração de plastificantes, que pode tornar a membrana mais resistente à força exercida bem como a própria natureza dos polímeros de cada formulação.

Materiais com comportamento viscoelástico, tais como os polímeros, possuem uma mistura entre características reológicas de material viscoso com o de material elástico, o que faz com que este material possa sofrer deformações, demonstrando resposta às tensões aplicadas sobre eles. Devido a terem em parte um comportamento elástico, essas membranas possuem alguma capacidade de retornar ao seu formato inicial após cessar o estresse deformador sobre elas. Além disso, materiais elásticos dissipam a energia gerada sobre eles através da liberação de energia em forma de calor ou som, enquanto que a parte com comportamento viscoso aumenta a energia necessária antes que haja essa dissipação (GARGALLO; RADIC, 2009).

O estudo do comportamento viscoelástico das membranas é de importante relevância para o entendimento da microestrutura polimérica (principalmente a cristalinidade do polímero, que pode enrijecer a membrana), assim como a interação entre polímeros, interações polímeros-fármaco, e plastificantes. As membranas devem ter resistência mecânica para que não sofram rupturas ou fissuras que causem a má cobertura da pele afetada, uma vez que o sucesso da terapia está no maior tempo de contato da formulação com a pele, bem como a homogeneidade e flexibilidade dessa cobertura (ZAHEDI; MANSOURPANAH, 2018).

5.3.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras se mostraram com superfície lisa e praticamente sem poros na secção transversal (Figuras 16, 17, 18 e 19, respectivamente).

Figura 16: Fotomicrografias de superfície e transversal da membrana M-1:9-TPGS1-C.

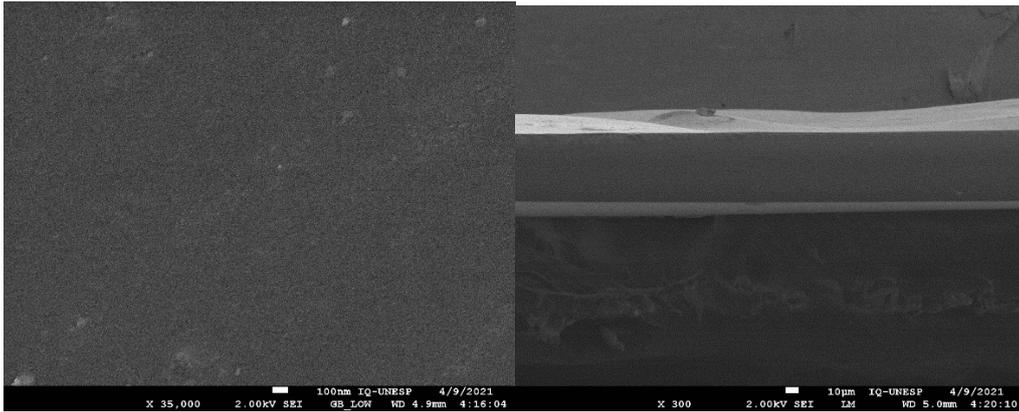


Figura 17: Fotomicrografias de superfície e transversal da membrana M-1:3-TPGS1-C.

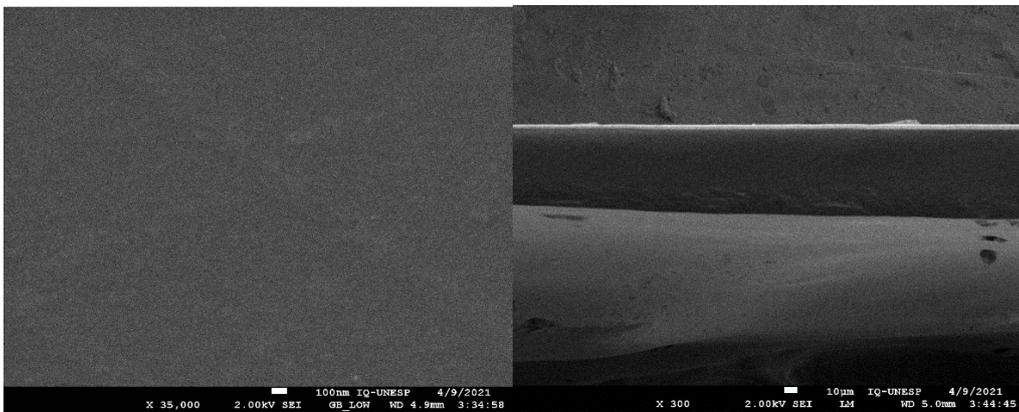


Figura 18: Fotomicrografias de superfície e transversal da membrana SD-1:9-TPGS1.

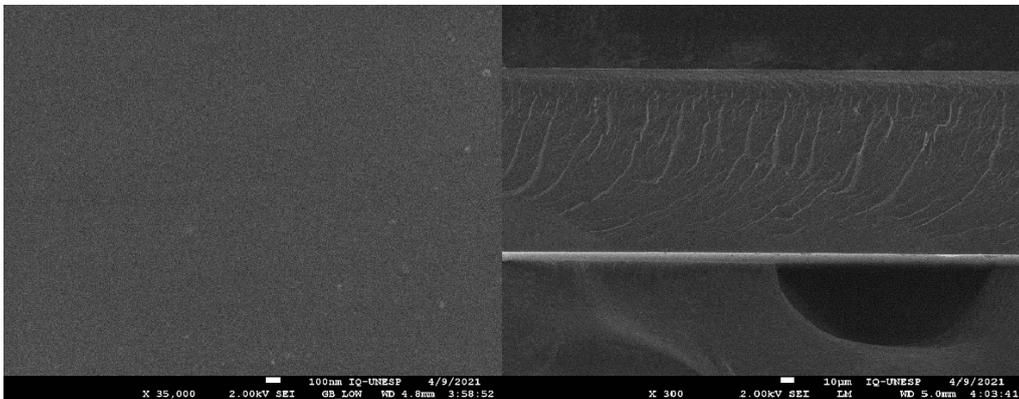
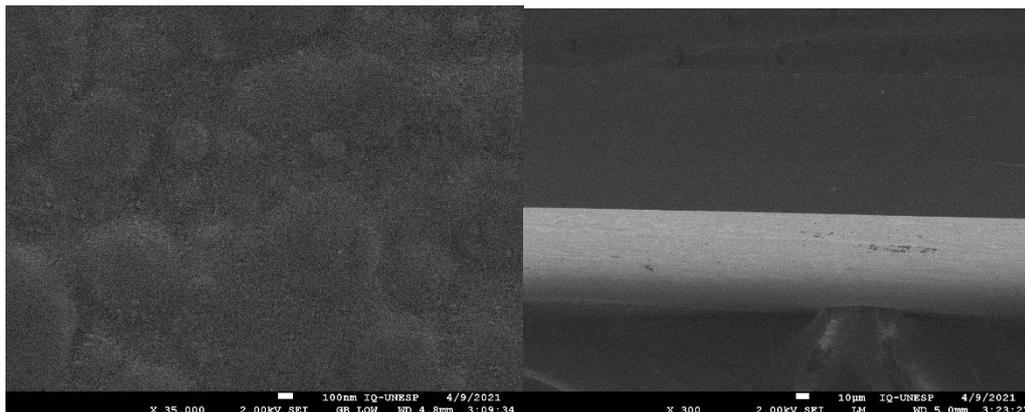


Figura 19: Fotomicrografias de superfície e transversal da membrana SD-1:3-TPGS1.



Ao visualizar as imagens, não foram notados poros nas membranas (algo que provavelmente impactou na permeação de vapor d'água, como visto anteriormente), o que, segundo descrito por Shiohara, Simon e Voelcker (2021), pode indicar que as formulações podem ter uma taxa de intumescimento mais lento, assim como as taxas de difusão e liberação do fármaco também serão mais prolongadas, visto que os poros podem facilitar a captação do vapor d'água assim como facilitar a difusão do fármaco após o intumescimento.

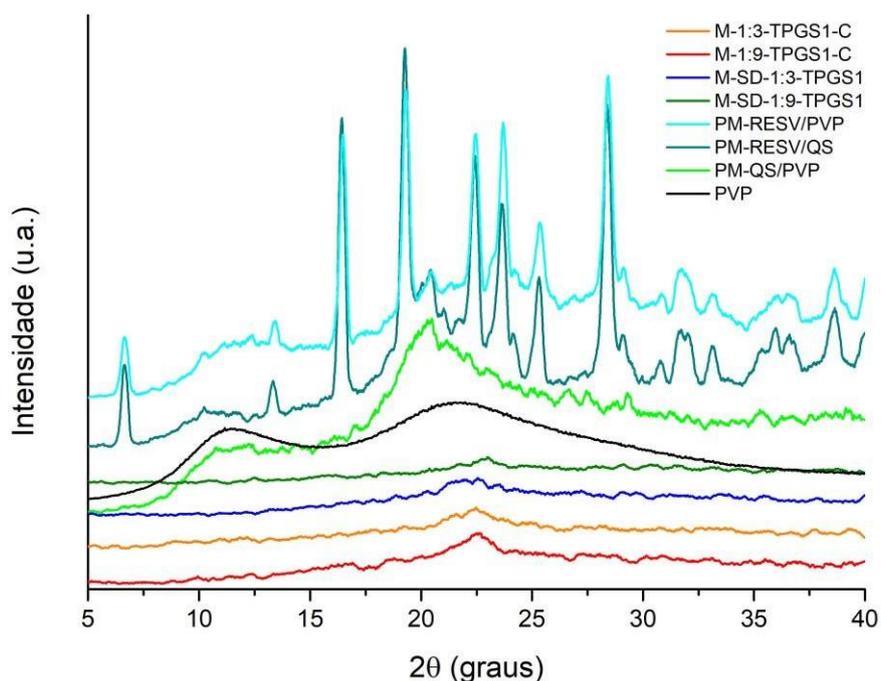
Além disso, as membranas apresentaram boa uniformidade de modo geral, algo necessário para se manter a cobertura adequada da área da pele afetada, bem como na uniformidade da dose de fármaco, como já discutido anteriormente. Outro fator importante a ser destacado é que devido à formulação SD-1:3-TPGS1 ter uma superfície irregular, isso pode se correlacionar com o baixo percentual de intumescimento apresentado por esta formulação, isso porque a superfície irregular diminui a superfície de contato da membrana com o funil de Ensley, diminuindo assim a velocidade de absorção do meio utilizado.

Apesar de incorporação do PEG 400 nas formulações, este não produziu poros como esperado.

5.3.7. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

De acordo com as análises de DRX na Figura 20, foi possível observar que as misturas físicas 1:1 entre o fármaco e a quitosana e entre o fármaco e o PVP demonstraram picos muitos semelhantes ao do *trans*-resveratrol sozinho, o que indica que simplesmente misturar o fármaco com os componentes das membranas não causa sua amorfização, sendo possível inferir que o desenvolvimento das dispersões sólidas foi o que garantiu sua amorfização.

Figura 20: DRX das misturas das matérias-primas 1:1 e das membranas.



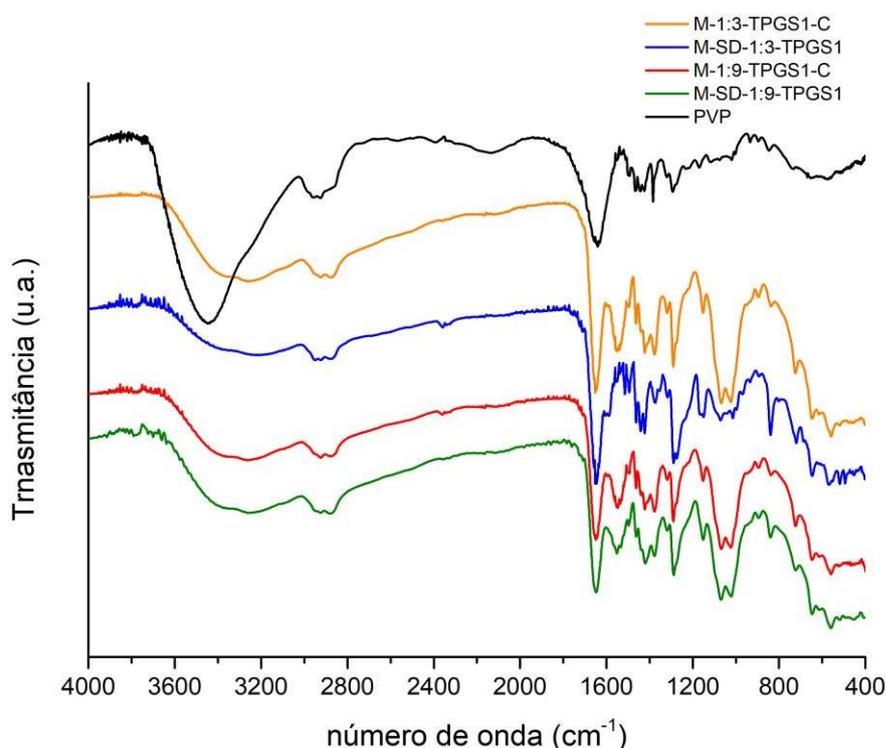
A mistura física 1:1 entre PVP e quitosana demonstrou um perfil semi-cristalino semelhante ao dos polímeros puros. As membranas, por sua vez, apresentaram perfil amorfo, o que comprova que o fármaco não recristalizou ao ser incorporado nas membranas poliméricas, sendo que os difratogramas das membranas estão semelhantes entre si, inclusive as formulações controle, que não contem o fármaco. Essa propriedade de evitar a recristalização do fármaco é algo inerente ao PVP (KURAKULA; RAO, 2020) sendo que quanto maior sua massa molecular, mais amorfo e maior a capacidade de inibir o crescimento de cristais. A capacidade de inibir esse fenômeno está na capacidade de formar estruturas em rede que formam interações com as moléculas de fármaco impedindo assim a interação entre essas moléculas, o que impede sua nucleação e, conseqüentemente, sua cristalização (PATEL; ANDERSON, 2015), o que pode indicar um melhor perfil de liberação deste ao ser aplicado sobre a pele, uma vez que pode prolongar também o estado de supersaturação do fármaco, algo importante para que haja também o aumento da permeação passiva através de membranas biológicas (SCHRAM; BEAUDOIN; TAYLOR, 2015).

5.3.8. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

O espectro gerado para a análise de FTIR para as membranas pode ser visto na Figura 21. É possível verificar que as membranas apresentaram

espectros semelhantes, observando sobreposição das bandas principais dos constituintes da formulação.

Figura 21: FTIR das membranas e do PVP.



As bandas observadas do PVP são as seguintes: bandas em 2923, 1460 e 1374 cm^{-1} , os quais se relacionam com os estiramentos dos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}$; um pico em 1285 cm^{-1} que indica uma ligação $-\text{C}-\text{N}$ também característica do PVP; e uma banda em 1650 cm^{-1} , o qual indica a presença de seus grupos carbonila ($-\text{C}=\text{O}$) (BRYASKOVA et al., 2011).

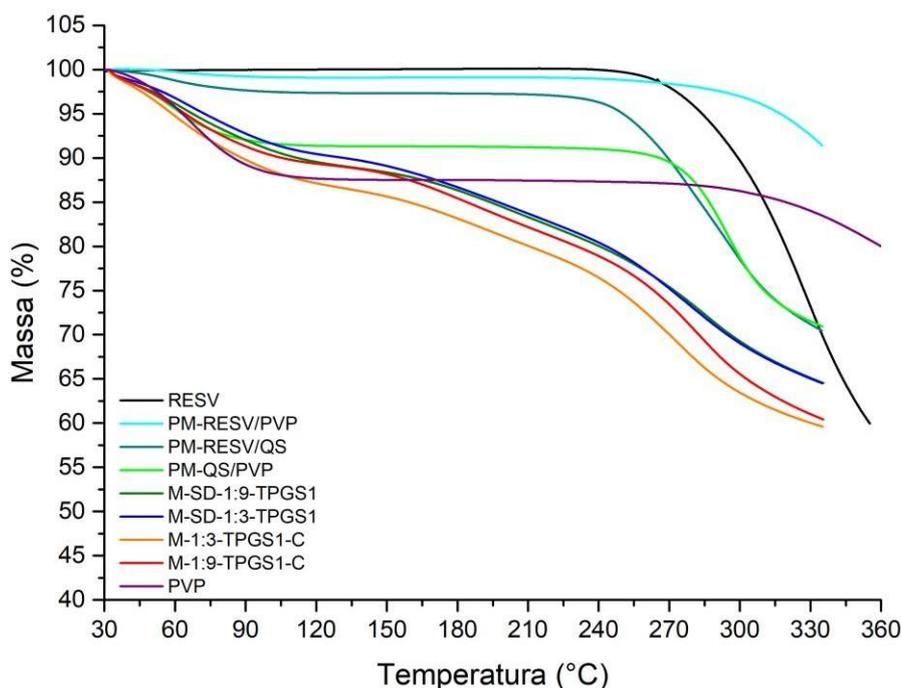
Segundo Karavas, Georgarakis e Bikiaris (2006), ao misturar PVP e quitosana, ocorre interações como ligações de hidrogênio entre si (como já discutido no perfil de intumescimento) devido aos grupos hidroxila da quitosana (1647 cm^{-1}) serem doadores de elétrons, podendo assim criar ligações de hidrogênio com as carbonilas da PVP (1650 cm^{-1}) e com isso garantir sua miscibilidade.

O *trans*-resveratrol, por sua vez, apresenta também grupamentos hidroxila com banda de absorção entre 3500 e 3200 cm^{-1} que ao entrarem em contato com as metilas da PVP sofrem deslocamento indicando que novas ligações de hidrogênio puderam ser formadas (LIN et al., 2020). Por fim, não há indícios de interações que poderiam evidenciar ligações que dificultariam a liberação *in vitro* e *in vivo* do fármaco.

5.3.9. TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (TG-DSC)

As Figuras 22 e 23 trazem, respectivamente, os resultados da análise de TGA e de DSC do fármaco, das misturas físicas 1:1 do fármaco com PVP e com quitosana e do PVP com quitosana. Além disso, é possível também observar os termogramas das 4 formulações.

Figura 22: TGA do *trans*-resveratrol, das misturas das matérias-primas 1:1 e das membranas.

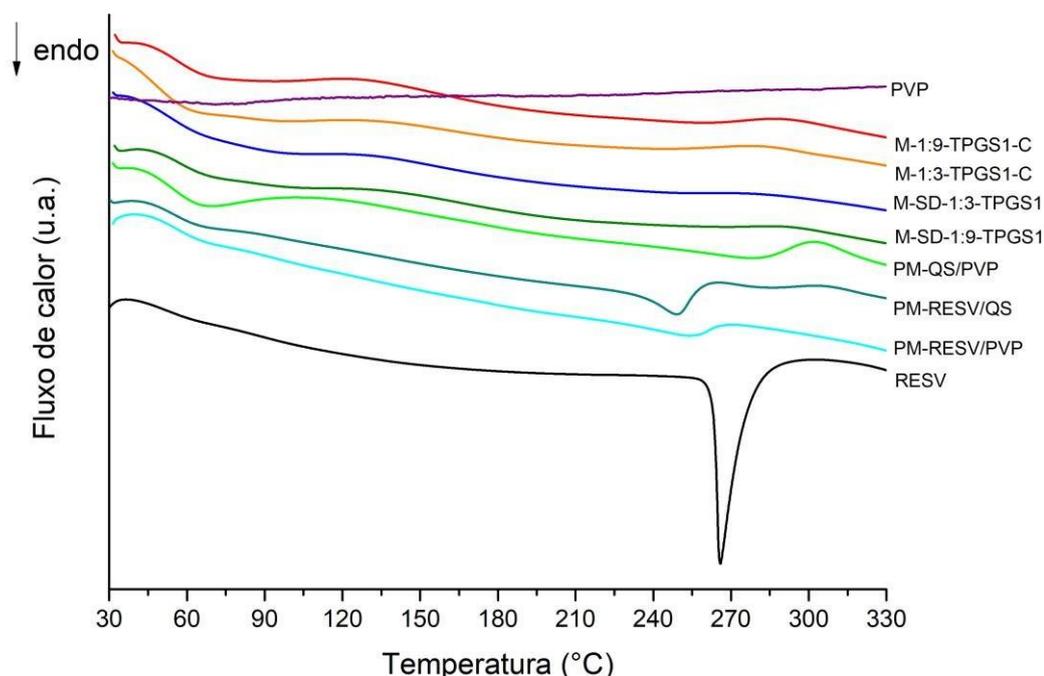


Na termogravimetria, tanto o *trans*-resveratrol quanto as misturas físicas apresentaram pouca perda de massa a 100 °C, diferente do PVP puro e das membranas, indicando que eles contem certo teor de umidade. Além disso, durante um evento térmico quando ocorre uma perda de massa íngreme, ocorre então uma diminuição da massa de forma brusca podendo indicar que há compostos cristalinos na amostra, enquanto que a perda de massa gradual nas membranas pode indicar que os componentes de fato não possuíam estrutura cristalina, incluindo o fármaco. Também é possível notar que não houve incompatibilidade entre os materiais nas misturas físicas, uma vez que as decomposições térmicas das misturas não seguem o perfil das matérias-primas isoladas (WESOLOWSKI; ROJEK, 2013).

É possível notar que a perda de massa das membranas ocorre de forma gradual, porém enquanto a maioria das misturas físicas bem como o fármaco só iniciam uma perda de massa mais expressiva por volta dos 240 °C, as membranas já possuem uma perda antes dos 100 °C que se relaciona com a umidade residual das membranas. De acordo com o TGA, também é possível

verificar a perda de massa da degradação polimérica que se iniciando por volta dos 270 °C.

Figura 23: DSC do *trans*-resveratrol, das misturas das matérias-primas 1:1 e das membranas.



Na Figura 35, é possível observar os termogramas de DSC, o qual demonstra que o principal pico endotérmico do *trans*-resveratrol está ausente nas formulações, indicando que este foi realmente amorfizado nas membranas (HAO et al., 2014). Quanto às misturas físicas, é possível notar que a mistura entre quitosana e *trans*-resveratrol diminuiu significativamente o evento endotérmico referente ao fármaco, enquanto que o fármaco puro apresentou o pico em 265 °C, houve deslocamento para próximo de 250 °C.

É possível observar ausência dos eventos térmicos relacionados à Tg da PVP pura bem como das membranas. Isso se deve ao fato de que quanto maior a massa molecular da PVP, mais alta é sua Tg (BROWNE; WORKU; HEALY, 2020). De acordo com Cassu e Felisberti (1999), a PVP 360 possui um relaxamento em cerca de 100 °C e a Tg em por volta dos 187 °C, porém esses eventos são geralmente pouco evidenciados em formulações, principalmente quando há baixa concentração deste, que no caso das membranas, é de 1%.

Entretanto, na mistura física de quitosana com PVP pode-se observar uma banda endotérmica entre os 65 e 80 °C e uma banda exotérmica que se inicia por volta dos 285 °C sendo estas muito semelhantes ao perfil térmico da quitosana pura.

As membranas, por sua vez apresentam um perfil mais amorfo, apresentando principalmente o evento relacionado com a perda de água. Não houve diferença entre os termogramas das membranas contendo as dispersões sólidas e com a quitosana livre/sem a presença do fármaco, não demonstrando incompatibilidades químicas.

5.3.10. BIOADESÃO *IN VITRO*

As forças médias necessárias para se desprender a pele de orelha de porco das formulações bem como seus desvios padrão estão dispostos na Tabela 16, onde quanto maior a força necessária, mais bioadesiva é a formulação.

Tabela 16: Média e desvio padrão da força de bioadesão. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as amostras (Test-T, $p > 0,05$).

Formulações	Médias (N)
M-1:9-TPGS1-C	0,137±0,224 ^a
M-1:3-TPGS1-C	0,063±0,0155 ^b
M-SD-1:9-TPGS1	0,114±0,0171 ^{a,c}
M-SD-1:3-TPGS1	0,100±0,0115 ^d

A bioadesão é uma característica importante na avaliação de medicamentos de aplicação cutânea, uma vez que está relacionada ao tempo de permanência da formulação em contato com a pele, permitindo que o medicamento esteja em contato com o tecido enquanto libera o fármaco de forma controlada e com isso, um maior tempo de ação do fármaco, o que se correlaciona com a efetividade terapêutica (CARRERAS; CANALES; MELERO, 2016)

O PVP apresenta boas características de bioadesão em diferentes membranas biológicas de origem animal. Se comparado com outros polímeros, a força de destaque necessária para o PVP é maior que a do carbopol (HAMZAH et al., 2010).

Pagano e colaboradores (2019), afirmam que o PVP é um polímero capaz de ter boas propriedades bioadesivas, pois possui uma parte hidrofóbica apta a fazer interações com proteínas e outras moléculas de superfície do estrato córneo da orelha de porco, formando interações que levam ao fenômeno de bioadesão.

A quitosana também apresenta características muco e bioadesivas. Sizilio e colaboradores (2018), desenvolveram membranas poliméricas feitas de blenda entre quitosana e PVP para a liberação de valerato de betametasona, as quais obtiveram bons resultados tanto mecânicos quanto de adesão em membranas biológicas, indicando que ambos os materiais podem gerar bons resultados de permanência sobre tecidos biológicos.

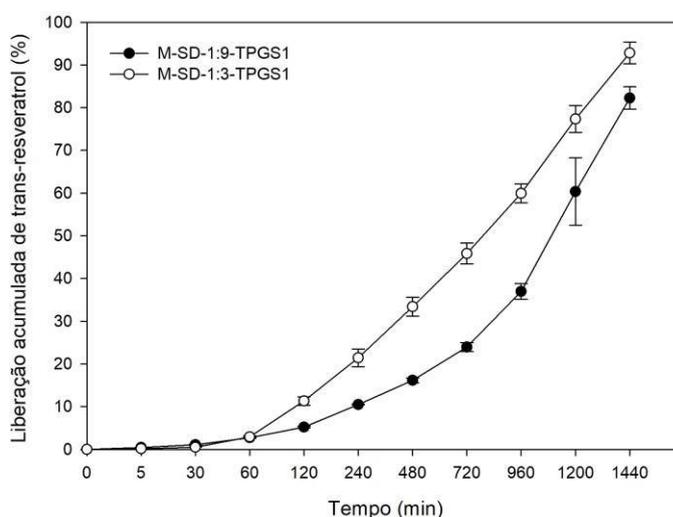
Todas as membranas se mostraram bioadesivas, sendo que as que contém o fármaco podem estar aptas a se manter em contato com a pele enquanto ocorre a liberação do *trans*-resveratrol para que ocorra o efeito farmacológico. As formulações com maior proporção de quitosana

apresentaram maiores valores de bioadesão, já que ela é um material que assim como o PVP, também tem características de bioadesividade.

5.3.11. LIBERAÇÃO DO *TRANS*-RESVERATROL *IN VITRO*

A Figura 24 mostra o perfil de liberação do fármaco a partir das membranas. Observa-se que a liberação ocorre de forma prolongada durante as 24 horas do experimento, porém a totalidade do fármaco não foi liberada nesse período.

Figura 24: Perfil de liberação *in vitro* das membranas M-SD-1:9-TPGS1 e M-SD-1:3-TPGS1.



De acordo com os resultados, o total liberado de *trans*-resveratrol em 24 h foi de $244,35 \pm 8,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (82,27%) e $745,67 \pm 32,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (92,81%) a partir das formulações M-DS-1:9-TPGS1 e M-DS-1:3-TPGS1, respectivamente.

O ensaio de liberação tem por objetivo definir a cinética de difusão do fármaco que é liberado da forma farmacêutica. Está relacionado a alguns eventos, dentre eles a dissolução do fármaco no veículo, a partição do fármaco através da membrana e a difusão através da membrana (RAVAL; PARIKH; ENGINEER, 2010).

É interessante observar que o *trans*-resveratrol livre (em sua forma cristalina) possui uma cinética de difusão de primeira ordem em diferentes meios, incluindo a água e o etanol, algo que pode mudar caso esta esteja na sua forma amorfizada (ZHANG et al., 2014).

O PVP possui por característica funcionar como um polímero capaz de sustentar a liberação controlada de fármacos, sendo que geralmente quanto maior é a razão entre o PVP e o fármaco, maior é a tendência de controlar liberação do fármaco. Como membrana, esse material demonstra boa capacidade de incorporação de fármacos, estabilidade (evitando sua recristalização) e adesividade (FRANCO; DE MARCO, 2020) sendo todos fatores necessários para que a liberação do fármaco se dê de forma adequada.

Na primeira hora do ensaio as membranas liberaram pouca quantidade de fármaco, abaixo de 5%, tendo se iniciado em alguns minutos o que indica que as membranas possuem perfil de liberação prolongado, segundo o descrito na RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Esse fato se deve provavelmente ao início do intumescimento da membrana em contato com a solução receptora.

Para que membranas poliméricas possam exercer a liberação de fármacos, é necessário primeiramente que haja sua hidratação seguida de seu intumescimento, como discutido anteriormente no ensaio de perfil de intumescimento. Somente após a hidratação o fármaco será capaz de se difundir, ou seja, percorrer as cadeias poliméricas e ser liberado para o exterior da formulação. Sendo assim, a quantidade de polímero empregada irá afetar também esse caminho percorrido (RAVAL; PARIKH; ENGINEER, 2010).

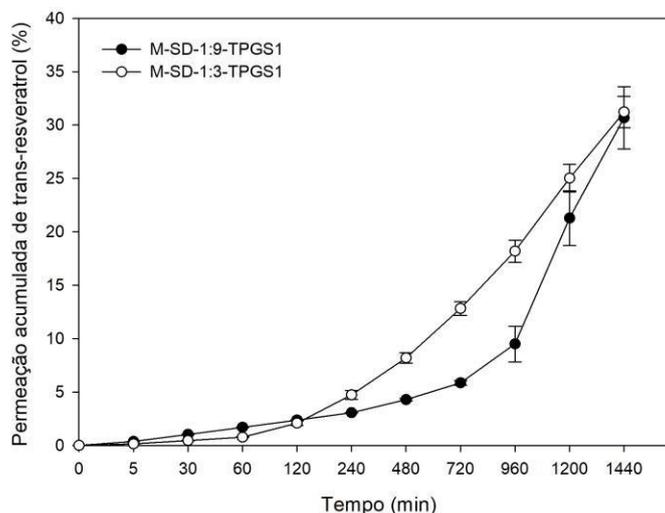
O PVP por si só já possui a capacidade de sustentar a liberação controlada de fármacos (SOHAIL et al., 2014), porém devido a ambas as membranas possuírem a mesma quantidade deste polímero, a diferença observada entre as duas formulações se deve as diferentes quantidades de quitosana provenientes das dispersões sólidas, uma vez que esta também controla a liberação de fármacos (N. MENGATTO; M. HELBLING; A. LUNA, 2012).

Como a membrana M-SD-1:9-TPGS1 possui maior quantidade de quitosana, é esperado que esta demore mais para intumescer e começar a liberar o fármaco e, devido a maior concentração de polímeros, sua liberação seja mais lenta, ainda que ela possua menos fármaco se comparado com a formulação M-SD-1:3-TPGS1.

5.3.12. PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Para melhor entendimento dos resultados, as análises estão dipostas juntas na mesma seção, uma vez que os dados obtidos são complementares. A Figura 25 apresenta o perfil da permeação acumulada do fármaco em 24 horas de análise.

Figura 25: Perfil da permeação cutânea das membranas M-SD-1:9-TPGS1 e M-SD-1:3-TPGS1, durante 24 horas.



A permeação do fármaco foi de cerca de $92,04 \pm 8,72 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (M-SD-1:9-TPGS1) e de $243,05 \pm 11,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele (M-SD-1:3-TPGS1), representando $30,68 \pm 2,91$ e $31,22 \pm 1,46\%$ do total de fármaco, mostrando um perfil diferente entre elas. A membrana preparada com a dispersão sólida contendo maior quantidade de quitosana apresentou uma permeação mais lenta, o que se deve ao maior prolongamento da liberação do fármaco, conforme discutido anteriormente, que reflete na sua permeação cutânea.

O fluxo de permeação do fármaco através do estrato córneo obedece ao modelo de difusão de Fick, o qual depende da solubilidade, do coeficiente de difusão, da extensão de difusão do fármaco na membrana, bem como a concentração e a solubilidade do fármaco no veículo. É a partir desse princípio que o fármaco difunde pela pele e pode tanto ficar retido nela quanto passar por ela e levar ao efeito transdérmico (que ocorre ao passar pela derme e atingir a corrente sanguínea), o que faz com que seja necessário quantificar quanto do fármaco passa e o quanto fica retido nas suas camadas (COUTO et al., 2014; TODO, 2017).

Assim como a bioadesão, a permeação cutânea pode ser realizada em pele humana advinda de cirurgias plásticas e também de pele de orelha de porco, uma vez que esta possui similaridades fisiológicas, histológicas (folicúlos pilosos e pêlos) e estruturação muito próxima à da pele humana, tais como a presença de lipídios e enzimas que podem influenciar na permeação do fármaco.

Como discutido anteriormente, as membranas possuem em sua composição o TPGS proveniente das dispersões sólidas, o que poderia ser favorável à permeação cutânea, uma vez que este causa a diminuição da tensão interfacial e modifica a barreira seletiva do estrato córneo permitindo que o fármaco permeie a pele através das vias intercelular, transcelular e/ou pelos apêndices cutâneos (TAVARES LUIZ et al., 2021).

Sendo a dermatite atópica uma doença que afeta tanto a derme quanto a epiderme, é interessante que seja encontrada uma maior quantidade de *trans-resveratrol* tanto no estrato córneo (avaliada pela análise de *tape stripping*) e nas demais camadas da pele (avaliada pela retenção cutânea). Como não se trata de uma doença sistêmica, é preferível que a quantidade de fármaco encontrada seja principalmente nas camadas mais fundas da pele e não no meio coletor, não sendo interessante que a maior fração de fármaco seja quantificado na análise de permeação cutânea (RUELA et al., 2016).

Conforme Ahmadi e equipe (2017) e com o que já foi observado na análise de DRX, o PVP inibe a recristalização de fármacos e, portanto, é possível afirmar que além da presença da quitosana, este também impactou no prolongamento da liberação do *trans-resveratrol*. Porém, devido a ambas as membranas terem a mesma concentração de PVP, a diferença em seus perfis se deu de acordo com a concentração da quitosana, a qual também possui propriedade de prolongar a liberação de fármacos (LI et al., 2010).

A retenção cutânea é uma técnica importante para a avaliação da profundidade onde o fármaco fica retido, sendo análises importantes para se entender a partição do fármaco no local de sua ação.

Os resultados do total de *trans-resveratrol* encontrado na permeação, retenção e *tape stripping* foram expressos em percentagem para cada análise, sendo que 100% indica o total ao somar os 3 resultados para cada membrana.

Os resultados para as análises de retenção cutânea se encontram nas Tabelas 17 e 18, respectivamente.

Tabela 17: Médias acumuladas e percentagens de *trans*-resveratrol retido no estrato córneo após 24 horas.

Formulações	Média da concentração acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele)	Fármaco retido (%)
M-SD-1:9-TPGS1	47,14 \pm 53,41	35,10 \pm 4,87
M-SD-1:3-TPGS1	189,56 \pm 65,10	27,29 \pm 4,48

Tabela 18: Médias acumuladas e percentagens de *trans*-resveratrol retido após 24 horas nas camadas da derme e epiderme abaixo do estrato córneo.

Formulações	Média da concentração acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele)	Fármaco retido (%)
M-SD-1:9-TPGS1	59,06 \pm 25,82	18,18 \pm 10,28
M-SD-1:3-TPGS1	117,26 \pm 14,53	15,59 \pm 1,42

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que para a formulação M-SD-1:9-TPGS1 o total de fármaco encontrado nas camadas da pele de porco mais o que permeou e foi encontrado no meio receptor resultou em 234,70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele (83,88%), enquanto que para a formulação M-SD-1:3-TPGS1, a permeação total foi de 711,73 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele (91,25%), o que demonstra que além de permear menos, a membrana na proporção de 1:9 possui menos fármaco (300 μg no total da área da entrada da célula de Franz) enquanto que a 1:3 possui maior quantidade de fármaco (780 μg da área total analisada).

Também é importante observar que a percentagem total de fármaco encontrada tanto no *tape stripping* quanto na retenção cutânea foi de 42,88% para a membrana M-SD-1:3-TPGS1 e de 53,28% para a M-SD-1:9-TPGS1, sendo assim o que ainda estaria disponível para o efeito terapêutico.

Apesar de um percentual ligeiramente menor de fármaco retido, a formulação M-SD-1:3-TPGS1 possui maior concentração deste, apresentando então maiores concentrações do fármaco no estrato córneo e na derme, que está relacionado a maior velocidade de liberação deste.

É importante também salientar que ao serem comparadas as percentagens de fármaco permeado em cada situação ocorrem diferenças nas proporções de fármaco em cada região e isso provavelmente se dá devido ao momento que cada formulação começa a liberar o fármaco, sendo assim como a M-SD-1:3-TPGS1 começa a liberar algumas horas antes, é esperado que ao final das 24 horas haja uma proporção ligeiramente maior de resveratrol que permeou a pele se comparado com a M-SD-1:9-TPGS1 que por iniciar sua liberação de forma mais tardia acabou tendo uma proporção ligeiramente maior de fármaco retido nas camadas da pele. Mesmo assim, devido a quantidade de fármaco em cada formulação, apenas da M-SD-1:3-TPGS1 ter apresentado uma proporção menor de fármaco nas camadas da pele após as 24 horas, ainda é possível notar que a concentração retida na pele é bem superior que a da outra membrana.

Dessa forma, a amostra M-SD-1:3-TPGS1 apresenta-se mais promissora para exercer a ação farmacológica, pois além de iniciar sua liberação de forma mais rápida, consegue fazer com que a concentração de *trans*-resveratrol no

estrato córneo seja acumulada antes de permear para as camadas mais profundas da pele.

5.3.12. CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

De acordo com a ISO 10993, a citotoxicidade *in vitro* tem por finalidade avaliar a biocompatibilidade dos protótipos desenvolvidos, sendo um parâmetro importante para a avaliação da segurança e a eficácia. As amostras foram lidas imediatamente após a incubação de 4 horas, onde foi verificado se houve descoloração do meio e aparecimento de halo em torno da formulação, sendo ambos indicativos de diminuição da viabilidade dos fibroblastos.

No caso das amostras que apresentaram o aparecimento de halos, estes tiveram seus diâmetros medidos e, de acordo com o tamanho, as amostras foram classificadas pelo grau de citotoxicidade, como demonstrado na Tabela 19.

Tabela 19: Médias dos halos observados e seu grau de citotoxicidade correspondente (JEONG et al., 2019).

Amostras	Grau
Controle +	Moderada
Controle -	Ausente
M-1:9-TPGS1-C	Ausente
M-1:3-TPGS1-C	Ausente
M-SD-1:9-TPGS1	Branda
M-SD-1:3-TPGS1	Branda
<i>Trans-resveratrol</i>	Branda

Sendo assim, pode-se observar que o *trans-resveratrol* utilizado apresentou uma citotoxicidade branda (até 0,5 cm de halo em volta da formulação), o qual houve diminuição nas membranas contendo o fármaco, apesar de mesmo assim também terem sido observadas diminuição da viabilidade celular.

É possível afirmar que a toxicidade branda apresentada pelas membranas é devido a presença do *trans-resveratrol* uma vez que as formulações sem fármaco, M-1:9-TPGS1-C e M-1:3-TPGS1-C, possuem todos os demais componentes e não apresentaram qualquer sinal de diminuição da viabilidade dos fibroblastos, estando íntegros os poços onde foram semeados, semelhante aos poços do controle negativo.

É possível também observar que as membranas contendo o fármaco apresentam halos menores ao do fármaco livre, indicando que a incorporação do fármaco na forma de dispersão sólida na membrana reduziu a sua citotoxicidade.

De acordo com Maccario e equipe (2012), o *trans-resveratrol* pode apresentar efeito antiproliferativo em culturas celulares de fibroblastos quando em altas concentrações, apesar de não ser uma observação usual.

Este fato pode ser melhor entendido ao analisar o estudo de Ling, Gu e Cheng (2017), que elucida o mecanismo pelo qual o resveratrol leva a apoptose de fibroblastos, o qual se relaciona com a atividade indutora da SIRT-

1, que modula diversos fatores de transcrição como a proteína p53, as caspases e o fator nuclear NF- κ B, o que faz com que se reduza a viabilidade celular, síntese de DNA e a migração celular levando a ação de apoptose dose-dependente. Ainda assim a citotoxicidade encontrada foi branda.

Sendo assim, o uso do fármaco de forma controlada pode provavelmente diminuir a citotoxicidade uma vez que como comprovado pela análise de permeação cutânea, somente cerca de 30% do *trans*-resveratrol poderia passar para a corrente sanguínea e ainda assim, essa permeação ocorre de forma lenta, não concentrando demais nas camadas da pele, o que tende a diminuir seu potencial citotóxico.

Anlar e equipe, 2016, ao testarem o resveratrol em linhagem de fibroblastos, observaram que em 24 h concentrações de 50 μ L/mL ou mais foram capazes de reduzir a viabilidade das células, sendo que em 400 μ L/mL ocorreu a diminuição da viabilidade celular para 55%.

5.3.13. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

Os valores de percentagem de inflamação e de redução de inflamação estão dispostos na Tabela 20.

Tabela 20: Resultados de inflamação e redução da inflamação. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras (Teste de Tuckey, $p > 0,05$).

Grupos	Inflamação média (%)	Redução da inflamação (%)
Resveratrol 3 mg/mL	30,85 \pm 4,29	69,15 ^a
M-SD-1:9-TPGS1	56,89 \pm 7,19	43,11 ^a
M-SD-1:3-TPGS1	33,98 \pm 7,09	76,02 ^a
M-1:9-TPGS1-C	80,37 \pm 8,04	19,63 ^{b,e}
M-1:3-TPGS1-C	83,58 \pm 21,54	15,42 ^{c,e}
Controle + (dexametasona 1 mg/g)	24,82 \pm 6,96	75,18 ^d
Controle - (sem tratamento)	98,45 \pm 7,21	1,55 ^e

O edema de orelha de camundongo induzido é o modelo animal e histológico mais usual para o teste de medicamentos de administração cutânea com atividade anti-inflamatória tópica. Ele é um modelo usual devido a ser rápido e simples de ser executado, bem como possui uma boa reprodutibilidade (MARINO-MARMOLEJO et al., 2016).

O óleo de cróton foi empregado como indutor inflamatório devido a ser um agente flogístico contendo ésteres de forbol, sendo o seu principal constituinte o 12-O-tetra-canoiforbol-13-acetato, também conhecido como TPA. O TPA, por sua vez, é um agente irritante pró-inflamatório que ativa a proteína C quinase e outras quinases que sofrem ativação por mitógeno estimulando a liberação de fatores de transcrição, tais como o fator nuclear κ B (NF κ B) e a proteína 1 (AP-1) que por sua vez ativam citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 β (IL-1 β) a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral α (TNF α), fosfolipase A2, entre outros que induzem a ativação de plaquetas e do ácido araquidônico (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007; RAMOS et al., 2013)

A inflamação ocorre então causando o aumento da permeabilidade vascular, bem como a vasodilatação, migração leucocitária e a produção de

aminas vasoativas e eicosanoides que são sintetizados pela ciclooxigenase (COX) e a 5-lipoxienase (5-LOX)(ABDULKHALEQ et al., 2018). Sendo substâncias anti-inflamatórias tais como o *trans*-resveratrol capazes de inibir alguns pontos dessas vias de indução inflamatória, eles podem então ter a capacidade de reverter o quadro causado pelo óleo de cróton.

De acordo com o observado na Tabela 20, a suspensão de *trans*-resveratrol e as membranas preparadas com as dispersões sólidas apresentaram os maiores valores de redução da inflamação (depois do controle positivo). Isso comprova a ação anti-inflamatória do fármaco e demonstra que a incorporação nas membranas mantém essa atividade.

Ainda, pôde-se notar que enquanto os animais do grupo sem tratamento (controle negativo) tiveram aumento médio de suas orelhas expresso como 98,45%, os grupos tratados com membranas sem fármaco apresentaram valores semelhantes entre si, não havendo diferença estatística entre elas, indicando que a ação anti-inflamatória observada se deve ao fármaco.

Sendo assim, é possível inferir através desses resultados que em seis horas de tratamento houve maior efeito terapêutico da formulação M-SD-1:3-TPGS1, o que é interessante, pois trata-se da membrana com maior teor de fármaco e que apresentou perfil de liberação *in vitro* mais conveniente ao proposto, podendo ser apta para o tratamento de inflamações cutâneas.

É importante também mencionar que de acordo com os resultados para a liberação *in vitro*, a formulação M-SD-1:9-TPGS1 só conseguiu ter uma liberação relativamente expressiva do fármaco após 8 horas de análise, o que pode ter influenciado nos resultados *in vivo*, uma vez que em teoria a partir de 4 horas a membrana na proporção M-SD-1:3-TPGS1 já começou a agir, enquanto que a outra não.

Outro fator importante é que por mais que a M-SD-1:3-TPGS1 tenha tido valores bem próximos ao do grupo que foi tratado com a suspensão de *trans*-resveratrol talvez o grupo tratado com a suspensão não tenha tido tempo de contato o suficiente, uma vez que foi notado o escorrimento deste após a aplicação. Logo, se houvesse a garantia que a suspensão de *trans*-resveratrol pudesse ficar em contato com as orelhas dos animais, provavelmente o efeito anti-inflamatório seria maior, mas devido a esse fato muito do fármaco deve ter sido perdido, diminuindo assim o real efeito anti-inflamatório das suspensões.

Sendo assim, o fato de que as membranas conseguem permanecer por maior tempo sobre a pele devido a sua bioadesão poderia indicar que o uso desse tipo de sistema é vantajoso, uma vez que além de apresentar menor concentração de fármaco, este é liberado gradativamente e sendo mantida sobre a pele, faz com que a concentração nos tecidos também se mantenha por mais tempo sem escorrer ou secar, além de evitar desperdícios de fármaco.

5. CONCLUSÕES

As dispersões sólidas foram desenvolvidas com sucesso, apresentando boas propriedades, sendo a maioria delas capazes de dobrar e uma (SD-1:9-TPGS1) capaz de quase triplicar a solubilidade do *trans*-resveratrol em água, sendo as que contêm TPGS foram as mais promissoras. As dispersões sólidas puderam ser incorporadas nas membranas de PVP sem causar problemas de estabilidade. O uso do PVP de alta massa molecular conseguiu evitar a recristalização do fármaco ao ser incorporado neste e formar membranas.

As membranas desenvolvidas apresentaram boas características de homogeneidade, intumescimento, permeabilidade e taxa de transmissão ao vapor d'água, biodesão e conseguiram promover a liberação controlada do fármaco, indicando que além de algo inédito, o compósito formado pode ter características de estabilidade realçadas, tais como o aumento nas propriedades mecânicas, a prevenção da recristalização de um fármaco altamente cristalino e a capacidade de liberação e permeação cutâneas adequadas para o objetivo proposto, permitindo uma terapia eficaz e segura.

É importante ressaltar também que a formulação M-SD-1:3-TPGS1 apresentou maior ação farmacológica em modelo animal. Sendo assim, o candidato mais promissor é esta membrana uma vez que esta demonstrou ser capaz de promover o efeito anti-inflamatório cutâneo, podendo ser utilizada em tratamentos de dermatite atópica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL RASOOL, B. K.; MOHAMMED, A. A.; SALEM, Y. Y. The optimization of a dimenhydrinate transdermal patch formulation based on the quantitative analysis of in vitro release data by DDSolver through skin penetration studies. **Scientia Pharmaceutica**, v. 89, n. 3, 2021.
- ABDULKHALEQ, L. A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 627-635, 2018.
- ABOU-SHAMAT, M. A. et al. Modifying the Properties of Thermogelling Poloxamer 407 Solutions through Covalent Modification and the Use of Polymer Additives. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 220, n. 16, p. 1-19, 2019.
- ABUDUKELIMU, A. et al. Predictable irreversible switching between acute and chronic inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, p. 1-16, 2018.
- AGENCY, E. M. European Medicines Agency. v. 2, n. June 1995, p. 1-15, 2006.
- AHMADI, F. et al. Preparation and physicochemical evaluation of transdermal aerosols containing ketoprofen. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 8, p. 1813-1818, 2017.
- AKDIS, C. A. Therapies for allergic inflammation: Refining strategies to induce tolerance. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 736-749, 2012.
- AKHTAR, F. H. et al. Highways for water molecules: Interplay between nanostructure and water vapor transport in block copolymer membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 572, p. 641-649, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.11.050>>.
- AKULA, P.; LAKSHMI, P. K. Effect of pH on weakly acidic and basic model drugs and determination of their ex vivo transdermal permeation routes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 2, p. 1-8, 2018.
- AL-JUMAILY, E. F. A.; HAMID, G. S.; ALI, K. F. Synthesis and Total Phenol Content of New Resveratrol Derivative. **American Journal of Advanced Drug Delivery**, v. 2, n. 3, p. 320-329, 2014.
- ALAM, H. et al. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 21, p. 4068-4078, 2011.
- ALJAWISH, A. et al. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 25-39, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.10.014>>.
- AMARO-ORTIZ, A.; YAN, B.; D'ORAZIO, J. A. Ultraviolet radiation, aging and the skin: Prevention of damage by topical cAMP manipulation. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6202-6219, 2014.
- ANATOLY, C. et al. Water vapor permeability through porous polymeric membranes with various hydrophilicity as synthetic and natural barriers. **Polymers**, v. 12, n. 2, p. 282, 2020.
- ANBUKARASU, P.; SAUVAGEAU, D.; ELIAS, A. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-14, 2015.
- ANVISA. Formulário Nacional Da Farmacopeia Brasileira 2ª edição - Revisão 02. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 225, 2012.
- ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 23, p. 2224-2234, 2009.
- ARENS, E.; HUI, Z. **The skin's role in human thermoregulation and comfort**. [s.l: s.n.]
- ARORA, P.; MUKHERJEE, B. Design , Development , Physicochemical , and In Vitro and In Vivo Evaluation of Transdermal Patches Containing Diclofenac Diethylammonium Salt. v. 91, n. 9, p. 2076-2089, 2002.
- ASGREEN, C. et al. Influence of the polymer glass transition temperature and molecular weight on drug amorphization kinetics using ball milling. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 6, p. 1-7, 2020.
- AUDI, C. et al. Desenvolvimento e mecanismo de ação da canície e queda capilar. **Revista de Iniciação Científica, Saúde e Bem-estar**, v. 6, n. 5, p. 2-18, 2017.
- BAGHEL, S.; CATHCART, H.; O'REILLY, N. J. Polymeric amorphous solid dispersions: a review of amorphization, crystallization, stabilization, solid-state characterization, and aqueous solubilization of biopharmaceutical classification system class II drugs. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 105, n. 9, p. 2527-2544, 2016.
- BARBA, C. et al. Selective modification of skin barrier lipids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 172, p. 94-102, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.040>>.
- BARBAROT, S. et al. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international

- survey. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 73, n. 6, p. 1284-1293, 2018.
- BARCAUI, E. de O. et al. Study of the skin anatomy with high-frequency (22 MHz) ultrasonography and histological correlation. **Radiologia Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 324-329, 2015.
- BARICEVIC, D. et al. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. v. 75, p. 125-132, 2001.
- BASHA, S. K. S. et al. Structural and Dielectric Properties of PVP Based Composite Polymer Electrolyte Thin Films. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 27, n. 2, p. 455-466, 2017.
- BASSI, P.; KAUR, G. Polymeric films as a promising carrier for bioadhesive drug delivery: Development, characterization and optimization. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 1, p. 32-43, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2015.06.003>>.
- BATHE, R.; KAPOOR, R.; BATHE, R. S. Transdermal drug delivery system: formulation, development and evaluation-An overview * Correspondence Info: v. 6, n. 01, p. 1-10, 2015.
- BAVELONI, F. G. et al. Nanotechnology-based Drug Delivery Systems as Potential for Skin Application: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, 2021.
- BENAYAHOU, A.; AMIRA-GUEBAILIA, H.; HOUACHE, O. On the role of ethylene bridge elongation in the antioxidant activity of polyhydroxylated stilbenes: A theoretical approach. **Comptes Rendus Chimie**, v. 18, n. 2, p. 149-159, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2014.04.003>>.
- BERTUZZI, M. A.; GOTTIFREDI, J. C.; ARMADA, M. Mechanical properties of a high amylose content corn starch based film, gelatinized at low temperature. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 3, p. 219-227, 2012.
- BODRATTI, A. M.; ALEXANDRIDIS, P. Formulation of poloxamers for drug delivery. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018.
- BOUTHILLETTE, M. et al. A crosslinked polymer skin barrier film for moderate to severe atopic dermatitis: A pilot study in adults. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.09.073>>.
- BRAGULLA, H. H.; HOMBERGER, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **Journal of Anatomy**, v. 214, n. 4, p. 516-559, 2009.
- BRENNER, M.; HEARING, J. V. The protective role of melanin against UV. **Photochem Photobiology**, v. 84, n. 3, p. 539-549, 2008.
- BROWNE, E.; WORKU, Z. A.; HEALY, A. M. Physicochemical properties of poly-vinyl polymers and their influence on ketoprofen amorphous solid dispersion performance: A polymer selection case study. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, 2020.
- BRYASKOVA, R. et al. Synthesis and comparative study on the antimicrobial activity of hybrid materials based on silver nanoparticles (AgNps) stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP). **Journal of Chemical Biology**, v. 4, n. 4, p. 185, out. 2011.
- CAMONT, L. et al. Radical-induced oxidation of trans-resveratrol. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 741-747, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.11.005>>.
- CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927-93, 2007.
- CARBINATTO, F. M. et al. Physical properties of pectin-high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281-288, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.042>>.
- CARRERAS, J. J.; CANALES, P.; MELERO, A. Mucoadhesion of Polymeric Drug Delivery Systems: Polymeric Nanoparticles and its Interactions with the Intestinal Barrier. v. 4, p. 1-5, 2016.
- CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Poly(vinyl alcohol) and poly(vinylpyrrolidone) blends: 2. Study of relaxations by dynamic mechanical analysis. **Polymer**, v. 40, n. 17, p. 4845-4851, 1999.
- CASTRO, A. P. B. M. Calcineurin inhibitors in the treatment of allergic dermatitis. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. SUPPL. 2, p. 166-172, 2006.
- CATENACCI, L. et al. and X-Ray Structural Study. n. Figure 1, 2020.
- CÉSAR, I. D. C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 235-240, 2009.
- CHANDRA DEY, S. et al. Preparation, Characterization and Performance Evaluation of

- Chitosan As an Adsorbent for Remazol Red. **International Journal of Latest Research in Engineering and Technology**, n. March, p. 52-62, 2016.
- CHANDRASEKHARAN, A. et al. Acid-treated water-soluble chitosan suitable for microneedle-assisted intracutaneous drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 1-14, 2019.
- CHAUDHARI, S. P.; DUGAR, R. P. Application of surfactants in solid dispersion technology for improving solubility of poorly water soluble drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 68-77, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.06.010>>.
- CHEDEA, V. S. et al. Resveratrol: From diet to topical usage. **Food and Function**, v. 8, n. 11, p. 3879-3892, 2017.
- COUTO, A. et al. Dermic diffusion and stratum corneum: A state of the art review of mathematical models. **Journal of Controlled Release**, v. 177, n. 1, p. 74-83, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.005>>.
- D'SOUZA, A. A.; SHEGOKAR, R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 9, p. 1257-1275, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>>.
- DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: Advances in determination, prediction and engineering. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 1, p. 42-57, 2004.
- DE OLIVEIRA ELOY, J. et al. Solid dispersion of ursolic acid in Gelucire 50/13: A strategy to enhance drug release and trypanocidal activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 4, p. 1436-1445, 2012.
- DEGUCHI, H. et al. Harmful Effects of Synthetic Surface-Active Detergents against Atopic Dermatitis. **Case Reports in Dermatological Medicine**, v. 2015, p. 1-5, 2015.
- DELEANU, D.; NEDELEA, I. Biological therapies for atopic dermatitis: An update (review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 17, n. 2, p. 1061-1067, 2019.
- DIJKHOFF, I. M. et al. Impact of airborne particulate matter on skin: A systematic review from epidemiology to in vitro studies. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 1-29, 2020.
- DOEBEL, T.; VOISIN, B.; NAGAO, K. Langerhans Cells – The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 11, p. 817-828, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.06.008>>.
- DONG, Y. et al. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, n. 4, p. 1553-1558, 2004.
- DOS SANTOS-SILVA, C.; LUIZ RODRIGUES, A.; ELIZABETH BAKAL ROITBERG, S. a Case Report of Patient With Atopic Dermatitis: a Biopsychosocial Approach. **Psicologia, Saúde & Doença**, v. 18, n. 2, p. 389-400, 2017.
- DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 34-50, 2010.
- EI-BADRY, M. et al. Performance of poloxamer 407 as hydrophilic carrier on the binary mixtures with nimesulide. **Farmacia**, v. 61, n. 6, p. 1137-1150, 2013.
- EICHENFIELD, L. F. et al. Atopic Dermatitis: Epidemiology and Pathogenesis Update. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 31, n. 3 SUPPL., p. S3-S5, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sder.2012.07.002>>.
- EINFAL, T.; PLANINŠEK, O.; HROVAT, K. Methods of amorphization and investigation of the amorphous state. **Acta Pharmaceutica**, v. 63, n. 3, p. 305-334, 2013.
- ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M. R. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. **International journal of advanced research**, v. 4, n. 3, p. 411-427, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27819009>0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5094803>.
- ERIKSSON, M.; GOOSSENS, H.; PEIJS, T. Influence of drying procedure on glass transition temperature of PMMA based nanocomposites. **Nanocomposites**, v. 1, n. 1, p. 36-45, 2015.
- ÉVORA, A. S. et al. Corneocytes: Relationship between Structural and Biomechanical Properties. **Skin Pharmacology and Physiology**, p. 146-161, 2021.
- FARIA, M. E. et al. Biomarcadores na dermatite atópica. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 4, p. 342-348, 2017.
- FENG, D. et al. Polymer-surfactant system based amorphous solid dispersion: Precipitation inhibition and bioavailability enhancement of itraconazole. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1-15, 2018.
- FENG, P. et al. Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. February, 2021.

- FIOD RICCIO, B. V. et al. Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Trans-Resveratrol: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 339-358, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1637242>>.
- FLIEGER, J.; TATARCZAK-MICHALEWSKA, M.; BLICHARSKA, E. Characterization of the cis/trans Isomerization of Resveratrol by High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Letters**, v. 50, n. 2, p. 294-303, 2017.
- FLUHR, J. W.; BORNKESSEL, A.; BERARDESCA, E. Glycerol – just a moisturizer? biological and biophysical effects. **Dry Skin and Moisturizers: Chemistry and Function, Second Edition**, p. 227-243, 2005.
- FLUHR, J. W.; DARLENSKI, R.; SURBER, C. Glycerol and the skin: Holistic approach to its origin and functions. **British Journal of Dermatology**, v. 159, n. 1, p. 23-34, 2008.
- FRACARO, D.; AUGUSTO, L. Tratamento da dermatite atópica use of calcineurin inhibitors in the treatment of atopic dermatitis. **Saúde e Desenvolvimento**, v. 7, n. 4, p. 19-36, 2000. Disponível em: <<https://www.uninter.com/cadernosuninter/index.php/saude-e-desenvolvimento/article/view/426>>.
- FRANCIS, N. A. et al. Oral and topical antibiotics for clinically infected eczema in children: A pragmatic randomized controlled trial in ambulatory care. **Annals of Family Medicine**, v. 15, n. 2, p. 124-130, 2017.
- FRANCO, P.; DE MARCO, I. The use of poly(N-vinyl pyrrolidone) in the delivery of drugs: A review. **Polymers**, v. 12, n. 5, p. 18-21, 2020.
- FU, J.; YANG, F.; GUO, Z. The chitosan hydrogels: from structure to function. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 21, p. 17162-17180, 2018.
- FURMAN, D. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, v. 25, n. 12, p. 1822-1832, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>>.
- GALDEANO, M. C. et al. Influence of thickness on properties of plasticized oat starch films. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 637-644, 2013.
- GAO, Z. et al. Recent Developments in the Crystallization Process: Toward the Pharmaceutical Industry. **Engineering**, v. 3, n. 3, p. 343-353, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.022>>.
- GARALA, K. et al. Formulation and evaluation of periodontal in situ gel. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 3, n. 1, p. 29, 2013.
- GELDART, D.; ABDULLAH, E. C.; VERLINDEN, A. Characterisation of dry powders. **Powder Technology**, v. 190, n. 1-2, p. 70-74, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2008.04.089>>.
- GEOGHEGAN, J. A.; IRVINE, A. D.; FOSTER, T. J. Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 484-497, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.008>>.
- GHOSAL, K. et al. Electrospinning over Solvent Casting: Tuning of Mechanical Properties of Membranes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.
- GOHEL, M. C. et al. Spray drying: A review. **Pharmaceutical Reviews**, v. 7, n. 5, 2009.
- GRECO, G.; LETZEL, T. Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 7, p. 684-693, 2013.
- GRÉGOIRE, B. et al. Journal of Colloid and Interface Science Orientation measurements of clay minerals by polarized attenuated total reflection infrared spectroscopy. v. 567, p. 274-284, 2020.
- GRUBE, S.; SIEGMANN, K.; HIRAYAMA, M. A moisture-absorbing and abrasion-resistant transparent coating on polystyrene. **Journal of Coatings Technology and Research**, v. 12, n. 4, p. 669-680, 2015.
- GUMASTE, S. G.; GUPTA, S. S.; SERAJUDDIN, A. T. M. Investigation of Polymer-Surfactant and Polymer-Drug-Surfactant Miscibility for Solid Dispersion. **AAPS Journal**, v. 18, n. 5, p. 1131-1143, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1208/s12248-016-9939-5>>.
- GÜNGÖR, S.; ERDAL, M. S. Plasticizers in Transdermal Drug Delivery Systems. 2011.
- HA, E. S. et al. Enhanced oral bioavailability of resveratrol by using neutralized eudragit e solid dispersion prepared via spray drying. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2021.
- HA, P. T. et al. The synthesis of poly(lactide)-vitamin E TPGS (PLA-TPGS) copolymer and its utilization to formulate a curcumin nanocarrier. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 1, n. 1, 2010.
- HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitoooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science and**

- Technology**, v. 48, n. February, p. 40-50, 2016.
- HAMZAH, M. M. et al. Effect of Different Biological Membranes on In Vitro Bioadhesion Property. **Drug invention today**, v. 2, n. 51431, p. 155-159, 2010.
- HAO, J. et al. Preparation and Optimization of Resveratrol Nanosuspensions by Antisolvent Precipitation Using Box-Behnken Design. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 1, p. 118-128, 2014.
- HAO, R. et al. applied sciences A Miniaturized and Fast System for Thin Film Thickness Measurement. 2020.
- HIRAYAMA, D.; IIDA, T.; NAKASE, H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018.
- HOMEZ-JARA, A. et al. Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1233-1240, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.057>>.
- HON, K. L. et al. Emollient treatment of atopic dermatitis: latest evidence and clinical considerations. **Drugs in Context**, v. 7, p. 1-14, 2018.
- HUANG, X. et al. Resveratrol encapsulation in core-shell biopolymer nanoparticles: Impact on antioxidant and anticancer activities. **Food Hydrocolloids**, v. 64, n. μ M, p. 157-165, 2017.
- ISLAM, S.; BHUIYAN, M. A. R.; ISLAM, M. N. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 25, n. 3, p. 854-866, 2017.
- IVANOVA, N. et al. We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2016.
- JAMES, N. K. S. et al. Características Morfológicas De Microcápsulas Obtidas Por Spray Dryer: Efeito Da Temperatura E Da Vazão Do Ar. p. 2885-2888, 2018.
- JANG, H. H.; LEE, S. N. Epidermal Skin Barrier. **Asian Journal of Beauty and Cosmetology**, v. 14, n. 3, p. 339-347, 2016.
- JANI, R.; PATEL, D. Hot melt extrusion: An industrially feasible approach for casting orodispersible film. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 292-305, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2015.03.002>>.
- JEANDET, P. et al. Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14136-14170, 2013.
- JEONG, M. H. et al. In vitro model for predicting acute inhalation toxicity by using a Calu-3 epithelium cytotoxicity assay. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 98, n. July 2018, p. 106576, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.04.002>>.
- JIANG, J. et al. Porous film coating enabled by polyvinyl pyrrolidone (Pvp) for enhanced air permeability of fabrics: The effect of pvp molecule weight and dosage. **Polymers**, v. 12, n. 12, p. 1-21, 2020.
- KAMALAKKANNAN, V. et al. Solubility Enhancement of Poorly Soluble Drugs By Solid Dispersion Technique - Review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 9, p. 2314-2321, 2010.
- KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in inflammatory disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 1-31, 2019.
- KARAVAS, E.; GEORGARAKIS, E.; BIKIARIS, D. Adjusting drug release by using miscible polymer blends as effective drug carriers. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2006** **84:1**, v. 84, n. 1, p. 125-133, abr. 2006.
- KARKI, S. et al. Thin films as an emerging platform for drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 5, p. 559-574, 2016.
- KATHE, K.; KATHPALIA, H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 6, p. 487-497, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.004>>.
- KAUR, J. et al. Recent Advances in Topical Drug Delivery System. **Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 07, 2016.
- KAZEM, S.; LINSSEN, E. C.; GIBBS, S. Skin metabolism phase I and phase II enzymes in native and reconstructed human skin: a short review. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 9, p. 1899-1910, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.06.002>>.
- KHAN, W. S.; HAMADNEH, N. N.; KHAN, W. A. Prediction of thermal conductivity of polyvinylpyrrolidone (PVP) electrospun nanocomposite fibers using artificial neural network and prey-predator algorithm. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1-17, 2017.
- KHIMANI, M. et al. Self-assembly of stimuli-responsive block copolymers in aqueous solutions:

- an overview. **Polymer Bulletin**, v. 77, n. 11, p. 5783-5810, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00289-019-03046-w>>.
- KHOSHNOUD, M. J. et al. Effects of sodium benzoate, a commonly used food preservative, on learning, memory, and oxidative stress in brain of mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 2, 2018.
- KIM, J.; KIM, B. E.; LEUNG, D. Y. M. Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 40, n. 2, p. 84-92, 2019.
- KNAPIK-KOWALCZUK, J. et al. Enhancement of the physical stability of amorphous sildenafil in a binary mixture, with either a plasticizing or antiplasticizing compound. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 23-28, 2020.
- KOCZKUR, K. M. et al. Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 41, p. 17883-17905, 2015.
- KOZIARA, B. T. et al. The effects of water on the morphology and the swelling behavior of sulfonated poly(ether ether ketone) films. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 2, p. 1074-1082, 2016.
- KUHTZ-BUSCHBECK, J. P. et al. Thermoreception and nociception of the skin: a classic paper of Bessou and Perl and analyses of thermal sensitivity during a student laboratory exercise. p. 25-34, 2010.
- KUMAR, S. et al. A new chitosan-thymine conjugate: Synthesis, characterization and biological activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 493-502, 2012.
- KUMARI, S. et al. Physicochemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1697-1705, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.119>>.
- KURAKULA, M.; RAO, G. S. N. K. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information. n. January, 2020a.
- KURAKULA, M.; RAO, G. S. N. K. Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, n. September, p. 102046, 2020b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102046>>.
- KURŠVIETIENĖ, L. et al. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. **Medicina (Lithuania)**, v. 52, n. 3, p. 148-155, 2016.
- LACHAPPELLE, J. M.; MAROT, L. Histopathological and immunohistopathological features of irritant and allergic contact dermatitis. **Contact Dermatitis**, v. 0, p. 107-116, 2011.
- LAMOLHA, M. A.; SERRA, C. H. D. R. Evaluation of the flow and the dissolution of 50 mg hydrochlorothiazide tablets obtained by wet granulation. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 435-446, 2007.
- LANDSKRON, G. et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, 2014.
- LASKIN, D. L. et al. Macrophages and tissue injury: Agents of defense or destruction? **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 51, p. 267-288, 2011.
- LE, T. H. H.; PHUNG, T. H.; LE, D. C. Development and Validation of an HPLC Method for Simultaneous Assay of Potassium Guaiacolsulfonate and Sodium Benzoate in Pediatric Oral Powder. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2019, 2019.
- LEAL, A. S. et al. 2015 CIM - Corticóides tópicos. p. 2-3, 2015.
- LEE, J. Y. et al. Soluplus®/TPGSGS-based solid dispersions prepared by hot-melt extrusion equipped with twin-screw systems for enhancing oral bioavailability of valsartan. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 2745-2756, 2015.
- LEITE, R. M. S.; LEITE, A. A. C.; COSTA, I. M. C. Dermatite atópica: Uma doença cutânea ou uma doença sistêmica? A procura de respostas na história da dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 1, p. 71-78, 2007.
- LI, J. et al. Characterization and comparison of chitosan / PVP and chitosan / PEO blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 786-791, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.09.028>>.
- LI, N.; TAYLOR, L. S. Tailoring supersaturation from amorphous solid dispersions. v. 279, n. April, p. 114-125, 2018.
- LI, Q. et al. Interparticle van der Waals force in powder flowability and compactibility. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 77-93, 2004.
- LIM, K. M. Skin epidermis and barrier function. **International Journal of Molecular Sciences**,

v. 22, n. 6, p. 1-3, 2021.

LIMA, A. C. B.; NUNES, I. F. O. C. N. O Papel da Vitamina D na Dermatite Atópica TT - The Role of Vitamin D in Atopic Dermatitis. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**, v. 17, n. 4, p. 279-285, 2015.

LIMA, M. F. P. et al. Staphylococcus aureus E AS INFECÇÕES HOSPITALARES - REVISÃO DE LITERATURA. **Uningá**, v. 21, n. 1, p. 32-39, 2015. Disponível em: <<http://www.mastereditora.com.br/review>>.

LIN, Y.-C. et al. Electrospun Resveratrol-Loaded Polyvinylpyrrolidone/Cyclodextrin Nanofibers and Their Biomedical Applications. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 6, p. 1-16, jun. 2020.

LING, L.; GU, S.; CHENG, Y. Resveratrol inhibits adventitial fibroblast proliferation and induces cell apoptosis through the SIRT1 pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 2, p. 567-572, 2017.

LIU, H. et al. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. **RSC Advances**, v. 8, n. 14, p. 7533-7549, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C7RA13510F>>.

LOI, F. et al. Inflammation, Fracture and Bone Repair HHS Public Access. **Bone**, v. 86, p. 119-130, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4833637/pdf/nihms770705.pdf>>.

LOPES, D. M.; MCMAHON, S. B. Ultraviolet Radiation on the Skin: A Painful Experience? **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 118-126, 2016.

LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.; GARCÍA-CARMONA, F. Aggregation state and pKa values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7600-7605, 2008.

MA, B. L. et al. Polyethylene glycol 400 (PEG400) affects the systemic exposure of oral drugs based on multiple mechanisms: taking berberine as an example. **RSC Advances**, v. 7, n. 5, p. 2435-2442, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C6RA26284H>>.

MACCARIO, C. et al. The resveratrol analog 4,4'-dihydroxy-trans-stilbene suppresses transformation in normal mouse fibroblasts and inhibits proliferation and invasion of human breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 11, p. 2172-2180, 2012.

MAESTRELLI, F.; BRAGAGNI, M.; MURA, P. Advanced formulations for improving therapies with anti-inflammatory or anaesthetic drugs: A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 192-205, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2015.09.011>>.

MÁRCIA, C.; SILVA, D. R. DERMATITE ATÓPICA: REVISÃO DO MANEJO CLÍNICO. 2018.

MARINIELLO, L. et al. Swelling, mechanical, and barrier properties of albedo-based films prepared in the presence of phaseolin cross-linked or not by transglutaminase. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 9, p. 2394-2398, 2010.

MARINO-MARMOLEJO, E. N. et al. A quantitative model for dermal infection and oedema in BALB/c mice pinna. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0907-0>>.

MARSON, B. M. et al. VALIDATION of ANALYTICAL METHODS in A PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM: AN OVERVIEW FOCUSED on HPLC METHODS. **Química Nova**, v. 43, n. 8, p. 1190-1203, 2020.

MATSUI, T.; AMAGAI, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. **International Immunology**, v. 27, n. 6, p. 269-280, 2015.

MAXIMIANO, F. P. et al. Physicochemical characterization of antichagasic benzimidazole. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1714-1719, 2010.

MAYBA, J. N.; GOODERHAM, M. J. Review of atopic dermatitis and topical therapies. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 3, p. 227-236, 2017.

MCDOWELL, L.; OLIN, B. Crisaborole: A Novel Nonsteroidal Topical Treatment for Atopic Dermatitis. **Journal of Pharmacy Technology**, v. 35, n. 4, p. 172-178, 2019.

MCKECHNIE, D. et al. Glass transition temperature of a polymer thin film: Statistical and fitting uncertainties. **Polymer**, v. 195, n. April, p. 122433, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122433>>.

MENDONÇA, R. da S. C.; RODRIGUES, GERUZA, B. de O. Major dermatological changes in obese patients. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 24, n. 1, p. 68-73, 2011.

MENEGUIN, A. B. et al. **Resistant starch/pectin free-standing films reinforced with nanocellulose intended for colonic methotrexate release.** [s.l.] Elsevier Ltd., 2017. v. 157

MENG, X. et al. Pluronic F127 and D- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate (TPGS) Mixed Micelles for Targeting Drug Delivery across The Blood Brain Barrier. **Scientific Reports**,

v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

MERLIN, N.; LIMA, V. A.; SANTOS-TONIAL, L. M. Instrumental and experimental conditions for the application of fourier transform infrared analysis on soil and humic acid samples, combined with chemometrics tools and scanning electron microscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1920-1927, 2015.

MOHAMADI ZAHEDI, S.; MANSOURPANAH, Y. Construction of chitosan-carboxymethyl β -cyclodextrin silver nanocomposite hydrogel to improve antibacterial activity. **Plastics, Rubber and Composites**, v. 47, n. 6, p. 273-281, 2018.

MONDAL, D. et al. Effect of poly(vinyl pyrrolidone) on the morphology and physical properties of poly(vinyl alcohol)/sodium montmorillonite nanocomposite films. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 23, n. 6, p. 579-587, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnsc.2013.11.009>>.

MORAES, D. S. et al. Sirtuins, brain and cognition: A review of resveratrol effects. **IBRO Reports**, v. 9, n. June, p. 46-51, 2020.

MORE SWATI, K.; WANG, M. Review on Spray Drying Technology. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 4, n. 2, p. 219-225, 2014. Disponível em: <www.ijpcbs.com>.

MUKHERJEE, M. et al. Power law in swelling of ultra-thin polymer films. **Polymer**, v. 54, n. 17, p. 4669-4674, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2013.06.025>>.

MULLER, W. A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 7-22, 2013.

MUNAWIROH, Z. S.; LIPIPUN, V.; RITTHIDEJ, C. G. Optimization of Redispersible Spray Dried Powder of Chitosan Coated Solid Lipid-Based Nanosystems. **International Journal of Drug Delivery Technology**, v. 8, n. 01, p. 19-32, 2018.

MURAKAMI, I. et al. Metabolism of skin-absorbed resveratrol into its glucuronized form in mouse skin. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1-20, 2014.

MURALTER, F.; PERROTTA, A.; COCLITE, A. M. Thickness-Dependent Swelling Behavior of Vapor-Deposited Smart Polymer Thin Films. **Macromolecules**, v. 51, n. 23, p. 9692-9699, 2018.

MURDANDE, S. B. et al. Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals, part 3: Is maximum solubility advantage experimentally attainable and sustainable? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 10, p. 4349-4356, 2011.

N. MENGATTO, L.; M. HELBLING, I.; A. LUNA, J. Recent Advances in Chitosan Films for Controlled Release of Drugs. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 6, n. 2, p. 156-170, 2012.

NÉMETH, T.; SPERANDIO, M.; MÓCSAI, A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 4, p. 253-275, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41573-019-0054-z>>.

NG, K. W.; LAU, W. M. Skin deep: The basics of human skin structure and drug penetration. **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects**, p. 3-11, 2015.

NOWICKI, R. et al. Special paper Atopic dermatitis: current treatment guidelines. Statement of the experts of the Dermatological Section, Polish Society of Allergology, and the Allergology Section, Polish Society of Dermatology. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 4, p. 239-249, 2015.

OGUNJIMI, A. T.; FIEGEL, J.; BROGDEN, N. K. Design and characterization of spray-dried chitosan-naltrexone microspheres for microneedle-assisted transdermal delivery. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 6, 2020.

OLIVEIRA BARUD, H. G. et al. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 41-51, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.007>>.

ONOUÉ, S. et al. Development of inhalable nanocrystalline solid dispersion of Tranilast for airway inflammatory diseases. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 2, p. 622-633, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jps.22299>>.

ORAKPOGHENOR, O. et al. Lymphocytes: A Brief Review -. n. June, 2019.

OTHMAN, S. H. et al. Water sorption and water permeability properties of edible film made from potato peel waste. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 63-70, 2017.

PAGANO, C. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Bioadhesive polymeric films based on usnic acid for burn wound treatment: Antibacterial and cytotoxicity studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, n. March, p. 488-499, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.001>>.

PAMELA, V. Y. et al. Barrier and antimicrobial properties of PVA films incorporated with ZnO nanoparticles and stearic acid. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 195, n. 1, 2018.

PARK, S. et al. Layer-by-layer assembled polymeric thin films as prospective drug delivery carriers: Design and applications. **Biomaterials Research**, v. 22, p. 1-13, 2018.

PATEL, B. B. et al. **Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement**. [s.l.] King Saud University, 2015. v. 23

PATEL, D. D.; ANDERSON, B. D. Adsorption of Polyvinylpyrrolidone and its Impact on Maintenance of Aqueous Supersaturation of Indomethacin via Crystal Growth Inhibition. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 9, p. 2923-2933, 2015.

PATEL, H. R.; PATEL, R. P.; PATEL, M. M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 2, p. 299-303, 2009.

PATIL, K. R. et al. Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: Implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2019.

PATRA, J. K. et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects 10 Technology 1007 Nanotechnology 03 Chemical Sciences 0306 Physical Chemistry (incl. Structural) 03 Chemical Sciences 0303 Macromolecular and Materials Chemistry 11 Medical and He. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1-33, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>>.

PAUDEL, A. et al. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 253-284, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.015>>.

PEISER, M. et al. Allergic contact dermatitis: Epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 5, p. 763-781, 2012.

PELEG, M. Humidity Caking and Its Prevention. **Water Activity in Foods**, p. 453-464, 2020.

PENG, H. et al. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 23-28, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.085>>.

PERCIVAL, S. L. et al. Mode of action of poloxamer-based surfactants in wound care and efficacy on biofilms. **International Wound Journal**, v. 15, n. 5, p. 749-755, 2018.

PETERSEN, R. S. et al. Controlled drug release from biodegradable polymer matrix loaded in microcontainers using hot punching. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1-13, 2020.

PHAM, C. V.; CHO, C. W. Application of d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) in transdermal and topical drug delivery systems (TDDS). **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 47, n. 2, p. 111-121, 2017.

PIÉRARD, G. E. et al. From observational to analytical morphology of the stratum corneum: Progress avoiding hazardous animal and human testings. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 8, p. 113-125, 2015.

PIQUERO-CASALS, J. et al. The Role of Photoprotection in Optimizing the Treatment of Atopic Dermatitis. **Dermatology and Therapy**, v. 11, n. 2, p. 315-325, 2021.

PIVSA-ART, W. et al. The effect of poly(ethylene glycol) as plasticizer in blends of poly(lactic acid) and poly(butylene succinate). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 8, p. 1-10, 2016.

PLAETH, A. et al. Data of oxygen- and pH-dependent oxidation of resveratrol. **Data in Brief**, v. 9, p. 433-437, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.09.012>>.

PONGSAVEE, M. Effect of sodium benzoate preservative on micronucleus induction, chromosome break, and Ala40Thr superoxide dismutase gene mutation in lymphocytes. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

POONGUZHALI, R.; BASHA, S. K.; KUMARI, V. S. Synthesis and characterization of chitosan/poly (vinylpyrrolidone) biocomposite for biomedical application. **Polymer Bulletin**, v. 74, n. 6, p. 2185-2201, 2017.

PRADAL, J. Comparison of skin permeation and putative anti-inflammatory activity of commercially available topical products containing ibuprofen and diclofenac. **Journal of Pain Research**, v. 13, p. 2805-2814, 2020.

PRIMO, F. L. et al. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. **Journal of Magnetism and**

Magnetic Materials, v. 320, n. 14, p. 211-214, 2008.

PÜNNEL, L. C.; LUNTER, D. J. Film-Forming Systems for Dermal Drug Delivery. 2021.

PURI, V. et al. Wettability and surface chemistry of crystalline and amorphous forms of a poorly water soluble drug. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 84-93, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2010.03.003>>.

PYO, S. M.; MAIBACH, H. I. Skin Metabolism: Relevance of Skin Enzymes for Rational Drug Design. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 32, n. 5, p. 283-293, 2019.

QUISPE, C. A. G.; CORONADO, C. J. R.; CARVALHO, J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 475-493, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.017>>.

RAHMAN, M. et al. Spray-dried amorphous solid dispersions of griseofulvin in HPC/soluplus/SDS: Elucidating the multifaceted impact of SDS as a minor component. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, 2020.

RAMOS, J. M. O. et al. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 644-650, 2013.

RASOOL, B. K. A.; FAHMY, S. A.; GALEEL, O. W. A. Impact of Chitosan as a disintegrant on the bioavailability of furosemide tablets: In vitro evaluation and in vivo simulation of novel formulations. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 4, p. 815-822, 2012.

RAVAL, A.; PARIKH, J.; ENGINEER, C. MECHANISM OF CONTROLLED RELEASE KINETICS FROM MEDICAL DEVICES. v. 27, n. 02, p. 211-225, 2010.

RAY FOSTER, L. J. PEGylation and BioPEGylation of Polyhydroxyalkanoates: Synthesis, Characterisation and Applications. **Biopolymers**, n. September 2010, 2010.

RERKNIMITR, P. et al. The etiopathogenesis of atopic dermatitis: Barrier disruption, immunological derangement, and pruritus. **Inflammation and Regeneration**, v. 37, n. 1, p. 1-15, 2017.

RICCIO, B. V. F. et al. Resveratrol isoforms and conjugates: A review from biosynthesis in plants to elimination from the human body. n. July, p. 1-11, 2020.

RICCIO, B. V. F. et al. Chitosan/nanocellulose-based bionanocomposite films for controlled betamethasone and silver sulfadiazine delivery. **Journal of Applied Polymer Science**, n. December 2020, p. 1-13, 2021.

RIPPA, A. L.; KALABUSHEVA, E. P.; VOROTELYAK, E. A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 607, 2019.

RODERO, C. F. et al. Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 4491-4504, 2018.

ROMANOVSKY, A. A. Skin temperature: Its role in thermoregulation. **Acta Physiologica**, v. 210, n. 3, p. 498-507, 2014.

RUELA, A. L. M. et al. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 527-544, 2016.

RUIVO, J. et al. The main potentialities of resveratrol for drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 3, p. 499-514, 2015.

SAHLE, F. F.; BODO, G.; WOHLRAB, J. Skin Diseases Associated with the Depletion of Stratum Corneum Lipids and Stratum Corneum Lipid Substitution Therapy. p. 42-55, 2015.

SALATINO, A.; SALATINO, M.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SALEHI, B. et al. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. **Biomedicines**, v. 6, n. 3, p. 91, 2018.

SALUJA, H. et al. Hydrogen bonding: Between strengthening the crystal packing and improving solubility of three haloperidol derivatives. **Molecules**, v. 21, n. 6, 2016.

SANDOVAL, M. H. L.; CAIXETA, C. M.; RIBEIRO, N. M. Avaliação in vivo e in vitro da eficácia de um produto com associação de vitamina C, ácido hialurônico fragmentado e manose na prevenção do envelhecimento cutâneo. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 1, p. 37-44, 2015.

SANGEETHA, E.; NARAYANAN, A.; DHAMODHARAN, R. Super water-absorbing hydrogel based on chitosan, itaconic acid and urea: preparation, characterization and reversible water absorption. **Polymer Bulletin**, n. 0123456789, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00289-021-03641-w>>.

SANT', F. A.; ADDOR, A.; AOKI, V. Barreira cutânea na dermatite atópica Skin barrier in atopic

- dermatitis. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 2, p. 184-94, 2010.
- SANTANA, A. A.; KIECKBUSCH, T. G. Physical evaluation of biodegradable films of calcium alginate plasticized with polyols. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 4, p. 835-845, 2013.
- SAQUIB HASNAIN, M.; NAYAK, A. K. Solubility and dissolution enhancement of ibuprofen by solid dispersion technique using peg 6000-PVP K 30 combination carrier. **Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 118-132, 2012.
- SATHIYASEELAN, A. et al. Preparation of Nanocomposite Based Film from Fungal Chitosan and Its Applications. **International Journal of Innovative Research in Science and Engineering**, v. 2347, n. 3207, p. 1-9, 2014.
- SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **ISRN Pharmaceuticals**, v. 2012, n. 100 mL, p. 1-10, 2012.
- SCHALKA, S. et al. Composto nutracêutico aumenta a síntese de colágeno, elastina e ácido hialurônico. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 9, n. 1, p. 46-50, 2017.
- SCHRAM, C. J.; BEAUDOIN, S. P.; TAYLOR, L. S. Impact of polymer conformation on the crystal growth inhibition of a poorly water-soluble drug in aqueous solution. **Langmuir**, v. 31, n. 1, p. 171-179, 2015.
- SCHREYER, E.; PALZER, S. Caking of powder mixtures of crystalline and amorphous solids. **Technology**, n. July 2007, p. 34-37, 2007. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/266466510>>.
- SCHROEDER, I. Z. et al. Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. v. 65, p. 111-121, 2007.
- SEBAALY, C. et al. Chitosan-coating effect on the characteristics of liposomes: A focus on bioactive compounds and essential oils: A review. **Processes**, v. 9, n. 3, p. 1-47, 2021.
- SENRA, M. S.; WOLLENBERG, A. Psychodermatological aspects of atopic dermatitis. **British Journal of Dermatology**, v. 170, n. SUPPL. 1, p. 38-43, 2014.
- SERAFIM, M. C. et al. A utilização da forma farmacêutica transdérmica como possibilidade terapêutica na medicina antroposófica. v. 33, n. 4, p. 153-159, 2013.
- SHAITO, A. et al. Potential adverse effects of resveratrol: A literature review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, 2020.
- SHEPARD, K. B. et al. Solvent-Assisted Secondary Drying of Spray-Dried Polymers. **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 8, 2020.
- SHEU, S. Y. et al. Biological characterization of oxidized hyaluronic acid/resveratrol hydrogel for cartilage tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101, n. 12, p. 3457-3466, 2013.
- SHIOHARA, A.; PRIETO-SIMON, B.; VOELCKER, N. H. Porous polymeric membranes: fabrication techniques and biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 9, p. 2129-2154, 2021.
- SIEMANN, U. Solvent cast technology - A versatile tool for thin film production. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 130, n. June, p. 1-14, 2005.
- SILVA, C. G. et al. Photochemical and photocatalytic degradation of trans-resveratrol. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 12, n. 4, p. 638-644, 2013.
- SILVA, R. de C. da et al. Resveratrol: A thermoanalytical study. **Food Chemistry**, v. 237, n. May, p. 561-565, 2017.
- SINGH, A.; MOOTER, G. Van Den. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. 2015.
- SINGH, A.; MOOTER, G. Van Den. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 100, p. 27-50, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.010>>.
- SIZILIO, R. H. et al. Chitosan/pvp-based mucoadhesive membranes as a promising delivery system of betamethasone-17-valerate for aphthous stomatitis. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, n. November 2017, p. 339-345, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.079>>.
- SM, K. et al. review article TRIGGERS IN ATOPIC DERMATITIS / ECZEMA: SEPARATING FACT FROM. v. 27, n. 2, p. 75-80, 2014.
- SOHAIL, K. et al. Ph-sensitive polyvinylpyrrolidone-acrylic acid hydrogels: Impact of material parameters on swelling and drug release. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 173-184, 2014.
- SONG, W. et al. Chitosan capsules with hydrogel core for encapsulation and controlled-release of small molecule materials. **Materials Letters**, v. 278, p. 128348, 2020. Disponível em:

- <<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.128348>>.
- SPENCE, K. L. et al. Water vapor barrier properties of coated and filled microfibrillated cellulose composite films. **BioResources**, v. 6, n. 4, p. 4370-4388, 2011.
- STANKOV, S. V. Definition of Inflammation , Causes of Inflammation and Possible Anti-inflammatory Strategies. p. 1-9, 2012.
- STEINHOFF, M. et al. Role of vasculature in atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 1, p. 190-197, 2006.
- SUGIBAYASHI, K. **Skin permeation and disposition of therapeutic and cosmeceutical compounds**. [s.l: s.n.]
- SZYMAŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1819-1846, 2015.
- TAMBOSI, G. et al. Challenges to improve the biopharmaceutical properties of poorly water-soluble drugs and the application of the solid dispersion technology. 2018.
- TAO, L. et al. Resveratrol attenuates neuropathic pain through balancing pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines release in mice. **International Immunopharmacology**, v. 34, p. 165-172, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.02.033>>.
- TAVARES LUIZ, M. et al. The use of TPGS in drug delivery systems to overcome biological barriers. **European Polymer Journal**, v. 142, n. August, p. 110129, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110129>>.
- TAYLOR, L. S.; BRAUN, D. E.; STEED, J. W. Crystals and Crystallization in Drug Delivery Design. **Crystal Growth and Design**, v. 21, n. 3, p. 1375-1377, 2021.
- TEODORESCU, M.; BERCEA, M. Poly(vinylpyrrolidone) - A Versatile Polymer for Biomedical and Beyond Medical Applications. **Polymer - Plastics Technology and Engineering**, v. 54, n. 9, p. 923-943, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03602559.2014.979506>>.
- TERESHCHENKO, A. G. Deliquescence: Hygroscopicity of Water-Soluble Crystalline Solids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 11, p. 3639-3652, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jps.24589>>.
- TINGTING, P. et al. Nanoporous mannitol carrier prepared by non-organic solvent spray drying technique to enhance the aerosolization performance for dry powder inhalation. **Scientific Reports**, v. 7, n. May, p. 1-11, 2017.
- TIYABOONCHAI, W. Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51-66, 2003.
- TODO, H. Transdermal permeation of drugs in various animal species. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 3, p. 1-11, 2017.
- TRAN, T. T. D.; TRAN, P. H. L. Controlled release film forming systems in drug delivery: The potential for efficient drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 6, p. 1-16, 2019.
- TURAN, D. Water Vapor Transport Properties of Polyurethane Films for Packaging of Respiring Foods. **Food Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 54-65, 2021.
- URANTA, K. G. et al. Application of polymer integration technique for enhancing polyacrylamide (PAM) performance in high temperature and high salinity reservoirs. **Heliyon**, v. 5, n. 7, p. e02113, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02113>>.
- URIBE-QUERO, E.; ROSALES, C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, p. 1-23, 2017.
- VADIYAR, M. M. et al. Contact angle measurements: A preliminary diagnostic tool for evaluating the performance of ZnFe₂O₄ nano-flake based supercapacitors. **Chemical Communications**, v. 52, n. 12, p. 2557-2560, 2016.
- VAN SMEDEN, J. et al. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 3, p. 295-313, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.006>>.
- VELASCO, M. V. R. et al. Active ingredients, mechanisms of action and efficacy tests antipollution cosmetic and personal care products. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. Special Issue, 2018.
- VOGL, J.; OSTERMANN, M. On the measurement of the moisture content in different matrix materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, n. 7, p. 356-362, 2006.
- VORONOVA, M. et al. Preparation and characterization of polyvinylpyrrolidone/cellulose nanocrystals composites. **Nanomaterials**, v. 8, n. 12, 2018.
- WANG, C. et al. **Molecular, Solid-State and Surface Structures of the Conformational Polymorphic Forms of Ritonavir in Relation to their Physicochemical Properties**. **Pharmaceutical Research**, v. ASAP, 2021.
- WELLER, P. F.; SPENCER, L. A. Functions of tissue-resident eosinophils. **Nature Reviews**

- Immunology**, v. 17, n. 12, p. 746-760, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.95>>.
- WESOLOWSKI, M.; ROJEK, B. Thermogravimetric detection of incompatibilities between atenolol and excipients using multivariate techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 1, p. 169-177, 2013.
- WILSON, V. R. et al. Amorphous solid dispersions of enzalutamide and novel polysaccharide derivatives: investigation of relationships between polymer structure and performance. **Scientific Reports**, p. 1-12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75077-7>>.
- YAHFOUFI, N. et al. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1-23, 2018.
- YANG, C. et al. Recent advances in the application of vitamin E TPGS for drug delivery. **Theranostics**, v. 8, n. 2, p. 464-485, 2018.
- YOUSEF, H.; SHARMA, S. Anatomy , Skin (Integument), Epidermis. n. December, 2017.
- YU, J. et al. Binding interaction of sodium benzoate food additive with bovine serum albumin: Multi-spectroscopy and molecular docking studies. **BMC Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 1-8, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13065-019-0615-6>>.
- ZACHARY, J. F. C H A P T E R 4 Mechanisms of Microbial Infections 1. n. January, 2020.
- ZHANG, J. et al. Extraction of polydatin and resveratrol from Polygonum cuspidatum root: Kinetics and modeling. **Food and Bioproducts Processing**, n. 76, p. 1-7, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.07.011>>.
- ZHANG, X. et al. Pharmaceutical dispersion techniques for dissolution and bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, 2018.
- ZHANG, Z.; TAN, S.; FENG, S. S. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4889-4906, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.046>>.
- ZHAO, Y. et al. Photo-induced chemical reaction of trans-resveratrol. **Food Chemistry**, v. 171, p. 137-143, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.130>>.
- ZHAO, Y. et al. Efficacy of thermosensitive chitosan/ β -glycerophosphate hydrogel loaded with β -cyclodextrin-curcumin for the treatment of cutaneous wound infection in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 2, p. 1304-1313, 2018.
- ZHONG, L. et al. Dissolution properties and physical characterization of telmisartan-chitosan solid dispersions prepared by mechanochemical activation. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 2, p. 541-550, 2013.
- ZHOU, Z. et al. Resveratrol cocrystals with enhanced solubility and tabletability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 509, n. 1-2, p. 391-399, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.006>>.
- ZUPANČIČ, Š.; LAVRIČ, Z.; KRISTL, J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 196-204, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.04.002>>.

APÊNDICE A – VALIDAÇÃO ANALÍTICA EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para a quantificação do *trans*-resveratrol nas dispersões sólidas, desenvolveu-se e validou-se um método analítico para sua quantificação. O método foi validado de acordo com a RE 166/2017, a ISO 17025 do Inmetro e o ICH (2010). O equipamento utilizado foi o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Waters® Alliance HPLC com detector PDA (Photodiode Array Waters) acoplado. A coluna cromatográfica utilizada foi a C18 Agilent Eclipse® Plus (4,6 mm x 250 mm e 5 µm) e a fase móvel foi composta de acetonitrila e solução aquosa contendo água purificada e ácido acético 2% na proporção de 65:35, respectivamente. As condições cromatográficas (Tabela A.1) foram: fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 5 µL; tempo de corrida de 10 minutos; e temperatura de 25 °C. As soluções padrão e amostras foram diluídas em acetonitrila (grau HPLC) obtendo-se a concentração teórica de 14 µg/mL enquanto que a solução amostra foi preparada a partir da pesagem de 100 mg de dispersão sólida contendo 10% de *trans*-resveratrol e diluídas em balão volumétrico âmbar de 25 mL. Assim, foram obtidas soluções amostras com *trans*-resveratrol nas concentrações de aproximadamente 14 µg/mL. Antes das injeções, as soluções foram filtradas com filtro de seringa PTFE Analítica® 0,45 µm sendo transferidas para vials âmbar.

Para garantir que a metodologia analítica desenvolvida fosse capaz de gerar resultados confiáveis e reprodutivos foram avaliados os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção, bem como o a robustez.

Tabela A.1: Condições utilizadas para a validação do método analítico em CLAE.

Condições da metodologia validada	
Equipamento	Waters® Alliance HPLC
Detector	Photodiode array Waters®
Coluna cromatográfica	C18 Agilent Eclipse® Plus (4,6 mm x 250 mm e 5 µm)
Composição da fase móvel	35:65 de água com ácido acético 2% :acetonitrila (v/v)
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	5 µL
Tempo de corrida	10 minutos
Temperatura	25 °C

1.A. LINEARIDADE

Para a linearidade foram preparadas 7 soluções padrão de *trans-resveratrol* e analisadas em triplicata em diferentes concentrações finais práticas (Tabela 2.A). Avaliou-se a relação linear e os resultados foram tratados pelo coeficiente de variação em relação ao fator de resposta de cada concentração.

Tabela 2.A: Concentrações finais práticas das 7 soluções padrão preparadas.

Soluções padrão	Concentrações práticas (µg/mL)
1	8
2	10
3	12
4	14
5	16
6	18
7	20

O desvio padrão relativo foi calculado utilizando-se a Equação 1.A:

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{M}) \times 100$$

Equação 1.A: Desvio padrão relativo da linearidade.

Na qual:

DPR = desvio padrão relativo (%);

DP = desvio padrão do fator de resposta;

M = média do fator de resposta.

2.A. ESPECIFICIDADE

Foi avaliada a influência dos demais componentes da formulação sem o *trans-resveratrol*, da fase móvel e do diluente (acetonitrila) na quantificação do *trans-resveratrol*. Pesou-se 1,0 g de cada formulação base (sem princípio ativo) sendo diluído em balão volumétrico âmbar de 100 mL, para então avaliar se haveria alguma interferência do placebo no pico de interesse.

3.A. PRECISÃO

A precisão foi dividida em dois ensaios distintos, sendo eles a repetibilidade e a precisão intermediária.

3.1.A. REPETIBILIDADE

De acordo com a RE 166/2017 (BRASIL, 2017), a repetibilidade do método pode ser verificada com no mínimo 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, sendo 3 concentrações (baixa, média e alta) em triplicata ou então num mínimo de 6 determinações a 100% da concentração teste. A avaliação intra-corrída (repetibilidade) foi realizada utilizando-se as formulações contendo *trans-resveratrol* contendo a concentração final de 14 µg/mL. A análise foi feita em sextuplicata no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista.

3.2.A. PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

A precisão intercorrida (intermediária) foi realizada do mesmo modo e sob as mesmas condições que a precisão por repetibilidade, mas com analistas diferentes em dias diferentes. Sendo assim, foi analisada a concordância entre os resultados através do coeficiente de variação.

4.A. EXATIDÃO

A exatidão foi determinada pela recuperação do princípio ativo nas matrizes (dispersões sólidas) nas amostras DS-1:3-PX1 (0,1 g de fármaco, 0,9 de polímero e 0,1 g de Poloxamer®) e DS-1:3-TPGS1 (0,1 g de fármaco, 0,9 g de polímero e 0,1 g de TPGS) por serem as com menor proporção de fármaco em sua constituição. Para isso, foram utilizadas as formulações contendo *trans*-resveratrol nas concentrações de 8, 14; e 20 µg/mL. A análise foi feita em triplicata e a exatidão foi expressa pela percentagem de princípio ativo nas formulações.

5.A. LIMITES DE DETECÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

Para o limite de detecção, uma amostra foi pesada (10,04 µg), transferida para balão volumétrico de 25 mL e diluída com acetonitrila. Foram transferidos 350 µL para balão volumétrico de 10 mL, filtradas e colocadas em vials âmbar para serem lidas em corrida cromatográfica sucessivamente até haver uma diluição onde o pico referente ao *trans*-resveratrol (com tempo de retenção de 4,55 min) não pudesse mais ser observado. O limite de quantificação teórico foi calculado através da Equação 2.A:

$$LQ = \frac{10 \times DP}{B}$$

Equação 2.A: Limite de quantificação.

Onde:

DP: desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas (y) de pelo menos 3 curvas de calibração contruídas contendo as concentrações do *trans*-resveratrol próximas ao limite de quantificação observado;

B: inclinação da curva analítica.

6.A. ROBUSTEZ

A robustez foi avaliada de acordo com o teste proposto por Youden e Steiner, sendo então preparadas 8 soluções independentes de acordo com as condições nas Tabelas 3.A e 4.A. As condições normais são representadas com letras maiúsculas, enquanto que as variações são representadas pelas letras minúsculas. Após o preparo, as soluções foram injetadas no CLAE para haver a determinação de suas áreas.

Tabela 3.A: Variáveis empregadas no ensaio de robustez.

Variáveis	
Comprimento de onda (nm)	307 (A) 309 (a)
Temperatura do forno (°C)	25 (B) 27,5 (b)
Método de dissolução em acetonitrila	Agitação por inversão(C) Agitação em vórtex (c)
Fluxo (mL/min)	1,0 (D) 0,9 (d)
Coluna cromatográfica	Eclipse® Agilent (E) Zorbax® Agilent (e)
pH da fase móvel	3.06 (2% ácido acético) (F) 3.14 (1.7% ácido acético) (f)
Composição da fase móvel (acetonitrila:solução aquosa 2% de ácido acético v/v)	35:65 (G) 33:67 (g)

Tabela 4.A: Planejamento das condições de análise do ensaio de robustez.

Variáveis	Condições experimentais							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	C	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
F, f	F	f	f	F	F	f	f	F
G, g	G	g	g	G	g	G	G	g

7.A. ENSAIO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

O ensaio de degradação forçada do *trans*-resveratrol se deu em diferentes condições sendo as seguintes: em solução de 1% de HCl, solução de 1% de NaOH, solução com 3% de H₂O₂ e em água sendo esta última colocada em câmara com luz. Todas as soluções foram diluídas pesando-se o equivalente a 10 mg de fármaco com as soluções mencionadas sendo mantidas nessas condições. Ao final do experimento as soluções foram diluídas com acetonitrila primeiramente em balão volumétrico de 25 mL e em seguida foram coletados 35 µL de cada uma e colocados em balões volumétricos de 10 mL sendo completados novamente com acetonitrila. Após isso, as diluições foram filtradas com seringa e filtro de seringa PTFE 0,45 µm em vials e lidas pela metodologia validada na CLAE. Todas as condições foram avaliadas em triplicata.

APÊNDICE B – RESULTADOS DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA EM CLAE

O desenvolvimento de uma metodologia analítica é necessário para que a análise se adeque à necessidade e que seja otimizada a fim de se conseguir os resultados com alto nível de confiabilidade e reprodutividade. Sendo assim, parâmetros tais como a escolha da fase móvel, o comprimento de onda, a temperatura, o fluxo e o tipo de coluna cromatográfica devem ser pré-estabelecidos para garantir a eficiência das análises (EMEA, 2006).

1.B. LINEARIDADE

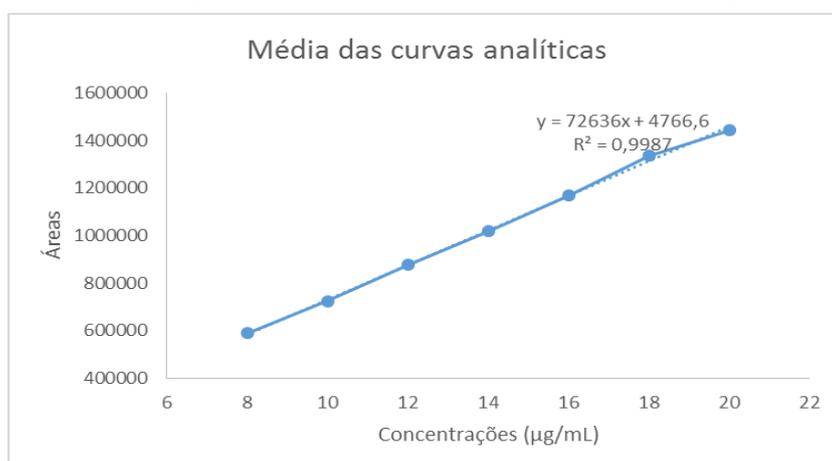
Foram obtidas três curvas analíticas que variaram de 8 a 20 µg/mL, sendo obtidas a partir da junção dos ajustes do coeficiente de regressão linear dessas três curvas, sendo este $r^2=0,9987$.

Os dados referentes à curva analítica estão dispostos na Tabela 1.B e a curva obtida pode ser visualizada na Figura 1.B.

Tabela 1.B: Áreas obtidas utilizadas para a construção das curvas analíticas da linearidade do método.

Concentração (µg/mL)	8	10	12	14	16	18	20
Curva 1	7,60	9,93	11,73	14,20	15,15	18,33	19,99
Curva 2	7,60	9,98	12,44	13,85	16,65	18,24	19,63
Curva 3	8,95	9,83	11,83	13,80	16,19	18,33	19,76
Média	8,05	9,91	12,00	13,95	16,00	18,30	19,79
Desvio padrão	0,78	0,08	0,38	0,22	0,77	0,05	0,19
Coefficiente de variação	0,097	0,008	0,032	0,016	0,048	0,003	0,009
Módulo	0,05	-0,09	0	-0,05	0	0,3	-0,21

Figura 1.B: Média das curvas analíticas e equação da reta obtida.

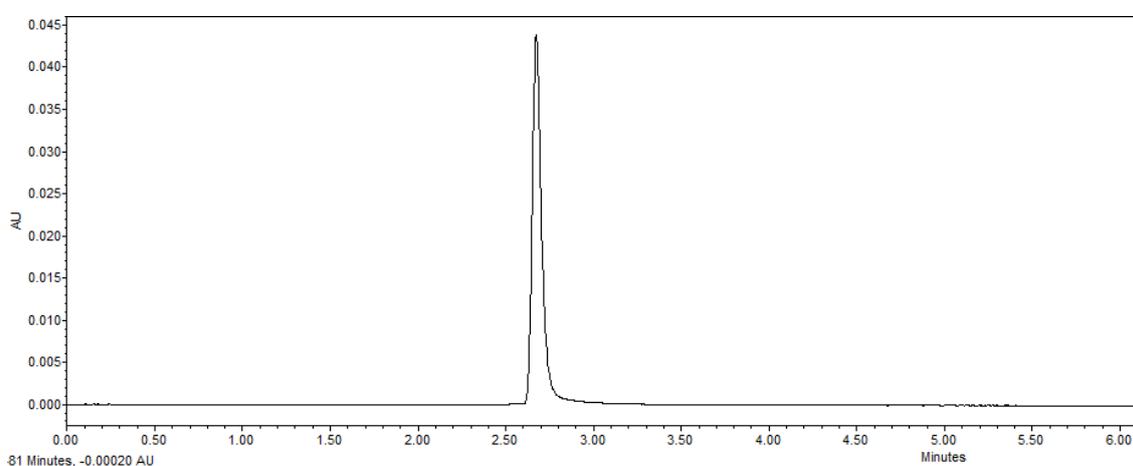


Segundo preconizado pela ANVISA, o coeficiente de regressão linear deve ser igual ou superior a 0,99, o que significa que o valor do r^2 da metodologia validada obedece os limites estabelecidos, significando que a área encontrada do pico referente ao *trans*-resveratrol no cromatograma se correlaciona com a concentração deste no analito (MARSON et al., 2020).

É possível observar que as análises obtiveram resultados com concentrações muito próximos da concentração teórica calculada, bem como desvios padrões baixos, demonstrando que o método tem boa linearidade.

O cromatograma típico da validação analítica possui apenas um pico observável, sendo este bem definido, possuindo alta intensidade. O tempo de retenção médio foi de 2,55 min (Figura 2.B).

Figura 2.B: Cromatograma típico para as análises de *trans*-resveratrol.



2.B. PRECISÃO E EXATIDÃO (INTERMEDIÁRIA E REPETIBILIDADE)

Os resultados para a precisão e exatidão estão dispostos nas Tabelas 2.B, 3.B e 4.B sendo relacionadas às análises intra e inter-dia, respectivamente.

Tabela 2.B: Precisão do método analítico.

Precisão			
Tipo de análise	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Média das concentrações obtidas ($\mu\text{g/mL}$)	DPR FR
Intra-dia	14	14,0280	2,07
Inter-dia	14	14,0140	2,43

Tabela 3.B: Exatidão do método analítico utilizando a formulação DS-1:9-PX1.

Concentração teórica (µg/mL)	Exatidão	
	Média das concentrações obtidas (µg/mL)	Médias da taxa de recuperação (%)
8	7,97	99,94
14	14,15	100,78
20	20,00	99,73
r ² obtido	0,9968	

Tabela 4.B: exatidão do método analítico utilizando a formulação DS-1:9-TPGS1.

Concentração teórica (µg/mL)	Exatidão	
	Média das concentrações obtidas (µg/mL)	Médias da taxa de recuperação (%)
8	7,94	98,73
14	14,27	101,45
20	20,00	99,49
r ² obtido	0,9976	

Conforme consta na RDC 166 de 2017, em cada ensaio foi necessário a utilização de 6 analitos independentes (sem qualquer etapa de preparo em conjunto) para que não houvesse o comprometimento da confiabilidade do ensaio, uma vez que o analito se tratou de amostras sólidas. Os resultados demonstraram que a metodologia possui boas precisões nos ensaios, obtendo um desvio padrão relativo de 2,07 no ensaio intra-dia e 2,43 no ensaio inter-dia. Segundo a RDC nº 889 de 29 de maio de 2003, o ideal para essas análises é que o DPR seja menor que 5% para fármacos puros, o que demonstra que a precisão também está dentro do preconizado, garantindo que os valores quantificados são de fato próximos aos reais (ARAUJO, 2009).

Para a exatidão foram escolhidas as formulações DS-1:9-PX1 e DS-1:9-TPGS1, ambas contendo fármaco em menor quantidade, enquanto que quitosana e adjuvante farmacêutico em maiores quantidades (variando apenas que uma tem poloxamer e a outra TPGS, respectivamente), uma vez que esses possuem maior quantidade de interferentes que podem dificultar a quantificação apropriada do *trans-resveratrol*.

De acordo com a ANVISA, as percentagens de coeficiente de variação e de exatidão não devem ultrapassar os 5%, sendo então possível observar que os valores foram adequados, uma vez que todos os resultados de recuperação do fármaco no ensaio de exatidão ficaram na faixa entre 95 e 105%.

3.B. ESPECIFICIDADE

O ensaio de especificidade é utilizado para avaliar se durante a corrida, não ocorrerá a identificação equivocada dos demais componentes da matriz do analito sem ser a substância de interesse, uma vez que esses compostos são interferentes na análise. Ela também avalia o grau de interferência de outras substâncias, tais como as impurezas e os produtos de degradação (LE; PHUNG; LE, 2019).

O método apresentou boa especificidade, uma vez que sob as condições validadas não houve aparecimento de picos nas análises da fase móvel nem

dos demais componentes das dispersões sólidas. Sendo assim, o método é seletivo para a quantificação de *trans-resveratrol* nas dispersões sólidas desenvolvidas.

4.B. SENSIBILIDADE

Definida pelos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). O LD é a menor concentração na qual o analito pode ser detectado pela metodologia desenvolvida, enquanto que o LQ é a menor concentração capaz de ser quantificada com precisão e exatidão.

O LD se deu através de diluições seriadas da amostra até o momento em que houve a ausência de pico bem definido no cromatograma, o que foi na diluição de concentração prática de 0,0004 µg/mL.

O LQ, por sua vez, foi calculado com base no valor obtido de LQ, e em seu desvio padrão, gerando o valor de 0,5701 µg/mL.

5.B. ROBUSTEZ

A robustez é definida como a capacidade de um método resistir a variações pequenas e aleatórias das condições durante a análise sem haver alterações significativas na precisão e exatidão dos resultados gerados, sem com isso perder a confiabilidade dos resultados (CÉSAR; PIANETTI, 2009). Os valores para o teor de fármacos e percentagens recuperadas se encontram na Tabela 5.B.

Tabela 5.B: Teor de fármaco e percentagem de recuperação.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8
Teor (µg/mL)	14,04	14,01	14,03	14,01	14,03	14,01	14,03	14,01
Recuperação (%)	1,36	1,56	0,65	5,34	8,78	3,28	6,05	7,74

Após analisar as percentagens de recuperação para cada ensaio, foi feita uma análise de comparação de grupos, onde se avaliou o impacto de cada parâmetro (Tabela 6.B). Para isso, foram feitas as médias de todos os ensaios que continham determinada condição validada (letras maiúsculas) e esse valor foi dividido pela média dos valores obtidos em ensaios que continham o parâmetro correspondente alterado (letras minúsculas), quanto maior o valor obtido, maior o impacto na tendência na perda de precisão e exatidão nas análises.

Tabela 6.B: Avaliação do impacto de cada parâmetro da robustez.

Efeitos dos parâmetros analisados	
Efeito A/a	1,51
Efeito B/b	0,45
Efeito C/c	3,98
Efeito D/d	4,59
Efeito E/e	7,07
Efeito F/f	12,83
Efeito G/g	1,43

Sendo assim, é possível perceber que o fator que menos influencia na perda de precisão e exatidão da metodologia é a temperatura do forno de aquecimento da coluna cromatográfica (parâmetro letra B ou b) com um efeito calculado de 0,45, enquanto que o fator mais sensível à variações é o pH (ou quantidade de ácido acético presente na fase móvel; representado pela letra F ou f) com efeito calculado de 12,83.

O efeito da composição da fase móvel pode surtir efeito na análise pois uma maior quantidade de ácido acético pode ter maior afinidade à quitosana presente nas formulações, gerando um arraste mais rápido e diminuindo o tempo de passagem da formulação pela coluna cromatográfica (GRECO; LETZEL, 2013) e por isso causar alterações importantes na leitura da área do pico de *trans*-resveratrol uma vez que este pode estar associado à quitosana através de interações químicas, fazendo com que o fármaco também seja arrastado mais rápido e possua alterações na precisão e exatidão de sua concentração.

Outro fator com alto impacto é o E/e (lote da coluna cromatográfica), que gerou um impacto de 7,07. Isso pode ocorrer devido à composição e síntese química do conteúdo presente no interior das colunas, bem como devido ao empacotamento desse conteúdo, que quanto mais compacto, mais demorada será a identificação do pico. Outro fator interessante de ser mencionado é que a coluna utilizada na validação analítica (Zorbax®) não havia sido utilizada anteriormente para nenhum tipo de análise, enquanto que a Eclipse® já havia sido utilizada para análise de outros fármacos, tais como a curcumina. O uso de diversos fármacos e fases móveis (incluindo a troca de fase móvel, quando há traços da fase móvel anterior que é imiscível com a nova) pode com o passar do tempo gerar pequenas variações na eficiência da coluna (PHENOMENEX, 2008), o que poderia explicar o porquê foi observada essa diferença.

6.B. ENSAIO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

O ensaio de estresse avaliou o comportamento do *trans*-resveratrol frente a diversos fatores durante 3 horas para avaliar a quais ele está mais vulnerável à degradação. Todas as amostras ficaram em contato com 1 mL de cada reagente e após esse período foram diluídas afim de se ter a concentração teórica de 14 µg/mL. Sendo assim, a Tabela 7.B descreve qual a concentração real e a percentagem de recuperação do fármaco após cada análise.

Tabela 7.B: Concentrações e percentagens de recuperação do *trans*-resveratrol para cada análise estudada.

Reagentes	Média das concentrações (µg/mL)	% recuperação
HCl 1M	12,73±0,49	90,95±3,49
NaOH 1M	0,21±0,03	1,47±0,23
H ₂ O ₂	13,14±0,38	93,83±2,72
Luz	13,00±0,56	92,89±3,97

Com isso, é possível notar que o *trans*-resveratrol possui susceptibilidade a todos os parâmetros testados, em maior ou menor grau. Existem estudos que mostram que este é um fármaco fotossensível, tendo uma cinética de fotodegradação próxima a de primeira ordem, variando de acordo com

diferentes comprimentos de onda no espectro visível (e também no espectro do UV, onde a degradação é ainda mais rápida), onde este passa do seu isômero *trans* (biologicamente ativo) para o *cis*, perdendo principalmente potencia e a maioria de seus efeitos (SILVA et al., 2013).

Quanto a reação com o H_2O_2 , este libera moléculas de O_2 que podem reagir com o composto em análise e tendo o *trans-resveratrol* atividade antioxidante, este é facilmente degradado sendo então oxidado resultando em seus radicais hidroxila e/ou 4'-fenoxila (PLAUTH et al., 2016), perdendo então suas características biológicas, apesar deste ter sido o fator menos impactante dentre os estudados.

Ao entrar em contato com o HCl 1M, também houve uma degradação moderada, é interessante mencionar que segundo o estudo de Zupancic, Lavric e Kristl (2015), o *trans-resveratrol* em pH ácido sofre degradação cinética de primeira ordem com alto nível de coeficiente de correlação ($r^2=0,99$). Isso pode ser explicado de acordo com a própria estrutura química do fármaco. Uma vez que seus grupos hidroxila estão predominantemente protonados e podem proteger a molécula da oxidação em meio contendo íons H_3O^+ gerando assim uma menor perda de seu teor.

Quanto ao que diz respeito ao ensaio utilizando NaOH 1M, é importante notar que também segundo Zupancic, Lavric e Kristl, (2015), o *trans-resveratrol* em soluções com o pH a partir de 6,8 sofre um aumento significativo em sua degradação, sendo esta uma mistura de cinéticas de primeira ordem e ordem zero, até que em pH 10 este sofre degradação de ordem cinética zero demorando apenas alguns minutos para sofrer quase que total degradação. Isso deve ocorrer pelo fato de que o *trans-resveratrol* é um fármaco que apresenta pKa de ácido forte ($pKa_1= 8,8$; $pKa_2=9,8$; e $pKa_3=11,4$) e por isso pode facilmente reagir com um meio básico, fazendo com que ele sofra uma cinética de degradação bem mais rápida que os demais, além de que ao contrário do meio ácido, seus grupos hidroxila estão desprotonados, evitando assim a proteção contra os íons OH^- , tornando a molécula mais susceptível a se degradar e se tornar seu radical fenoxila (LÓPEZ-NICOLÁS; GARCÍA-CARMONA, 2008).