

**Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”**  
Câmpus de Araraquara  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas  
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

**ROBERTA BALANSIN RIGON**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS  
SÓLIDAS PARA ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE *TRANS*-RESVERATROL**

Araraquara – SP

2013

**Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”**  
Câmpus de Araraquara  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas  
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

**ROBERTA BALANSIN RIGON**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS  
SÓLIDAS PARA ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE *TRANS*-RESVERATROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli  
Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Patrícia Severino

Araraquara – SP

2013

## **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

Rigon, Roberta Balansin

R572d      Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas para administração cutânea de *trans*-resveratrol / Roberta Balansin Rigon. – Araraquara, 2013  
156 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Marlus Chorilli

Coorientador: Patrícia Severino

1. *Trans*-resveratrol. 2. Nanopartículas lipídicas sólidas. 3. Melanoma.  
I. Chorilli, Marlus, orient.. II. Severino, Patrícia, coorient.. III. Título.

**CAPES: 40300005**

Dissertação de mestrado defendida por Roberta Balansin Rigon e aprovada dia 16 de julho de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

**Prof. Dr. Marlus Chorilli**



---

**Prof. Dra. Gislaine Ricci Leonardi**

Universidade Federal de São Paulo, Câmpus Diadema



---

**Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unidade Diferenciada de Sorocaba.

Dedico este trabalho aos meus pais

Rosali e Pedro

## **Agradecimentos**

Sem dúvidas, colocar em palavras todo o agradecimento às pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, não foi o experimento mais fácil. Afinal, nunca fui muito boa em me expressar, utilizando à escrita. Mas, eu não poderia deixar de prestar uma pequena homenagem a todos àqueles que me ajudaram na construção de uma importante etapa em minha vida, a qual proporcionou não apenas o meu crescimento profissional, mas também amadurecimento pessoal. Isso tudo graças a amigos que carregarei sempre comigo.

À Deus, que proporcionou muitas mudanças em minha vida e estas sempre repletas de grandes oportunidades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli, pela liberdade e confiança referente ao meu trabalho, além da amizade e compreensão em momentos difíceis. Com você aprendi muito e certamente todas as lições me acompanharão para toda a vida.

À minha co-orientadora Patrícia Severino, pela atenção e disponibilidade em me receber, além da amizade construída.

Aos meus pais Pedro e Rosali, meus grandes espelhos, por tudo que representam para mim: amor incondicional, apoio e incentivo, permanente presença, caráter inquestionável, ensinamentos que me deram base necessária para vencer mais esta e todas as etapas que estão por vir. E, acima de tudo, por depositarem sua confiança em mim.

Aos meus irmãos Talita e Pedro Henrique, pela eterna amizade, companheirismo, amor, apoio, conselho e torcida.

À Profa. Dra. Gislaine Ricci Leonardi, por ter dado a oportunidade de iniciar a vida como pesquisadora e por todo incentivo.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacotécnica, Andressa, Giovana, Flávia, Karisa, Lilian, Márcia, Mariane, Naiara, e Priscileila. Especialmente para a Ana Cristina, Fabíola,

Fernanda Kolenyak, Jéssica, Liliane e Raphaela por todas as noites de companhia, ajudas incansáveis e motivação.

Aos técnicos Natalia, Margareth e Tarek, por toda ajuda que prestaram.

Aos professores de farmacotécnica Dra. Palmira D. Gremião; Anselmo G. Oliveira e Raul C. Evangelista, pela parceria na utilização dos equipamentos, pelas contribuições e amizade.

À Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), pela colaboração e recebimento em seu laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em especial ao técnico Gilson, que me acolheram de braços abertos.

Ao Prof. Dr. Massao Ionashiro do Departamento de Química Analítica, pela parceria. Meu muito obrigado em especial à Rita.

Às minhas amigas de todos os momentos, Ana Eliza, Fernanda, Júlia, Nathália e Thatiani, pela valiosa amizade, cumplicidade e companheirismo.

À minha amiga Jana, pelo apoio e incentivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, o qual possibilitou que eu me dedicasse exclusivamente à pesquisa e à escrita dessa dissertação.

A todos que me ajudaram a ser quem sou, que depositam confiança em mim e para os quais sou uma esperança, resta-me afincadamente não vos decepcionar. Muito obrigada!

## RESUMO

O *trans*-resveratrol (RES) é importante na prevenção e no tratamento da carcinogênese cutânea. Mas, ele apresenta baixa biodisponibilidade e rápida metabolização, fatores que poderiam ser contornados pela sua incorporação em nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) para aplicação tópica. O objetivo foi desenvolver NLS com RES para emprego na terapia antitumoral do melanoma. Foram obtidas NLSs compostas por ácido esteárico (AE) ou estearato de polioxietileno (40) (EP40); poloxamer 407; fosfatidilcolina de soja (FCS) e fase aquosa, acrescidas ou não de 0,1% de RES, produzidas por sonicação. O tamanho das partículas, o índice de polidispersidade (PDI) e o potencial zeta foram analisados. As NLSs foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo (MEV-FEG) e à análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC). Um método analítico utilizando CLAE-DAD foi desenvolvido para a quantificação do RES. Foram conduzidos ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea, bem como avaliação despigmentante *in vitro* de NLSs acrescidas de RES. Os resultados referentes ao tamanho médio, PDI e potencial zeta das NLSs mostraram que formulações compostas por EP40 apresentaram menor diâmetro médio, ~20 nm, a adição de FCS nas formulações promoveu aumento da PDI e as formulações exibiram potencial zeta menores que -6mV. As análises de DSC mostraram ausência do pico endotérmico do RES nas NLS com RES. As análises microscópicas sugeriram formação de material com distribuição nanométrica. O método analítico se mostrou satisfatório em relação à RDC n° 899/2003 para a quantificação do RES. As formulações apresentaram cinéticas de liberação segundo o modelo matemático de Weibull e permearam a pele em até 45% após 24 horas. As formulações contendo RES e o RES livre mostraram-se mais eficazes que o ácido kójico na inibição da enzima tirosinase. Os resultados sugerem que as formulações demonstraram potencial para utilização na terapia antitumoral de melanoma.

**Palavras-chaves:** *Trans*-resveratrol, nanopartículas lipídicas sólidas, melanoma.



## ABSTRACT

The trans-resveratrol (RES) is an important substance in prevention and treatment of skin carcinogenesis. Though, the RES has low bioavailability and rapid metabolism when it administered orally, these factors could be circumvented by its dermal administration using solid lipid nanoparticles (SLNs). The aim of this study was to develop SLN with RES for use in antitumor therapy of melanoma. SLNs composed of stearic acid (SA) or polyoxyethylene stearate (40) (PS40); poloxamer 407; soy phosphatidylcholine (SPC) and the aqueous phase were made by sonication and it were added or not of 0.1% RES. The particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential were analyzed by dynamic light scattering (DLS). The SLNs were analyzed by field emission gun scanning electron microscope (FEG-SEM) and differential scanning calorimetry (DSC). An analytical method using HPLC-DAD was developed to quantify the RES. In vitro release and skin permeation/retention of SLN plus RES were conducted, as well as evaluation of depigmenting potency. The results concerning the average size, PDI and zeta potential of SLNs showed that formulations consisting of polyoxyethylene stearate (40) had a lower average diameter, ~20 nm, the addition of soy phosphatidylcholine promoted increases PDI and the formulations exhibited zeta potential smaller than -6mV. The DSC analysis showed no endothermic peak of the SLN with RES. Microscopic analysis suggest that material formed has nanometer distribution. The analytical method proved satisfactory in relation to RDC n° 899/2003 for RES. The formulations had release kinetics according Weibull's models and it were permeated through the skin up to 45% after 24 hours. The formulation with RES and free RES were more effective than kojic acid in tyrosinase inhibition. The results suggest that formulations had potential for use in antitumor therapy of melanoma.

**Key-words:** *Trans-resveratrol*, solid lipid nanoparticles, melanoma.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Formulações desenvolvidas. ....	58
<b>Tabela 2.</b> Média e desvio padrão do índice de polidispersidade (PdI) das formulações preparadas através da sonicação e analisadas 24 horas, T15, T30, T45 e T60 dias após o preparo. ....	60
<b>Tabela 3.</b> Média e desvio padrão do potencial zeta das formulações preparadas através da sonicação e analisadas 24 horas, T15, T30, T45 e T60 dias após o preparo. ....	69
<b>Tabela 4.</b> Tempo de retenção, resolução dos picos e $\lambda$ máximo para o <i>trans</i> - e <i>cis</i> -resveratrol. ....	81
<b>Tabela 5.</b> Resultados da avaliação da precisão para a repetibilidade (precisão intra-corrída). .	84
<b>Tabela 6.</b> Resultados da avaliação da precisão intermediária (precisão inter-corrídas). ....	85
<b>Tabela 7.</b> Resultados da avaliação da exatidão. ....	86
<b>Tabela 8.</b> Resultados do limite de detecção e de quantificação do <i>trans</i> -resveratrol. ....	87
<b>Tabela 9.</b> Resultados da robustez do método analítico cromatográfico para a quantificação do <i>trans</i> -resveratrol. ....	87
<b>Tabela 10.</b> Validação do dispositivo com membranas de 10.000 NMWL (Millipore, Billerica, USA) para o ensaio de eficiência de encapsulação. ....	89
<b>Tabela 11.</b> Análise do filtrado obtido por ultrafiltração para ensaio de eficiência de encapsulação. ....	89
<b>Tabela 12.</b> Percentual de RES liberado de nanopartículas lipídicas sólidas, F1. RES; F2.RES; F3. RES e F4.RES, após 24 horas de análise. ....	92

<b>Tabela 13.</b> Coeficiente de liberação <i>in vitro</i> do RES obtido, pelos de diferentes modelos matemáticos para as formulações F1.RES; F2.RES; F3.RES e F4.RES.....	94
<b>Tabela 14.</b> Percentual de RES permeado, após 24 horas de análise.....	97
<b>Tabela 15.</b> Porcentagem de inibição da tirosinase pelo ácido kójico em diferentes concentrações nas duas condições analisadas, 1 <sup>a</sup> condição) Utilizando solução de tirosinase a 120 U/mL; 2 <sup>a</sup> condição) Solução de tirosinase a 480 U/mL. ....	101
<b>Tabela 16.</b> Porcentagem de inibição da enzima tirosinase (480 U/mL) pelo RES e pelas NLS-RES em diferentes concentrações.....	103

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Conversão isomérica da forma *trans*- para a forma *cis*-resveratrol após exposição à radiação UV (FIGUEIRAS; NEVES-PETERSEN; PETERSEN, 2011). ..... 26
- Figura 2.** Imagem demonstrando a organização da matriz de NLS (esquerda) e as imperfeições da organização da matriz da partícula (direita) – CLN, distorcendo a formação de um cristal perfeito (MÜLLER *et al.*, 2007). ..... 33
- Figura 3.** Efeito das nanopartículas e das micropartículas sobre a hidratação cutânea (SOUTO; MÜLLER; ALEMIEDA, 2007). ..... 34
- Figura 4.** Ilustração das três diferentes vias de penetração: intracelular, intercelular e folicular. No canto superior direito o aumento do estrato córneo, mostrando o caminho intracelular e intercelular (BOLZINGER *et al.*, 2012). ..... 35
- Figura 5.** Imagem ilustrativa da metodologia utilizada para o preparo da pré-emulsão, bem como das metodologias inicialmente testadas. .... 43
- Figura 6.** Imagem ilustrativa (Spellglass<sup>®</sup>) da célula de Franz utilizada para os ensaios de liberação e permeação do RES. .... 53
- Figura 7.** Média e desvio padrão do diâmetro médio (nm) das formulações preparadas através da sonicação e analisadas 24 horas, T15, T30, T45 e T60 dias após o preparo. .... 60
- Figura 8.** Distribuição do diâmetro médio por intensidade das nanopartículas analisadas no tempo 24 horas após o preparo, sendo: A) formulação F1; B) formulação F1.RES; C) formulação F2; D) formulação F2.RES; E) formulação F3; F) formulação F3.RES; G) formulação F4 e H) formulação F4.RES. .... 61
- Figura 9.** Distribuição do diâmetro médio por intensidade das nanopartículas analisadas no tempo 60 dias após o preparo, sendo: A) formulação F1; B) formulação F1.RES; C) formulação F2; D) formulação F2.RES; E) formulação F3; F) formulação F3.RES; G) formulação F4 e H) formulação F4.RES. .... 62

<b>Figura 10.</b> Fotomicrografia da formulação F1 (50.000x).....	71
<b>Figura 11.</b> Fotomicrografia da formulação F1.RES (100.000x). ....	71
<b>Figura 12.</b> Fotomicrografia da formulação F2 (80.000x).....	71
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografia da formulação F2.RES (150.000x). ....	71
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografia da formulação F3 (150.000x).....	72
<b>Figura 15.</b> Fotomicrografia da formulação F3.RES (150.000x). ....	72
<b>Figura 16.</b> Fotomicrografia da formulação F4 (150.000x).....	72
<b>Figura 17.</b> Fotomicrografia da formulação F4 (200.000x).....	72
<b>Figura 18.</b> Termograma de aquecimento das matérias-primas utilizadas para no preparo das NLSs. ....	74
<b>Figura 19.</b> Termograma da mistura física ácido esteárico + RES (aquecimento).....	74
<b>Figura 20.</b> Termograma da mistura física estearato de polioxietileno (40) + RES (aquecimento).....	74
<b>Figura 21.</b> Termograma da mistura física poloxamer 407 + RES (aquecimento).....	75
<b>Figura 22.</b> Termograma da mistura física fosfatidilcolina de soja + RES (aquecimento). ....	75
<b>Figura 23.</b> Termograma da formulação F1, após 3 ciclos de análise (aquecimento, resfriamento e rea aquecimento).....	75
<b>Figura 24.</b> Termograma da formulação F1.RES, após 3 ciclos de análise (aquecimento, resfriamento e rea aquecimento). ....	75

<b>Figura 25.</b> Termograma da formulação F2, após 3 ciclos de análise (aquecimento, resfriamento e reaquecimento).....	76
<b>Figura 26.</b> Termograma da formulação F2.RES.* .....	76
<b>Figura 27.</b> Termograma da formulação F3.* .....	76
<b>Figura 28.</b> Termograma da formulação F3.RES.* .....	76
<b>Figura 29.</b> Termograma da formulação F4.* .....	76
<b>Figura 30.</b> Termograma da formulação F4.RES.* .....	76
<b>Figura 31.</b> A) Separação cromatográfica obtida com monitoramento em 280-350 nm: calibrador 100% de <i>trans</i> -resveratrol após 1 hora de exposição ambiente a radiação ultravioleta (10 µg/mL); B) espectro UV do pico com retenção em 7,194 min ( <i>trans</i> -resveratrol); C) espectro UV do pico com retenção 7,847 min ( <i>cis</i> -resveratrol) gerados pelo arranjo de diodos. ....	81
<b>Figura 32.</b> Cromatograma obtido com injeção de uma diluição teórica de 30 µg/mL de <i>trans</i> -resveratrol. ....	83
<b>Figura 33.</b> Curva analítica do <i>trans</i> -resveratrol por CLAE. ....	83
<b>Figura 34.</b> Perfil de liberação de RES em nanopartículas lipídicas sólidas após 24 horas de análises, sendo F1. RES; F2.RES; F3. RES e F4.RES. ....	91
<b>Figura 35.</b> Cromatograma obtido com injeção de solução de <i>trans</i> -resveratrol após sua extração da pele suína (derme + epiderme). ....	99
<b>Figura 36.</b> Cromatograma obtido com injeção de solução de <i>trans</i> -resveratrol após sua extração da pele suína (estrato córneo). ....	99

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO .....	16
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1. Melanoma .....	21
2.2. <i>Trans</i> -Resveratrol .....	25
2.3 Sistemas de liberação de fármaco para a administração tópica do trans-resveratrol.....	29
2.3.1 Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) .....	31
III. OBJETIVOS.....	38
IV. MATERIAL & MÉTODOS.....	39
4.1 Material.....	39
4.1.1 Soluções e reagentes .....	39
4.1.2 Equipamentos .....	40
4.2. Métodos .....	42
4.2.1. Desenvolvimento das NLS .....	42
4.2.2 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas .....	44
4.2.3 Validação de metodologia analítica para quantificação de RES por CLAE .....	48
4.2.4 Quantificação do RES presente nas NLSs.....	50
4.2.5 Determinação do coeficiente de partição O/A do RES .....	51
4.2.6 Estudo de liberação do RES <i>in vitro</i> .....	52
4.2.7 Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i> do RES em peles de modelo animal.....	53
4.2.8 Avaliação da retenção cutânea <i>in vitro</i> do RES .....	54
4.2.9 Avaliação despigmentante <i>in vitro</i> do RES incorporado em NLS .....	54
4.2.10 Forma de análise dos resultados .....	56
V. RESULTADOS & DISCUSSÃO.....	58
5.1 Desenvolvimento das NLSs .....	58
5.2 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas.....	59
5.2.1 Determinação do diâmetro médio das NLSs .....	59
5.2.2 Análise do potencial zeta.....	68
5.2.3 Análise microscópica das NLS e NLS-RES.....	70

5.2.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC) .....	73
5.3 Validação de metodologia analítica para quantificação de RES por CLAE .....	80
5.3.1 Linearidade .....	82
5.3.2 Precisão .....	83
5.3.3 Exatidão .....	85
5.3.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....	86
5.3.5 Robustez .....	87
5.4 Quantificação do RES presente nas NLSs .....	88
5.5 Determinação do coeficiente de partição O/A do RES .....	90
5.6 Estudo de liberação do RES <i>in vitro</i> .....	90
5.7 Estudo de permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> do RES em peles de modelo animal .....	96
5.8 Avaliação despigmentante <i>in vitro</i> do RES incorporado em NLS .....	100
VI. CONCLUSÕES .....	106
VII. REFERÊNCIA .....	108
VIII. ANEXOS .....	141
Anexo A - Desenvolvimento das NLSs preparadas por diferentes metodologias: sonicação, homogeneizador de alta pressão e sonicação + homogeneizador de alta pressão .....	141
Anexo B – Validação da metodologia analítica para a quantificação de RES por espectroscopia ultravioleta .....	151



## **I. INTRODUÇÃO**

A exposição à radiação solar ultravioleta (UV) é um fator muito importante para a patogênese de várias doenças cutâneas, incluindo o envelhecimento cutâneo, as hiperpigmentações e o câncer de pele (NDIAYE *et al.*, 2011). Ela pode ser dividida em 3 espectros: UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320 nm) e UVC (<280 nm), sendo que entre elas, o UVC, até o presente momento, é absorvida pela camada atmosférica de ozônio e não atinge a superfície da Terra (SKOBOWIAT *et al.*, 2011).

A radiação UVA penetra na epiderme, chegando até a derme, onde induz a formação de oxigênio singlete e radicais livres, que podem causar danos às macromoléculas celulares como proteínas, lipídeos e DNA (KATIYAR, 2008). Já a radiação UVB pode induzir a uma variedade de efeitos biológicos, incluindo inflamação, formação de queimaduras solares, hiperpigmentação, alterações imunológicas e indução do estresse oxidativo, que quando associados, podem promover a formação do câncer de pele (WILLIAMS *et al.*, 2011).

Assim, as diversas alterações cutâneas decorrentes da exposição crônica à radiação UVB podem causar o fotoenvelhecimento, que está relacionado, principalmente, com a degradação da matriz extracelular cutânea, hiperpigmentação, imunossupressão e fotocarcinogênese, sendo esta envolvida no acúmulo de alterações genéticas, bem como na modulação do sistema imune e no desenvolvimento do câncer de pele (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

Sabe-se que a incidência do câncer de pele tem apresentado um grande aumento nas últimas décadas, o qual está intimamente relacionado com aumento da exposição solar. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de pele é o tipo de câncer

mais frequente no Brasil, correspondendo cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados no país (INCA, 2012).

Existem basicamente dois tipos de câncer de pele: o não-melanoma, que é o mais comum e raramente pode causar a morte do paciente; e o melanoma, que é o mais raro, mas é responsável por três em cada quatro mortes por câncer de pele. Os melanomas são originados através de alterações nos melanócitos (SCHERER; KUMAR, 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que o *trans*-resveratrol (RES), devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, atua como um importante aliado na prevenção e no tratamento de distúrbios cutâneos, como a carcinogênese (NDIAYE *et al.*, 2011). Além de ações relacionadas ao fotoenvelhecimento, este composto natural apresenta vários efeitos benéficos para a saúde, dentre eles ação cardioprotetora, que inclui supressão da peroxidação lipídica e da síntese de eicosanoides, inibição da agregação plaquetária, ações antioxidante, anti-inflamatória e vasorelaxante (AGGARWAL *et al.*, 2004; VANG *et al.*, 2011).

Um dos maiores desafios atualmente enfrentados pelos pesquisadores é a baixa biodisponibilidade *in vivo* do RES quando administrado por via oral. Em mamíferos, esta substância sofre rápida metabolização hepática e intestinal, em torno de 30 a 60 minutos após a sua administração. Desta forma, a sua utilização sistêmica é prejudicada, uma vez que o pico plasmático diminui rapidamente (COTTART *et al.*, 2010; NDIAYE *et al.*, 2011).

O problema da rápida metabolização do RES e o impacto para o tratamento do melanoma foi demonstrado em estudos conduzidos por Niles *et al.* (2003; 2006). Em um dos estudos, o RES induzia a apoptose de células de melanoma *in vitro*. Porém, ao administrá-lo oralmente em ratos os autores não observaram o efeito no combate ao melanoma, verificando que ele havia sido rapidamente metabolizado após a sua administração.

Dessa forma, a administração cutânea do RES pode ser conveniente a fim de localizá-lo no seu local de ação. No entanto, algumas propriedades físico-químicas, como limitada solubilidade aquosa, dificultam sua eficiência terapêutica tópica. Pesquisadores que objetivavam avaliar os efeitos quimiopreventivos do RES no câncer de pele e na fotocarcinogênese verificaram que a aplicação tópica de RES no pré e no pós-tratamento da exposição crônica à radiação UVB mostrou resultados promissores na inibição da incidência do tumor e retardo do início da tumorigênese (AZIZ *et al.*, 2005).

As estratégias tecnológicas que apresentam a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente, diversos grupos de princípios ativos e de modificar suas propriedades e comportamento em meio biológico, são promissoras para veiculação de tais substâncias. Sabe-se que a introdução de um novo princípio ativo no mercado, além de levar vários anos de pesquisa, envolve custos altíssimos. Assim, uma alternativa que pode ser empregada para contornar estes elevados custos é recorrer à estratégia de desenvolvimento de sistemas de liberação para estes princípios ativos, o que tem permitido o aumento de eficiência de diversos princípios ativos, a reintrodução de outros princípios ativos anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novas substâncias antes que sejam efetivamente lançadas no mercado ou utilizadas na terapêutica (MAINARDES *et al.*, 2006).

Dessa forma, durante os últimos anos têm sido desenvolvidos novos veículos com o objetivo não só de aumentar a seletividade e eficácia de princípios ativos, como, também, permitir a redução da dose total necessária, minimizando os efeitos colaterais tóxicos, além de permitir o controle de liberação (GRILL *et al.*, 2009; VENUGOPAL *et al.*, 2009).

Em virtude do grande número de citações na literatura científica, as indústrias farmacêuticas têm se mostrado interessadas no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, os quais apresentam vantagens relacionadas principalmente ao fato de promoverem liberação

modificada de fármacos, além de protegerem princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação (MOHANRAJ; CHEN, 2006; GUTERRES *et al.*, 2007).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são uma nova geração de veículos nanoparticulados de substâncias ativas, que estão ganhando notoriedade como um inovador carreador coloidal de fármacos para a aplicação tópica, principalmente, em virtude de suas características de interação com o estrato córneo e outras camadas da pele e capacidade de arranjo do fármaco com efeito protetor e sustentador da liberação. Quando comparado com outros veículos, como, por exemplo, as emulsões, as NLS apresentam a vantagem de controlar a liberação do fármaco, promover baixa irritação cutânea e proteger a substância ativa (LIU *et al.*, 2007). Além do mais, as NLSs apresentam tamanho de partícula reduzido, o que faz com que haja o aumento do contato com o estrato córneo (SC), promovendo maior penetração cutânea (MEI *et al.*, 2003).

A liberação mediada pelas NLS pode ser uma ferramenta auxiliar no aumento da biodisponibilidade do RES, objetivando verificar sua ação antitumoral. Em um estudo recentemente publicado, Teskac e Kristl (2010) demonstraram que NLS contendo RES podem atravessar a membrana celular dos queratinócitos, aumentando o tempo de exposição das células a esta substância. Guo *et al.* (2010) utilizaram nanopartículas de RES ligado à albumina sérica bovina em ratos com câncer de ovário primário. Os resultados demonstraram maior inibição do crescimento tumoral para o RES incorporado na nanopartícula que para aquele livre.

De maneira geral, as publicações verificadas obtiveram resultados promissores que justificam a continuidade de estudos que evidenciem a liberação modificada do RES, como NLS, objetivando aumentar sua biodisponibilidade e diminuir sua dose administrada. Logo, sua

utilização em NLS para aplicação tópica seria extremamente viável, a fim de localizá-lo no seu sítio de ação.

## **II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Melanoma**

A característica que define a maioria dos cânceres humanos é a heterogeneidade, resultante da aquisição somática de um complexo conjunto de alterações genéticas e genômicas (FREEDMAN *et al.*, 2011).

A incidência de melanoma tem aumentado em todo o mundo, com uma fração crescente de pacientes com a doença em estágio avançado e com mal prognóstico. Mesmo com o avanço na imunoterapia e na terapia-alvo, as opções de tratamento ainda são limitadas (GARBE *et al.*, 2011).

O melanoma cutâneo é um dos mais sérios cânceres de pele, sendo causado pelos melanócitos, que são células pigmentadas dendríticas derivadas da crista neural, que estão normalmente presente na epiderme e algumas vezes na derme viável (VOLKOVOVA *et al.*, 2012).

A melanina é a substância produzida pelos melanócitos presentes na camada basal da epiderme, com o objetivo de proteger a pele contra os danos induzidos pela radiação ultravioleta (UV). Porém, mutações gênicas podem alterar a melanogênese e desencadear o desenvolvimento de cânceres cutâneos, como o melanoma. A melanogênese é dividida em 2 vias: a eumelanogênese, que produz o pigmento escuro (eumelanina) e a feomelanogênese, que produz o pigmento avermelhado e amarelo (feomelanina). Para a síntese de eumelanina há pelo menos a participação de 3 enzimas: a tirosinase; a tirosinase relacionada a proteína-1 (TRP-1) e a tirosinase relacionada à proteína-2 (TRP-2 ou dopacromo tautomerase) (LEE *et al.*, 2011). Em particular, a TRP-2 é uma enzima reguladora que exerce um importante papel tanto na melanogênese, quanto no crescimento celular e nas linhagens de melanócitos (COSTIN *et al.*,

2005). TRP-2 é também um marcador para o melanoma melânico e amelanótico, ao passo que a tirosinase e a de TRP-1 estão ausentes em muitos melanomas amelanóticos (ORLOW *et al.*, 1998). Desta forma, o TRP-2 pode ser um alvo para o tratamento do melanoma (LEE *et al.*, 2011).

A radiação UV é claramente o fator ambiental predominante e, portanto, fator de risco potencialmente modificável para o melanoma. Outros fatores relacionados aos hospedeiros, tais como as características pigmentares e as predisposições genéticas, também desempenham um importante papel para o desenvolvimento do melanoma (GANDINI; AUTIER; BONIOL, 2011).

A produção de melanina pelos melanócitos na pele é controlada pelo hormônio alfa-melanócito estimulador ( $\alpha$ -MSH), um ligante fisiológico que se conecta ao receptor de melanocortina-1 (MC1R), estimulando o MC1R através de  $\alpha$ -MSH e promovendo a ativação de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). A ativação de cAMP conduz à fosforilação da proteína quinase A (PKA), que induz a expressão de microftalmia associada à fator de transcrição (MITF), que, por sua vez, tem um papel fundamental na expressão do gene da tirosinase (HAN *et al.*, 2012).

A cor do cabelo é um indicador fenotípico do genótipo MC1R (receptor de melanocortina-1) que pode modificar a associação entre o risco de nevo e melanoma. Segundo resultado obtido por Fagnoli e colaboradores (2010), variantes do gene MC1R apresentam um importante papel no desenvolvimento do melanoma, tanto pelas vias pigmentares, quanto pelas vias não-pigmentares (FARGNOLI *et al.*, 2010).

O receptor de melanocortina-1 (MC1R) é um gene chave, localizado no cromossomo 16q24.3, que está envolvido na regulação da síntese de melanina e na codificação de sete receptores transmembranares acoplados à proteína G expressos na superfície dos melanócitos

na pele e nos folículos pilosos. A ativação destes receptores são cruciais para a resposta após a exposição à radiação UV resultando na produção da eumelanina escura e no processo de bronzeamento humano, promovendo uma proteção física contra o dano ao DNA (KENNEDY *et al.*, 2001).

O MC1R é altamente polimórfico na população caucasiana com um número de alelos variantes de MC1R associado ao cabelo vermelho, pele clara, sardas, baixo bronzeamento e aumento do risco de desenvolvimento de melanoma e câncer de pele não melanoma. As variações dos receptores têm mostrado alterações nas funções bioquímicas, em grande parte devido à retenção intracelular ou ao acoplamento à proteína G alterada, mas retendo alguma capacidade de sinalização. A associação dos alelos variantes de MC1R com os riscos de câncer de pele permanecem após a correção para a pigmentação fenotípica, indicando regulação das vias não pigmentares. Particularmente, a ativação de MC1R tem sido interligada ao reparo ao DNA, podendo também contribuir com a regulação da resposta imune (RAIMONDI *et al.*, 2008; BEAUMONT; LIU; STURM, 2009; HELSING *et al.*, 2012; STURM, 2012).

O MC1R foi o primeiro gene reconhecido que poderia, dependente da exposição solar, aumentar o risco do desenvolvimento do melanoma. Além disso, a variante RHC do gene MC1R compromete a capacidade de bronzeamento e a comutação da melanina, diminuindo a fotoproteção da feomelanina e também estando envolvida na regulação da resposta ao dano ao DNA dos melanócitos após exposição solar. Como consequência haveria uma maior taxa de mutação do DNA, que se manifestaria como um aumento da susceptibilidade do desenvolvimento do melanoma em pessoas com genótipo combinado (STURM, 2012).

Um estudo conduzido por Landi e colaboradores (2005) estudaram 267 pacientes com melanoma e 382 pacientes controle a partir de um estudo de caso-controle e um estudo familiar no nordeste da Itália. Neste estudo, o gene MC1R foi sequenciado e foi avaliada a capacidade



de reparação do DNA pelo ensaio de reativação da célula hospedeira. Os pesquisadores concluíram que o MC1R está associado ao risco de melanoma e à sua progressão nessa população do mediterrâneo, particularmente na ausência de outros fatores de risco em potencial, tais como sardas ou nevos (LANDI *et al.*, 2005).

Existe outro gene que também pode estar envolvido no desenvolvimento do melanoma, o gene regulado por *downstream* N-myc 2 (NDRG2). Este gene é um supressor tumoral e está fracamente expresso em células tumorais. Porém, ainda não se sabe quais são os sinais de NDRG2 no melanoma e quais são os alvos celulares. Porém, há relatos demonstrando que NDRG2 regula a expressão de fator de transcrição associado à microftalmia (MITF). Como MITF regula a proliferação, diferenciação, sobrevivência e metástase de células de melanoma, a capacidade de NDRG2 em regular a sua expressão revela um mecanismo em potencial pelo qual NDRG2 pode influenciar a progressão do melanoma (KIM *et al.*, 2008).

A conversão de uma lesão cutânea benigna para melanoma cutâneo metastático ocorre em estágios. A proteinaquinase B (Akt) é uma excelente candidata para uma via de sinalização que pode causar o crescimento agressivo em melanoma, pois ela confere resistência a um número de estímulos apoptóticos, inativando vários potenciais genes supressores tumorais (GOVINDARAJAN *et al.*, 2007). Desta forma, Akt apresenta um papel funcional na patogênese do melanoma, sendo que estudos têm demonstrado uma correlação entre a superexpressão de Akt com a diminuição da malignidade de tumores metastáticos decorrentes de melanoma cutâneo (BHATTACHARYA; DARJATMOKO; POLANS, 2011).

A produção de óxido nítrico (NO) na conversão de L-arginina à L-citrulina pela óxido nítrico sintase (NOS) é um importante bioativo e sinalizador molecular, necessário para muitas funções fisiológicas. Recentemente, estudos da função do NO têm focado em seu papel no tumor. A maioria dos tumores humanos e experimentais é estimulada pelo NO, o qual contribui

para o crescimento e a metástase através da promoção da migração, invasão e propriedades angiogênicas das células tumorais. A diminuição de NO endógeno resultou na diminuição do crescimento de células de melanoma, sendo que o crescimento foi restabelecido com aumento de NO (YANG *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que o *trans*-resveratrol (RES), devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, pode ser um importante aliado na prevenção e no tratamento de desordens cutâneas, como, envelhecimento cutâneo, hiperpigmentação e carcinogênese (NDIAYE *et al.*, 2011).

## **2.2. *Trans*-Resveratrol**

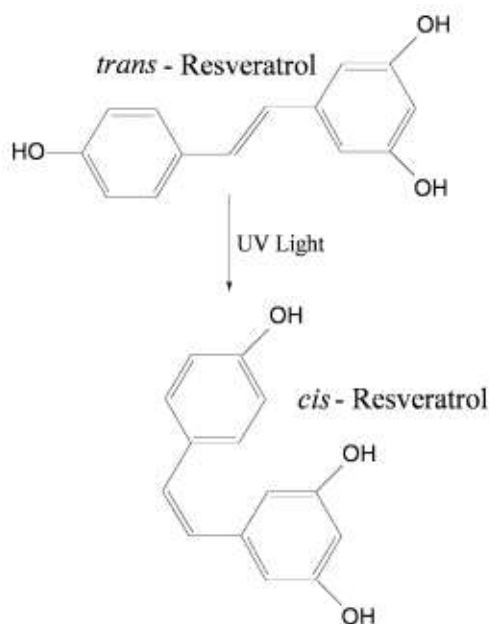
Resveratrol (*trans*-3, 4', 5-trihidroxistilbeno) é uma substância naturalmente encontrada em uvas e em várias plantas medicinais. Nas plantas, o resveratrol atua como uma fitoalexina, que as protege contra as infecções virais. Devido à alta concentração dessa substância na casca das uvas, há uma quantidade significativa de resveratrol no vinho tinto (GEHM *et al.*, 1997).

O resveratrol é um pó esbranquiçado com fórmula molecular  $C_{14}H_{12}O_3$ , peso molecular igual a  $228,25 \text{ g.mol}^{-1}$ , solubilidade em água a  $0,03 \text{ g/L}$ , solubilidade em DMSO a  $16 \text{ g/L}$ , solubilidade em etanol igual a  $50 \text{ g/L}$ , ponto de fusão entre  $253$  e  $255^\circ\text{C}$  e log P igual a  $3,1$  (KRISTL *et al.*, 2009; MISHRA, 2011; AMRI *et al.*, 2012). Apesar de apresentar baixa solubilidade em água, o resveratrol exibe alta permeabilidade da membrana e pode ser considerado um componente classe-II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (AMIDON *et al.*, 1995; AMRI *et al.*, 2012).

Existem 2 isômeros estruturais, o *cis*-(Z) e o *trans*-(E) resveratrol, além da sua forma glicosídica, os quais podem apresentar diferentes efeitos biológicos (ORALLO, 2006; YÁÑEZ

*et al.*, 2006). A irradiação ultravioleta e solar de solução de *trans*-resveratrol induzem a conversão isomérica parcial para a forma *cis*-resveratrol, resultando em uma mistura de *cis*- e *trans*-resveratrol (Figura 1) (FIGUEIRAS; NEVES-PETERSEN; PETERSEN, 2011).

Bertelli e colaboradores (1996) demonstraram em um estudo que solução contendo *trans*-resveratrol padrão após ser exposta à luz solar, durante 1 hora, causou a conversão parcial do *trans*-resveratrol na forma *cis*-resveratrol (80-90% do *trans*-resveratrol foi convertido à *cis*-resveratrol). A intensidade da diminuição do pico cromatográfico referente ao *trans*-resveratrol foi proporcional à área do novo pico cromatográfico correspondente ao *cis*-resveratrol (VIAN *et al.*, 2005). O *cis*-resveratrol pode apresentar benefícios para a saúde, entretanto apresenta menor atividade biológica.



**Figura 1.** Conversão isomérica da forma *trans*- para a forma *cis*-resveratrol após exposição à radiação UV (FIGUEIRAS; NEVES-PETERSEN; PETERSEN, 2011).

Vários estudos demonstraram os benefícios do RES para a saúde. Além da redução dos riscos de doenças cardiovasculares (PETROVSKI; GURUSAMY; DAS, 2011; DOLINSKY; DYCK, 2011), foram descritos ainda: proteção da retina contra a isquemia através da *downregulation* da metaloproteinase-9 e do óxido nítrico e a *upregulation* de hemeoxigenase-1 (LIU *et al.*, 2012); melhora na sensibilidade à insulina; redução do estresse oxidativo e a ativação da via proteínaquinase B em pacientes diabéticos do tipo 2 (BRASNYÓ *et al.*, 2011); ação como agente terapêutico em doenças neurodegenerativas, tais como Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla (WIGHT *et al.*, 2012); modulação da artrite inflamatória através da supressão seletiva da chave celular e da resposta humoral, necessários para o desenvolvimento da doença (XUZHU *et al.*, 2012); inibição de maneira dose-dependente da agregação plaquetária, além de inibição da síntese de tromboxano B2 e hidroxihexadecatrileno (HHT) (PACE-ASCIAK *et al.*, 1995); atividade anti-herpética (CHEN *et al.*, 2012) e também tem sido reportada a sua atividade quimiopreventiva contra o câncer (SHUKLA; SINGH, 2011).

Bhattacharya, Darjatmoko e Polans (2011) avaliaram os efeitos do RES na migração celular e na invasão do melanoma. Os resultados sugeriram que o RES pode reduzir as propriedades de células malignas do melanoma altamente invasivos, por inativação da proteína quinase pelo RES, sendo uma opção atraente para o tratamento de melanoma.

Kim (2012) avaliou o papel do óxido nítrico (NO) durante a apoptose induzida pela capsaicina e pelo RES em células humanas de melanoma A375. Os resultados demonstraram que estas substâncias isoladas ou associadas são capazes de inibir o crescimento celular e promover a apoptose através do aumento da concentração de NO nas células A375.

Trapp e colaboradores (2010) verificaram que o RES apresenta efeito anti-angiogênico, o qual foi mediado pela diminuição de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e

aumento da expressão de trombospondina 1 (TSP1) em co-cultura de células endoteliais de melanoma.

Van Ginkel e colaboradores (2008) avaliaram a eficácia do RES no tratamento do melanoma uveal. Os resultados sugeriram que o RES pode inibir o crescimento tumoral e induzir a apoptose através da via intrínseca mitocondrial. Além disso, os pesquisadores sugeriram que aumentando a biodisponibilidade do RES, sua potência poderia ser aumentada, promovendo a regressão do tumor.

Kim e colaboradores (2008) observaram que o tratamento com agentes despigmentantes, como, por exemplo, o RES, aumenta a expressão de NDRG2 em células de melanoma B16F10. Como a expressão de NDRG2 foi aumentada como consequência do tratamento com o RES, a atividade da enzima tirosinase foi diminuída, em aproximadamente 30 a 45%. Esses resultados suportam a hipótese de que a expressão de NDRG2 atua como um regulador negativo da melanogênese. Estudos ainda demonstram a ação do RES na *downregulation* da proteína MITF (CHANG, 2012).

Embora existam vários estudos demonstrando os benefícios do RES para o tratamento do melanoma, outros deles demonstram a baixa biodisponibilidade dessa substância via oral em humanos.

Walle e colaboradores (2004) avaliaram a absorção, biodisponibilidade e metabolismo de RES marcado com o carbono 14 (RES-C14) após a administração oral e intravenosa em 6 voluntários. A absorção após a administração oral de 25 mg de RES foi de 70%, com pico plasmático do RES e de seus metabólitos de  $491 \pm 90$  ng/ml (aproximadamente  $2\mu\text{M}$ ) e a meia-vida plasmática de  $9,2 \pm 0,6$  horas. No entanto, pequena concentração de RES inalterado ( $< 5$  ng/ml) foi detectada no plasma. A maior parte da dose administrada de RES foi recuperada na urina, sendo identificadas 3 vias vmetabólicas do RES, produzindo sulfato e ácido glucurônico

conjugado de grupos fenólicos e hidrogenação de ligação dupla alifática, esta provavelmente produzida pela microflora intestinal. A rápida conjugação de sulfato pelo intestino e fígado aparentemente é o limitador da biodisponibilidade do RES (WALLE *et al.*, 2004).

Um estudo desenvolvido também por Walle (2011) demonstrou que a absorção oral do RES está em aproximadamente 75%. O extenso metabolismo no intestino e no fígado resulta em uma biodisponibilidade oral muito menor do que 1% (WALLE, 2011).

O problema da rápida metabolização do RES e o impacto para o tratamento do melanoma foi facilmente demonstrado em estudos conduzidos por Niles *et al.* (2003; 2006). Em um dos estudos, o RES induzia a apoptose de células de melanoma *in vitro*. Porém, ao administrá-lo oralmente em ratos, os autores não observaram o efeito no combate ao melanoma, verificando que ele havia sido rapidamente metabolizado após a sua administração.

### **2.3 Sistemas de liberação de fármaco para a administração tópica do trans-resveratrol**

Uma alternativa para contornar a baixa biodisponibilidade e a rápida metabolização do RES poderia ser a sua administração cutânea, a fim de localizá-lo no seu sítio de ação, como sugerem AZIZ *et al.* (2005), que verificaram que a administração cutânea do RES parece ser promissora na inibição da incidência do tumor e retardo do início da tumorigênese. No entanto, algumas de suas propriedades físico-químicas, como limitada solubilidade aquosa e, principalmente, sua alta capacidade de interagir com espécies reativas de oxigênio, dificultam sua eficiência terapêutica tópica, uma vez que possui baixa penetração na pele. Tal fato foi confirmado por Zhang *et al.* (2007), que mencionam que o RES pode se tornar susceptível a reagir com espécies reativas de oxigênio, diminuindo sua eficácia quando exposto a calor e luz.

Porém, poucos estudos foram realizados a fim de demonstrar os benefícios da incorporação de RES em sistemas de liberação modificada para a administração tópica de RES.

Estudo conduzido por Ansari e colaboradores (2011) teve como objetivo aumentar a solubilidade, a estabilidade e a permeação do RES através da complexação com nanoesponjas baseadas em ciclodextrinas. Os resultados demonstraram que a formulação de nanoesponja contendo RES foi promissora para a aplicação tópica do RES.

Scognamiglio e colaboradores (2013) prepararam e caracterizaram diferentes vesículas para a aplicação tópica do RES. Em particular, foram preparadas transfersomas e vesículas contendo etanol encapsulando RES. Além disso, os pesquisadores investigaram o efeito do RES, isolado ou encapsulado nos nanocarreadores, na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e na peroxidação lipídica e, também, avaliou a acumulação de RES na derme e a sua permeação através da pele. Os resultados demonstraram que nos dois sistemas houve efeito protetor, reduzindo a formação de ERO, bem como na formação de peroxidação lipídica. Mas, apenas a vesícula contendo etanol foi capaz de promover a passagem do RES através da pele. Assim, esse estudo contribui para o entendimento do efeito da formulação na permeação cutânea de RES.

A absorção percutânea do RES em lipossoma, feito com fosfatidilcolina de soja, e niossomas, preparados com monoglicerídeo e diglicerídeos, foram investigadas por Pando e colaboradores (2013). Os resultados demonstraram que houve alta acumulação cutânea e baixa liberação transdérmica do RES, especialmente quando utilizado a formulação de niossoma formulado com monoglicerídeo. Assim, os pesquisadores concluíram que os niossomas apresentaram melhor comportamento na entrega cutânea do RES quando comparado com os lipossomas.

A liberação mediada pelas nanopartículas lipídicas sólidas pode ser uma ferramenta auxiliar no aumento da biodisponibilidade do RES, objetivando verificar sua ação antitumoral. Em um estudo publicado por Teskac e Kristl (2010) demonstraram que NLS contendo RES podem atravessar a membrana celular dos queratinócitos, aumentando o tempo de exposição das células a esta substância.

Carlotti e colaboradores (2012) encapsularem o RES em nanopartículas com a finalidade de melhorar a sua estabilidade, em relação a sua isomerização, bem como aos fatores limitantes para a aplicação tópica. Os resultados demonstraram que o RES nanoencapsulado, quando comparado com o RES livre, reduziu a taxa de fotodegradação do RES. Embora o *uptake* celular do RES nanoencapsulado tenha sido igual ao RES livre, o RES nanoencapsulado promoveu maior atividade anti-lipoperoxidativa quando comparado com o RES livre.

Diante dos trabalhos recentemente publicados, os resultados apresentados mostram-se promissores e justificam a continuidade dos estudos com sistemas de liberação modificada para veicularem o RES, como as NLS, para a aplicação tópica.

### **2.3.1 Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)**

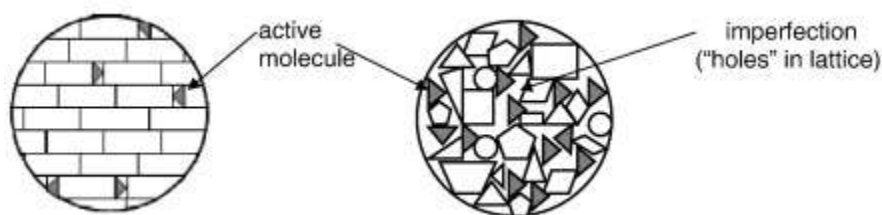
Recentemente, há cada vez mais evidências que o desenvolvimento de novos fármacos isoladamente não é suficiente para assegurar o progresso na farmacoterapia. Dados experimentais promissores *in vitro* são frequentemente seguidos por resultados decepcionantes *in vivo*. Muitas são as razões, pelas quais há falta de sucesso na terapia, dentre elas: baixa concentração do fármaco devido à baixa absorção, rápida metabolização e eliminação (como, por exemplo, o RES), além da distribuição do fármaco em outros tecidos associada à alta toxicidade (como, por exemplo, os fármacos anticâncer); a baixa solubilidade do fármaco e alta flutuação dos níveis plasmáticos devido à biodisponibilidade imprevisível após administração



oral, incluindo a influência de alimentação no trato gastrointestinal. Uma estratégia promissora para tentar solucionar estes problemas envolve o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármaco adequados, dentre eles as nanopartículas lipídicas sólidas (MEHNERT; MÄDER, 2012).

Em 1996, Müller e Lucks introduziram o termo nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) ao patentear um método de produção de NLS por homogeneização à alta pressão (MÜLLER; LUCKS, 1996). As nanopartículas são definidas segundo o FDA como qualquer material com dimensões menores entre 1 a 100 nm ou produtos finais com dimensões de até 1 µm que exibam propriedades ou fenômenos, incluindo propriedades físicas ou químicas ou efeito biológico (DOWLING *et al.*, 2004; JAIN *et al.*, 2006; HOWARD *et al.*, 2006; APOPA *et al.*, 2009; AUFFAN *et al.*, 2009; FDA, 2012). As NLS são nanopartículas lipídicas de primeira geração, as quais são obtidas utilizando apenas lipídios sólidos à temperatura ambiente (MÜLLER *et al.*, 2007).

Modificações das NLSs realizadas posteriormente resultaram nos chamados carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), que representam atualmente uma segunda geração de nanocarreadores lipídicos (MÜLLER *et al.*, 2007). Os dois tipos são baseados em lipídeos sólidos. Entretanto, podem ser distinguidos pelas estruturas internas. As NLSs apresentam lipídeos sólidos puros e os CLNs são constituídos por uma porcentagem adicional de lipídeo líquido, causando imperfeições na rede cristalina, conforme demonstrado na Figura 2 (MEHNERT; MÄDER, 2001; SOUTO *et al.*, 2007).



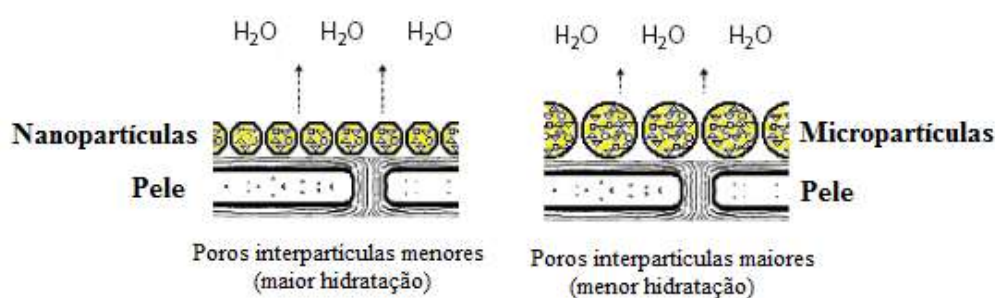
**Figura 2.** Imagem demonstrando a organização da matriz de NLS (esquerda) e as imperfeições da organização da matriz da partícula (direita) – CLN, distorcendo a formação de um cristal perfeito (MÜLLER *et al.*, 2007).

As NLSs representam uma alternativa aos sistemas de liberação coloidais tradicionais, como, por exemplo, as emulsões, lipossomas e as micro e nanopartículas poliméricas. As NLSs combinam a vantagem dos sistemas tradicionais, mas sem apresentar algumas maiores desvantagens, como, por exemplo, liberação não sustentada de ativos, dificuldade em solubilizar ativos lipofílicos, baixa estabilidade física e química de moléculas lábeis, alta incidência de efeitos colaterais, entre outras (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MARCATO, 2009).

Houve um aumento nos grupos de pesquisas trabalhando com as NLSs nos últimos anos. Inicialmente, as pesquisas com NLSs focavam estudos exclusivamente para aplicações farmacêuticas para a administração oral e parenteral. Na última década, as NLSs foram introduzidas em formulações para administração cutânea. Porém, muitos estudos ainda precisam ser realizados para esclarecer as razões como as NLSs podem modificar a permeação cutânea dos fármacos e como o lipídio interage com o estrato córneo (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Existem inúmeros benefícios na utilização das NLSs em formulações para a aplicação cutânea, pois normalmente as NLSs são formuladas utilizando lipídeo não irritativo e não tóxico, sendo bem tolerado na pele lesada e inflamada (MÜLLER *et al.*, 1996). Além disso,

fármacos que são irritativos, como, por exemplo, a tretinoína, tornam-se menos irritantes se aplicados em NLS (JENNING *et al.*, 2000). Outro aspecto benéfico no uso de NLSs são as suas propriedades favoráveis, como, por exemplo, o seu efeito oclusivo devido à formação de um filme na superfície cutânea, diminuindo a perda transepidermal de água (TEWL), o que promove melhora na aparência da pele, além de favorecer a penetração cutânea de fármacos, conforme demonstrado na Figura 3 (DE VRINGER; DE RONDE, 1995).

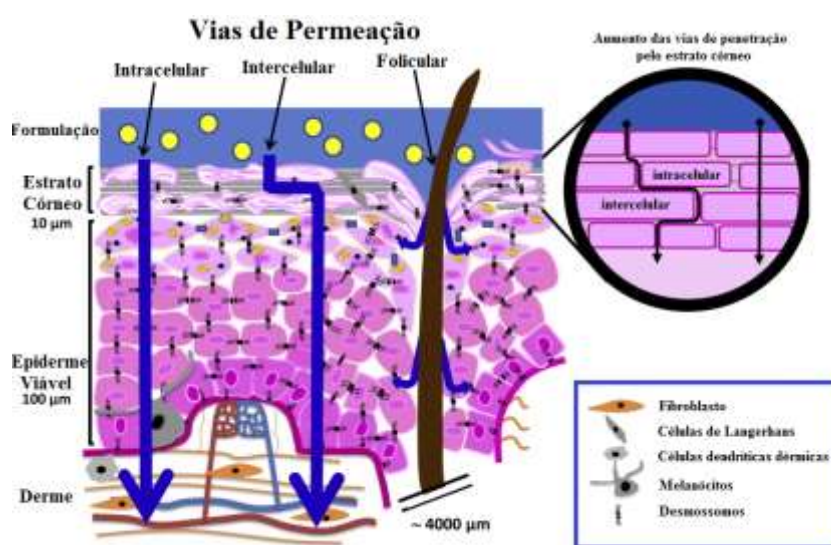


**Figura 3.** Efeito das nanopartículas e das micropartículas sobre a hidratação cutânea (SOUTO; MÜLLER; ALEMIEDA, 2007).

A maior taxa de permeação dos fármacos pode ser observada com o aumento da capacidade de hidratação da pele. Além disso, a presença de lipídios nas NLSs pode apresentar uma ação afinidade pelo estrato córneo, promovendo assim maior facilidade do fármaco em atravessar a barreira cutânea. Essas duas propriedades podem aumentar o poder de permeação dos fármacos encapsulados em NLS (LEE; TOJO, 1998).

A permeação de partículas através da pele pode ocorrer por três diferentes vias: a via transcelular, intercelular e apêndice. Por meio da via transcelular o fármaco passa pelas estruturas lipídicas do estrato córneo (membrana celular) e pelo citoplasma dos queratinócitos, encontrando estruturas lipofílicas e hidrofílicas. A via mais comum de permeação é a via intercelular, em que o fármaco passa pela matriz extracelular, de característica

predominantemente hidrofílica (TROMMER; NEUBERT, 2006). Na via apêndice, o fármaco passa através dos folículos capilares e glândulas sudoríparas (Figura 4). Ambas as vias, transcelular, intercelular e apêndices, apresentam interações consideráveis com as formulações nanoparticuladas (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004; LADEMANN *et al.*, 2007; CROSERÁ *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Ilustração das três diferentes vias de penetração: intracelular, intercelular e folicular. No canto superior direito o aumento do estrato córneo, mostrando o caminho intracelular e intercelular (BOLZINGER *et al.*, 2012).

Sabe-se que as NLSs podem aumentar a permeação cutânea de fármacos, mas os mecanismos pelos quais ocorre esse processo ainda não estão bem esclarecidos. A interação das NLS com a pele depende tanto das propriedades físico-químicas das nanopartículas, como, por exemplo, o tamanho, carga superficial, propriedades das matérias-primas utilizadas, eficiência de encapsulação, lamelaridade e o modo de aplicação. Entretanto, existem várias evidências demonstrando que independente da matéria-prima utilizada, a principal via utilizada pelas NLS

na permeação cutânea se dá pela via apêndice. Entretanto, este aumento na absorção pela pele pode ser decorrente o efeito oclusivo das NLSs (SOUTO; ALMEIDA; MÜLLER, 2007; DESAI; PATLOLLA; SINGH, 2010).

Schlupp e colaboradores (2011) demonstraram que as NLSs influenciam a permeação cutânea através de mecanismos intrínsecos, associada à interações específicas entre o complexo carreador do fármaco e a superfície cutânea, os quais se tornam possíveis pela natureza lipídica e o tamanho nanométrico do carreador. Além disso, as NLSs não só são capazes de melhorar a permeação cutânea de fármacos, mas também podem ser interessantes em casos específicos onde haja o objetivo de influenciar a desestruturação epidérmica.

A aplicação tópica de quimioterápicos e NLS pode ser utilizada como uma alternativa à redução da toxicidade sistêmica para o tratamento de cânceres de pele. Um estudo publicado por Taveira e colaboradores (2012) teve como objetivo desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas catiônicas contendo doxorubicina, um potente fármaco anticâncer, além de avaliar as influências dessas partículas na citotoxicidade do fármaco e a captação celular em células de melanona de murino B16F10. Os resultados demonstraram que a encapsulação de doxorubicina aumentou de maneira significativa a citotoxicidade da doxorubicina em relação ao controle das células cancerosas, indicando um potencial dessas nanopartículas na terapia do câncer cutâneo.

Wang e colaboradores (2009) desenvolveram e caracterizaram sistemas nanoparticulados lipídicos para ação transdérmica de buprenorfina. As NLSs propiciaram maior permeação do fármaco, quando comparado com os carreadores lipídicos nanoestruturados e as emulsões lipídicas. As NLSs produzidas com fosfatidilcolina de soja como tensoativo mostraram maior liberação do fármaco quando comparado com as NLSs que utilizaram monoglicerídeo de ácido palmítico.

Bhalekar e colaboradores (2009) conduziram um estudo que tinha como objetivo preparar NLS com nitrato de miconazol e verificar sua liberação tópica. Os resultados demonstraram que o nitrato de miconazol em NLS apresentou aumento significativo na captação acumulativa da pele, mostrando aumento da permeação na camada alvo (BHALEKAR *et al.*, 2009).

De maneira geral, as publicações verificadas obtiveram resultados promissores que justificam a continuidade de estudos que evidenciem a liberação modificada do RES, como NLS, objetivando aumentar sua biodisponibilidade e diminuir sua dose administrada. Logo, sua utilização em NLS para aplicação tópica pode ser extremamente viável, a fim de localizá-lo no seu sítio de ação.

### III. OBJETIVOS

Desenvolver NLS como sistema de liberação modificada para o RES, de forma a otimizar a sua utilização na terapia tópica antitumoral. Este projeto visou o desenvolvimento científico e tecnológico na Área de Fármacos e Medicamentos e propôs-se a:

- Desenvolver NLS para a incorporação de RES;
- Caracterizar físico-quimicamente os sistemas obtidos, através da determinação de diâmetro médio, potencial zeta e calorimetria diferencial exploratória;
- Avaliar a morfologia das NLS através de microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo (MEV-FEG);
- Validar o método de doseamento de RES por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Analisar a eficiência de encapsulação do RES nas NLS;
- Realizar ensaios de liberação *in vitro* utilizando membranas de acetato de celulose;
- Realizar estudos de retenção e permeação *in vitro* empregando peles de orelha de porco.
- Verificar a ação despigmentante *in vitro* usando ensaio da reação enzimática da tirosinase.

## **IV. MATERIAL & MÉTODOS**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Soluções e reagentes**

1. A substância química de referência (SQR) é o *trans*-resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxi-*trans*-estilbeno), 99% de pureza (Sigma-Aldrich, USA).
  - a. Água (Milli-Q);
  - b. Ácido esteárico (Via Farma, Brasil);
  - c. Estearato de polioxietileno (40) (Sigma-Aldrich, USA);
  - d. Fosfatidilcolina de soja (Epikuron<sup>®</sup> 200, Lucas Meyer, Alemanha);
  - e. Poloxamer 407 (Pluronic<sup>®</sup> F127, Sigma-Aldrich, USA);
  - f. Metilparabeno (Nipagin<sup>®</sup> M, PharmaSpecial, Brasil);
  - g. Propilparabeno (Nipazol<sup>®</sup> M, PharmaSpecial, Brasil);
  - h. *Trans*-resveratrol (Regu<sup>®</sup> Fade, Sarfam, Brasil).
2. Análise do diâmetro médio e do potencial zeta:
  - a. Água (Milli-Q)
  - b. Solução de cloreto de potássio (0,1%).
3. Validação da metodologia analítica:
  - a. Acetonitrila grau CLAE (J.T. Baker, USA);
  - b. Metanol grau CLAE (J.T. Baker, USA);
  - c. Ácido acético glacial (J.T. Baker, USA)
  - d. Água (Milli-Q).
4. Ensaio de liberação, permeação e retenção:
  - a. Polissorbato 80 (Sigma-Aldrich, USA);



- b. Metanol grau CLAE (J.T. Baker, USA);
  - c. Fita adesiva 750 transparente Scotch<sup>®</sup> (3M Brasil).
5. Para o ensaio despigmentante *in vitro*, usou-se:
- a. L-tirosina (Sigma-Aldrich, USA);
  - b. Tirosinase, liofilizado de cogumelo (Sigma-Aldrich, USA).

#### **4.1.2 Equipamentos**

1. Para o preparo das formulações utilizou-se:
  - a. Balança analítica, METTLER, modelo H10;
  - b. Balança semi-analítica, Micronal B160;
  - c. Agitador magnético com aquecimento Fisatom, modelo 752A-2;
  - d. Ultra-Turrax T25, USA;
  - e. Homogeneizador de alta pressão (Nano DeBEE - BEE International);
  - f. Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonics Corporation, USA);
  - g. Spectrafuge<sup>™</sup> 16 M Microcentrífuga (Labnet, USA).
2. Para a análise do tamanho de partículas e potencial zeta:
  - a. Equipamento para avaliar o espalhamento de luz dinâmico (DLS, Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK) - fonte de laser He-Ne 4,0 mW, 633nm.
3. Para a análise microscópicas das partículas:
  - a. Field emission scanning electron microscope (FEG-MEV) (JEOL, modelo JSM-7500F);
  - b. Para o recobrimentos das amostras utilizou-se equipamento Bal-Tec, modelo Sputter-Coater SCD 050.

4. Para a análise de calorimetria diferencial exploratória (DSC):
  - a. Equipamento DSC módulo Q10 da TA Instruments.
5. Para o desenvolvimento da metodologia analítica:
  - a. Cromatógrafo de Alta Eficiência Waters<sup>®</sup> Alliance, modelo 2695, equipado com detector UV-Vis Photodiodearray, modelo 2996;
  - b. Coluna C18 Luna (250 mm x 4,6mm I.D. 5µm; Phenomenex, Torrance, EUA);
  - c. Bomba de vácuo;
  - d. Ultrassom Unique.
6. Para o ensaio de liberação, permeação e retenção:
  - a. Permeador Microette Plus<sup>™</sup> (Hanson Research, USA);
  - b. Amostrador Auto Multi Fill<sup>™</sup> (Hanson Research, USA);
  - c. Vortex Phoenix<sup>®</sup> AT56 (Phoenix, Brasil);
  - d. Ultrassom Ultrasonic Cleaner Unique Modelo USC 2800A (Unique Ind., Brasil);
  - e. Centrífuga Sorvall<sup>®</sup> TC6 (Sorvall, Brasil).
7. Para o ensaio despigmentante *in vitro*, usou-se:
  - a. Leitora elisa placa Robonik<sup>®</sup>, readwell plate (Robonik, Índia).

## **4.2. Métodos**

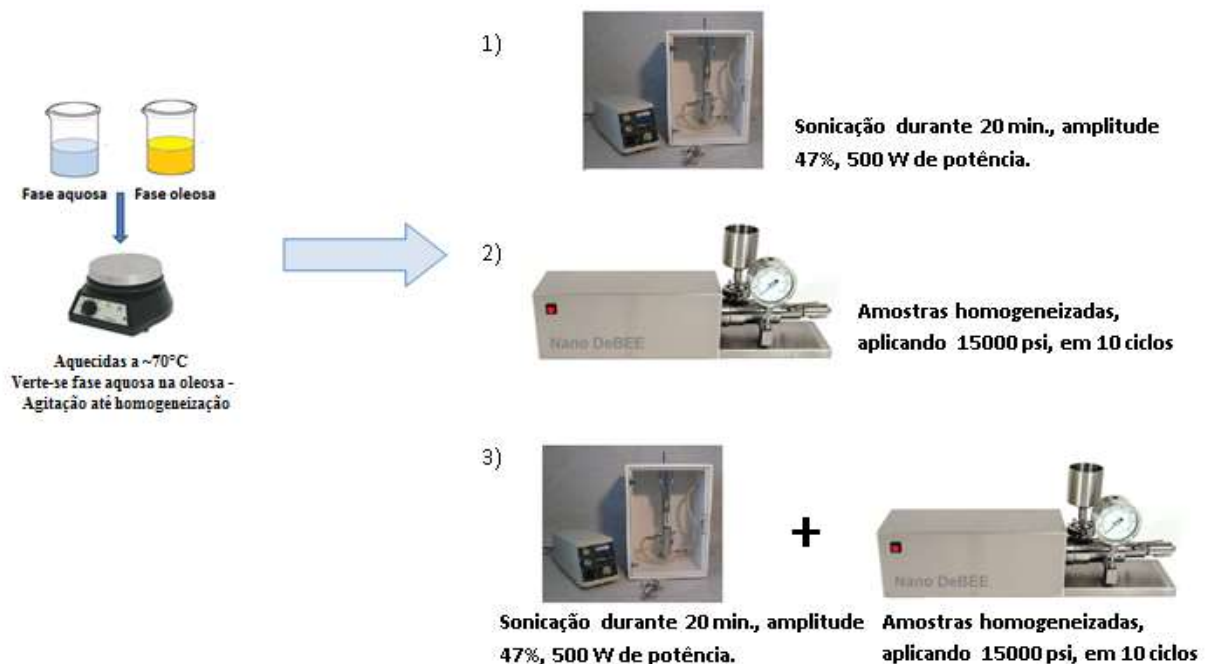
### **4.2.1. Desenvolvimento das NLS**

Para o desenvolvimento das formulações contendo nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram testadas várias metodologias. Inicialmente, foram desenvolvidas formulações contendo 3% de material graxo (ácido esteárico) e 1,5% de tensoativo (fosfatidilcolina de soja + poloxamer 407), sendo que a concentração de material graxo foi fixa para todas as formulações, variando-se apenas as concentrações de tensoativo. Para o preparo da pré-emulsão, a fase lipídica composta por ácido esteárico associado ou não de fosfatidilcolina foi fundida a aproximadamente 5 – 10°C acima do ponto de fusão do lipídio e dispersa em uma solução aquosa, contendo poloxamer 407 (Pluronic<sup>®</sup> F127) em diferentes concentrações e os conservantes microbiológicos metilparabeno (0,18%) e propilparabeno (0,02%). Esse processo de obtenção das NLSs foi semelhante para todas as formulações testadas e para todas as metodologias utilizadas.

Primeiramente havia sido proposto o desenvolvimento das NLSs utilizando a metodologia adaptada descrita por Pardeike, Hommoss & Müller (2009), na qual a pré-emulsão formada foi dispersa em Ultra Turrax a 8.000 rpm, durante 10min. Depois de homogeneizada, para a redução do tamanho das partículas, a pré-emulsão foi levada ao homogeneizador de alta pressão, 3 ciclos e pressão de 500 bar. Em seguida, esta dispersão foi resfriada à temperatura ambiente. Essa metodologia foi testada, porém não se apresentou adequada, uma vez que a fosfatidilcolina de soja permanecia aderida na haste dispersora do Ultra Turrax. Assim, foram desenvolvidas outras metodologias, dentre elas:

Testou-se a utilização de 3 outros métodos:

1. **Sonicação:** A pré-emulsão formada foi sonicada durante 20 minutos, utilizando amplitude de 47% (500W de potência), conforme demonstrado na Figura 5.
2. **Homogeneizador de alta pressão:** A pré-emulsão formada foi levada ao equipamento de alta pressão (Nano DeBEE - BEE International, Inc.), aplicando 15000 psi, em 10 ciclos de homogeneização, conforme demonstrado na Figura 5.
3. **Sonicação seguida de utilização do homogeneizador de alta pressão:** A pré-emulsão formada foi sonicada durante 20 minutos, utilizando amplitude de 47% (500W de potência), ao final as amostras foram levadas ao equipamento de alta pressão (Nano DeBEE - BEE International, Inc.) e foram homogeneizadas, aplicando 15000 psi, em 10 ciclos de homogeneização, conforme demonstrado na Figura 5.



**Figura 5.** Imagem ilustrativa da metodologia utilizada para o preparo da pré-emulsão, bem como das metodologias inicialmente testadas.

Posteriormente, foram preparadas NLSs empregando metodologia adaptada descrita por Lim e colaboradores (2004) e Mehnert e Mäder (2001), a qual utiliza a sonicação. As formulações desenvolvidas foram compostas por 5,0% de material graxo (ácido esteárico ou estearato polioxietileno [40]), associado ou não de 1,2% de fosfatidilcolina de soja e fase aquosa constituída de 3,5% de poloxamer 407; 0,18% de metilparabeno e 0,02% de propilparabeno. Para o preparo da pré-emulsão, a fase aquosa foi aquecida, a aproximadamente 70 °C, e vertida sobre o material graxo, aquecida à mesma temperatura. A mistura foi agitada, mantendo o aquecimento, utilizando agitador magnético durante 1 minuto. Em seguida, a pré-emulsão formada foi sonicada durante 20 minutos (amplitude 47% e 500W de potência), sendo as amostras mantidas em banho de gelo, pois testes preliminares demonstraram que o banho de gelo promoveu a formação de partículas com diâmetro e índice de polidispersidade menores do que quando utilizado banho de água a temperatura ambiente. Esse processo de obtenção das NLSs foi semelhante para todas as formulações testadas.

Com o objetivo de eliminar o titânio que pode ser desprendido no processo de sonicação, as formulações foram centrifugadas a 5000 rpm, durante 10 minutos (AGAYAN *et al.*, 2004).

A incorporação de RES foi feita na fase lipídica utilizando a mesma abordagem experimental utilizada na preparação de NLSs livres de fármaco. Incorporou-se 0,1% do fármaco no sistema (DETONI *et al.*, 2012).

## **4.2.2 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas**

### **4.2.2.1 Determinação do diâmetro médio das NLSs**

A determinação do diâmetro médio das nanopartículas foi realizada pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons, também conhecida como espalhamento de luz dinâmico

(DLS), empregando equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Este é particularmente sensível para determinar pequenas mudanças no diâmetro médio, tais como aquelas decorrentes das camadas adsorvidas na superfície da partícula ou pequenas variações no processo de manufatura. Quando um feixe de luz passa através de uma dispersão coloidal, as partículas ou gotas espalham a luz em todas as direções. É possível, então, observar flutuações tempo-dependentes na intensidade do espalhamento através de um detector que processa os dados e envia a um computador. Calcula-se o raio hidrodinâmico das partículas coloidais de acordo com a equação de Einstein-Stokes (equação 1), realizada através do *software* incluído no sistema:

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R_h} \quad (\text{Equação 1})$$

sendo: D = coeficiente de difusão das partículas; K = constante de Boltzmann ( $1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$ ); T = temperatura absoluta (293, 15 K);  $\pi = 3,141592$ ;  $\eta =$  viscosidade ( $1,002 \times 10^{-3} \text{ NM}^{-2}$ );  $R_h =$  raio hidrodinâmico.

As dispersões de nanopartículas foram diluídas em água ultra-purificada (10  $\mu\text{L/mL}$ ) e mantidas em frascos de cintilação isentos de poeira. Os frascos foram colocados na câmara de análise, de modo que feixes pudessem atravessar a dispersão em toda a sua extensão. As condições de ensaio foram: ângulo de espalhamento:  $90^\circ$ ; temperatura:  $25^\circ \text{ C}$ ; comprimento de onda do laser: 633 nm; índice de refração: 1,311. Foram realizadas 3 determinações do diâmetro médio e do índice de polidispersidade, sendo calculados a média e o desvio padrão. As análises foram feitas nos tempos 24 horas, 15, 30, 45 e 60 dias após o preparo das formulações, no Departamento de Processos Biotecnológicos, da Universidade Estadual de

Campinas (Unicamp), em colaboração com a Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana. As formulações foram mantidas armazenadas em geladeira ( $4 \pm 2$  °C) durante todo o período de análise.

#### **4.2.2.2 Análise do potencial Zeta**

O potencial zeta das NLS foi mensurado em água purificada, ajustando a condutividade ( $50 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) com solução de cloreto de potássio (0,1%). O potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética, utilizando equipamento Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK, sendo as análises feitas nos tempos 24 horas, 15, 30, 45 e 60 dias após o preparo das formulações. As formulações foram mantidas armazenadas em geladeira ( $4 \pm 2$  °C) durante todo o período de análise. As amostras foram previamente diluídas ( $10 \mu\text{L}/\text{mL}$ ) com solução aquosa de KCl para manter uma constante de força iônica durante a análise. As amostras foram colocadas na célula eletroforética e foram realizadas, para cada amostra, 3 determinações do potencial de superfície, calculando-se a média e o desvio padrão.

#### **4.2.2.3 Análise microscópica**

A determinação da morfologia das NLSs foi realizada por microscopia eletrônica de varredura empregando microscópio eletrônico de varredura de efeito de campo (MEV-FEG) (JEOL JSM-7500F). Aplicou-se uma gota das mesmas em um substrato de silício. Após, aguardou-se a secagem durante aproximadamente 12 horas em um dessecador sob vácuo. Após as 12h, retirou-se o substrato contendo a amostra e realizou-se o recobrimento com carbono, no Sputter Coater SCD 050, visando criar uma camada condutora na superfície da amostra. Posteriormente, fotomicrografias foram obtidas utilizando feixe de elétrons de 10 e 20 kV.

#### **4.2.2.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)**

As medidas de calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram realizadas utilizando calorímetro diferencial de varredura (DSC), DSC Q10, TA Instruments, acoplado à um módulo de resfriamento por N<sub>2</sub>. As formulações de nanopartículas foram liofilizadas. Para as análises, uma alíquota de 5 mg de cada componente analisado ou das formulações ou das misturas físicas dos componentes utilizados no preparo das formulações, foram adicionadas em cadinho de alumínio selado. As amostras foram aquecidas de -50 a 270 °C, numa razão de 10°C/min, e as curvas de DSC foram obtidas utilizando atmosfera de N<sub>2</sub>(g) num fluxo de 50 mL/min.

Convencionalmente adotou-se como exotérmico a disposição dos picos indicados no sentido ascendente e, conseqüentemente, os picos com disposição descendentes adotou-se como endotérmicos. Neste estudo, a investigação do comportamento térmico das amostras obedeceu o seguinte procedimento: aquecimento entre -50 °C a 270 °C, seguido de resfriamento até -50 °C e posterior reaquecimento até 270 °C.

As amostras analisadas por DSC foram as matérias-primas ácido esteárico, estearato de polioxietileno (40), poloxamer 407, fosfatidilcolina de soja, metilparabeno, propilparabeno e *trans*-resveratrol, bem como as formulações desenvolvidas F1 a F4 (sem substância ativa) e F1.RES a F4.RES (acrescidas de 0,1% de RES).

As análises de DSC foram realizadas no Instituto de Química, no Departamento de Química Analítica, em colaboração com o Prof. Dr. Massao Ionashiro.



### **4.2.3 Validação de metodologia analítica para quantificação de RES por CLAE**

A validação da metodologia analítica para a quantificação de RES por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada utilizando o equipamento Waters<sup>®</sup> Alliance, modelo 2695, equipado com detector UV-Vis Photodiode Array 2996. Para determinar o melhor comprimento de onda de absorção do RES, inicialmente fez-se uma varredura entre 280-350 nm. Após, o comprimento de onda do detector foi fixado em 306,6 nm e a área do pico foi analisada automaticamente. Os experimentos foram conduzidos em fase reversa usando uma coluna C18 Luna (250 mm x 4,6mm I.D. 5µm; Phenomenex, EUA), com injetor automático, mantida a  $24 \pm 1$  °C. A fase móvel foi eluída por modo de gradiente em um fluxo de 1 mL/min, sendo composta entre 0 e 3,5 min por água: acetonitrila (75:25, v/v); de 3,6 e 5,8 min por água: metanol: acetonitrila (32,5:30:37,5; v/v) e 5,9 e 10 min por água: acetonitrila (75:25, v/v). O método foi validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003), dentre eles: linearidade, precisão, especificidade, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, precisão e robustez.

#### **4.2.3.1 Linearidade**

Foram construídas três curvas analíticas com soluções de RES em acetonitrila em diferentes concentrações (1 – 100 µg/mL). As soluções foram injetadas no cromatógrafo. A curva de concentração do RES em função da área de pico foi construída e a linearidade do método na faixa de concentração testada foi avaliada pela análise da regressão linear (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).

#### **4.2.3.2 Precisão**

A precisão foi avaliada através de ensaios de precisão instrumental, repetibilidade e precisão intermediária. No ensaio de precisão instrumental, foram feitas 3 injeções consecutivas da solução padrão de RES em 3 diferentes concentrações. Foram calculados a média, o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR). A repetibilidade foi avaliada através da análise de 3 injeções consecutivas da solução padrão de RES em 3 diferentes concentrações em um mesmo dia. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada pela análise de 3 injeções consecutivas da solução padrão de RES em 3 diferentes concentrações em três dias distintos (BRASIL, 2003).

#### **4.2.3.3 Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Ela deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, sendo calculada pela Equação 2 (BRASIL, 2003).

$$\text{Exatidão} = (\text{CME}/\text{CT}) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

em que CME = Concentração média experimental; CT = Concentração teórica.

#### 4.2.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando valores de DP e inclinação das curvas analíticas obtidas. Os LD e LQ teóricos foram calculados pelas equações 3 e 4, respectivamente (BRASIL, 2003).

$$LD = (DP \times 3,3)/IC \quad (\text{Equação 3})$$

$$LQ = (DP \times 10)/IC \quad (\text{Equação 4})$$

em que DP = DP do intercepto com o eixo de Y e IC = inclinação da curva analítica.

#### 4.2.3.5 Robustez

A robustez é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Para isso, foram realizados testes de variação de temperatura da coluna (25, 30 e 35 °C) e do fluxo (0,8; 1,0 e 1,2 mL/min) (BRASIL, 2003).

#### 4.2.4 Quantificação do RES presente nas NLSs

Para a quantificação do RES foram testadas três metodologias indiretas para análise do teor de RES incorporado às NLSs.

1. **Ultracentrifugação:** Por esse método, a análise foi submetida a um processo de ultracentrifugação e posteriormente analisada por CLAE. As formulações foram centrifugadas a 45.000 g, durante 1 hora, a 4 °C (SUNDARAM *et al.*, 2009).
2. **Filtração em membrana:** Para a realização deste teste utilizou-se dispositivos com membranas de 10.000 NMWL (Millipore, Billerica, USA). Inicialmente, para minimizar a retenção do RES na membrana, foi realizado um pré-tratamento utilizando

uma solução de polisorbato 80 a 5,0% (LEE *et al.*, 2003). Após, a membrana foi lavada com água Milli-Q e aplicou-se uma solução com quantidade conhecida de RES, sendo esta centrifugada a 14.000 rpm, durante 15, 30 min e 1 hora, a fim de coletar, aproximadamente, 100% do RES, mostrando que o RES não ficou retido na membrana (GARDOUTH *et al.*, 2013).

3. **Ultrafiltração:** Para este teste, as amostras foram filtradas à vácuo, utilizando membrana de 30,000 NMWL (Millipore, Billerica, USA). O separado foi analisado por espectrofotômetro a 306 nm (Validação da metodologia analítica em Anexo B) (ROBYT; WHITE, 1990).

As análises foram realizadas em triplicata. Por esses métodos buscou-se determinar a concentração de RES não incorporado em NLSs, sendo a concentração de RES calculada, aplicando-se a média dos valores das áreas sob a curva de RES na equação da reta obtida pelas curvas analíticas métodos 1 e 2) ou verificando as absorvâncias resultantes (método 3), determinando-se a eficácia da encapsulação (EE%) de acordo com a equação 5:

$$EE\% = \frac{\text{quantidade inicial} - \text{concentração analítica}}{\text{quantidade inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

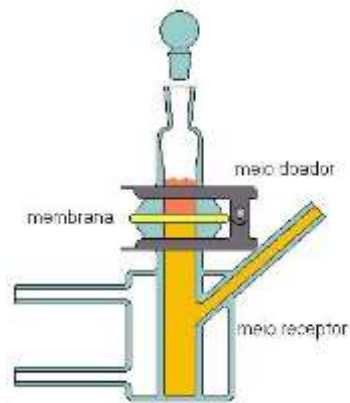
#### **4.2.5 Determinação do coeficiente de partição O/A do RES**

A determinação do coeficiente de partição do RES em octanol/água foi realizada conforme metodologia descrita por Mayorga e colaboradores (1996). Em tubos de ensaio foram adicionados 2 mL de água MiliQ e 100,0 mg de RES. Em seguida, foi adicionado 2 ml de octanol ao tubo e a mistura foi agitada com auxílio do vórtex durante 1 minuto e em seguida

centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, alíquotas de 100 µL da fase oleosa e 100 µL da fase aquosa foram coletados e colocados em balões de 10 mL e o volume final completado com acetonitrila. Em seguida, as amostras foram analisadas por CLAE. O coeficiente de partição (K<sub>p</sub>) foi calculado como sendo a razão entre a concentração de RES na fase oleosa e na fase aquosa.

#### **4.2.6 Estudo de liberação do RES *in vitro***

Os experimentos foram realizados utilizando células de difusão modificadas (células de Franz) com área de contato com a amostra de 1,77 cm<sup>2</sup> e volume no compartimento receptor de 7 mL. Uma membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 µm foi colocada entre o compartimento doador e receptor da célula de difusão, conforme demonstrado na Figura 6. Amostras das formulações (300 µL) foram colocadas sobre a membrana e o compartimento receptor foi preenchido com solução receptora composta por solução aquosa de polissorbato 80 a 2,0% (m/v), garantindo a condição *sink* durante todo o ensaio (DETONI *et al.*, 2012). A solução receptora foi agitada e mantida a 32 ± 2 °C por banho circulante a 300 rpm. Seis células de difusão foram utilizadas nos experimentos (DETONI *et al.*, 2009). Amostras da solução receptora foram coletadas nos intervalos de 5, 15 e 30 min e 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 e 24 horas para avaliar a cinética de liberação, sendo que o mesmo volume da solução receptora fresca foi repostado. A quantificação de RES na solução receptora foi realizada por CLAE, utilizando a curva analítica obtida na validação do método.



**Figura 6.** Imagem ilustrativa (Spellglass®) da célula de Franz utilizada para os ensaios de liberação e permeação do RES.

#### 4.2.7 Estudo de permeação cutânea *in vitro* do RES em peles de modelo animal

Para o ensaio de permeação cutânea do RES foram utilizadas as mesmas condições de análise utilizadas no ensaio de liberação. Entretanto ao invés da membrana de acetato de celulose, foram utilizadas peles de orelhas de porco obtidas em abatedouro e processadas logo após o abate do animal. As orelhas foram limpas com água corrente e posteriormente dessecadas com ajuda de tesoura e bisturi. Vasos sanguíneos, gordura e tecidos não desejados foram retirados, sendo que somente a derme e a epiderme foram isoladas. Uma porção da pele foi acondicionada entre o compartimento doador e o receptor da célula de Franz, de forma que o estrato córneo foi mantido em contato com a formulação e a derme em contato com a solução receptora (PRIMO *et al.*, 2008). Amostras da solução receptora foram coletadas nos intervalos de 5, 15 e 30 minutos e 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 e 24 horas e armazenadas a -20 °C. A quantificação de RES na solução receptora foi realizada por CLAE, utilizando a curva analítica obtida na validação do método. As peles submetidas ao estudo de permeação foram limpas com algodão embebido em água destilada e avaliadas quanto à retenção.

#### **4.2.8 Avaliação da retenção cutânea *in vitro* do RES**

A pele de porco exposta à permeação foi limpa e realizado o *tape stripping*, no qual 15 fitas adesivas foram coladas na epiderme da pele do animal e removidas, com o objetivo de retirar a epiderme do animal e quantificar a substância ativa que não permeou a pele. Assim, essas fitas foram colocadas em tubos de ensaio contendo 5,0 mL de metanol. Os tubos foram então colocados no vórtex para a homogeneização das amostras durante 2 minutos e colocados em ultrassom por 30 minutos. As amostras foram filtradas e a quantificação de RES foi realizada por CLAE, utilizando a curva analítica obtida na validação do método.

Além disso, as peles foram picotadas e adicionadas em tubos de ensaio contendo 5,0 ml de metanol, os quais foram homogeneizados com auxílio do vórtex durante 2 minutos e então triturados com a ajuda de Turrax. Este homogenado foi levado ao ultrassom durante 30 minutos, agitado em agitador de tubos e centrifugado durante 7 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi filtrado utilizando membrana com poros de 0,45 µm (ROSA *et al.*, 2003). A quantificação de RES foi realizada por CLAE, utilizando a curva analítica obtida na validação do método.

#### **4.2.9 Avaliação despigmentante *in vitro* do RES incorporado em NLS**

Foi realizado o ensaio da reação enzimática da tirosinase utilizado por Kobayashi *et al.* (1995) e Khanon *et al.* (2000). Foram utilizadas 2 condições diferentes. Na primeira condição do ensaio, em cada poço das microplacas, foram adicionados 10,0 µL de solução aquosa de tirosinase (120 U/mL), 70 µL de solução tampão pH 6,8 e 70 µL de solução aquosa de tirosina (0,3 mg/mL). A estes poços, foram adicionados 60 µL de água (controle) ou 60 µL de NLS sem fármaco (branco) ou 60 µL de dispersão de NLS-RES ou 60 µL de RES livre ou 60 µL de ácido

kójico em diferentes concentrações (5,0 µg/mL; 4,0 µg/mL; 3,0 µg/mL; 2,5 µg/mL; 1,25 µg/mL; 0,625 µg/mL e 0,3125 µg/mL). Dessa forma, teve-se um volume final de 210 µL por poço. A absorbância foi medida a 492 nm em leitor espectrofotométrico de microplacas de 96 poços (Thermoplate) no início da reação (leitura no tempo zero). As microplacas foram então incubadas a 30 ± 1° C, por 120 minutos. Os dados foram registrados em um computador acoplado ao aparelho. A atividade inibitória foi obtida de acordo com a equação 6:

$$IA (\%) = [((C-T_0)-(S-T_0))/(C-T_0)] \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

sendo: IA = atividade inibitória; C = absorbância do controle a 492 nm; S = absorbância da amostra; T<sub>0</sub> = absorbância no tempo zero.

Para cada amostra foram realizadas 8 medidas. A porcentagem de atividade inibitória da enzima tirosinase obtida para NLS sem fármaco (branco), NLS-RES ou RES livre foi comparada àquelas obtidas pelo ácido kójico.

Na segunda condição do ensaio, em cada poço das microplacas foram adicionados 10,0 µL de solução aquosa de tirosinase (480 U/mL), 70 µL de solução tampão pH 6,8 e 70 µL de solução aquosa de tirosina (0,3 mg/mL). A estes poços foram adicionados 60 µL de água (controle) ou 60 µL de ácido kójico em diferentes concentrações (10,0 µg/mL; 5,0 µg/mL; 2,5 µg/mL; 1,25 µg/mL e 0,625 µg/mL). Dessa forma, teve-se um volume final de 210 µL por poço. A absorbância foi medida a 492 nm em leitor espectrofotométrico de microplacas de 96 poços (Thermoplate) no início da reação (leitura no tempo zero). As microplacas foram incubadas a 30 ± 1° C, durante 60 minutos. Os dados foram registrados em um computador acoplado ao aparelho. A atividade inibitória foi obtida de acordo com a equação descrita



anteriormente. A concentração correspondente à atividade inibitória de 50% (AI<sub>50</sub>) do ácido kójico foi calculada a partir da equação da reta, obtida da relação porcentagem de atividade inibitória pela concentração.

#### **4.2.9.1 Determinação da concentração correspondente à atividade inibitória 50% do RES e NLS-RES usando tirosinase com concentração de 480 U/mL**

Em uma microplaca de 96 poços foi adicionados 10,0 µL de solução aquosa de tirosinase (480 U/mL), 70 µL de solução tampão pH 6,8 e 70 µL de solução aquosa de tirosina (0,3 mg/mL). Posteriormente, foram adicionadas soluções de NLS sem fármaco (branco), NLS-RES ou RES livre em diferentes concentrações (5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 20,0 µg/mL; 40,0 µg/mL; 80,0 µg/mL). Dessa forma, teve-se um volume final de 210 µL por poço. A absorbância foi medida a 492 nm em leitor espectrofotométrico de microplacas de 96 poços (Thermoplate) no início da reação (leitura no tempo zero). As microplacas foram incubadas a 30 ± 1° C, durante 60 minutos. Os dados foram registrados em um computador acoplado ao aparelho. A atividade inibitória foi obtido de acordo com a equação anteriormente descrita e os valores foram comparados aos obtidos para o ácido kójico.

#### **4.2.10 Forma de análise dos resultados**

Os resultados obtidos referentes aos ensaios de determinação do diâmetro médio das NLSs, análise do potencial zeta, análise de robustez para a validação da metodologia analítica, bem como os ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*, foram submetidos à análise estatística para detecção de diferenças significativas entre as amostras. Foram realizados testes com nível de significância de 5%, visando determinar o tipo de distribuição dos dados

amostrais, bem como o grau de homogeneidade. Para isso, os dados foram compilados em software Origin 12.5, sendo considerados gráficos de probabilidade normal, distribuições que seguem, aproximadamente, o padrão de uma linha reta. Com isso, a distribuição pode ser considerada “não normal”, quando a distribuição dos pontos à direita fica abaixo da linha reta determinada pelo resto dos pontos (FREUND; SIMON, 2000). A partir da verificação da normalidade, realizou-se a análise de variância ANOVA, seguidos de Teste de Tukey, para os dados paramétricos, pois permite a análise de amostras múltiplas, e o teste de Kruskal-Wallis, ou teste H, para os dados não-paramétricos (ANDRADE, 2008).

## V. RESULTADOS & DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento das NLSs

Os resultados de desenvolvimento e caracterização das NLS obtidas pelo método de homogeneização a alta pressão associada ou não a sonicação estão descritas no Anexo A. As NLS obtidas por sonicação apresentaram menor diâmetro e menor índice de polidispersidade, sendo selecionadas para o desenvolvimento deste projeto. Foram desenvolvidas 4 formulações, conforme demonstrado na Tabela 1, as quais foram acrescidas ou não de 0,1% de RES.

**Tabela 1.** Formulações desenvolvidas.

	Concentrações (%)							Água Mili Q
	Ácido esteárico	Estearato poli- oxietileno 40	Fosfatidilcolina de soja	Poloxamer 407	Metil- parabeno	Propil- parabeno	RES	
<b>F1</b>	5,0	---	---	3,5	0,18	0,02	---	qsp*
<b>F2</b>	5,0	---	1,2	3,5	0,18	0,02	---	qsp*
<b>F3</b>	---	5,0	---	3,5	0,18	0,02	---	qsp*
<b>F4</b>	---	5,0	1,2	3,5	0,18	0,02	---	qsp*
<b>F1.RES</b>	5,0	---	---	3,5	0,18	0,02	0,1	qsp*
<b>F2.RES</b>	5,0	---	1,2	3,5	0,18	0,02	0,1	qsp*
<b>F3.RES</b>	---	5,0	---	3,5	0,18	0,02	0,1	qsp*
<b>F4.RES</b>	---	5,0	1,2	3,5	0,18	0,02	0,1	qsp*

\*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

As formulações foram sonicadas durante 20 minutos (500 W e 47% de amplitude) utilizando banho de gelo durante o preparo e centrifugadas para a remoção do titânio que pode

ser desprendido no processo de sonicação. Após, as formulações foram caracterizadas e avaliou-se a estabilidade física das mesmas, empregando a determinação do diâmetro médio, da polidispersidade e do potencial zeta, os quais estão descritos na Figura 7 e Tabela 2, no item 5.2.1 e Tabela 3, no item 5.2.2, respectivamente.

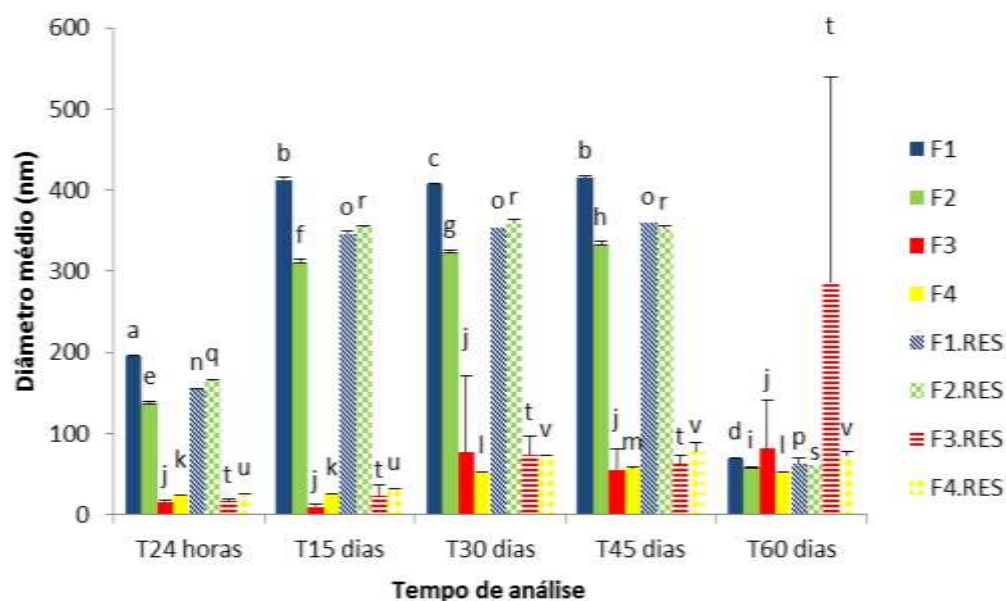
## **5.2 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas**

### **5.2.1 Determinação do diâmetro médio das NLSs**

Após preparadas, as formulações foram analisadas quanto ao diâmetro médio das partículas dispersas e a polidispersidade das mesmas. A Tabela 2 descrevem os resultados referentes às formulações desenvolvidas e analisadas após 24 horas, 15, 30, 45 e 60 dias após o preparo. Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi ( $p < 0,05$ ).

A Figura 8 demonstra a distribuição do diâmetro médio por intensidade referente às formulações analisadas no tempo T24 horas após o preparo. A Figura 9 demonstra a distribuição do diâmetro médio por intensidade referente às formulações analisadas no tempo de 60 dias após o preparo.

**Figura 7.** Média e desvio padrão do diâmetro médio (nm) das formulações preparadas através da sonicação e analisadas 24 horas, T15, T30, T45 e T60 dias após o preparo.

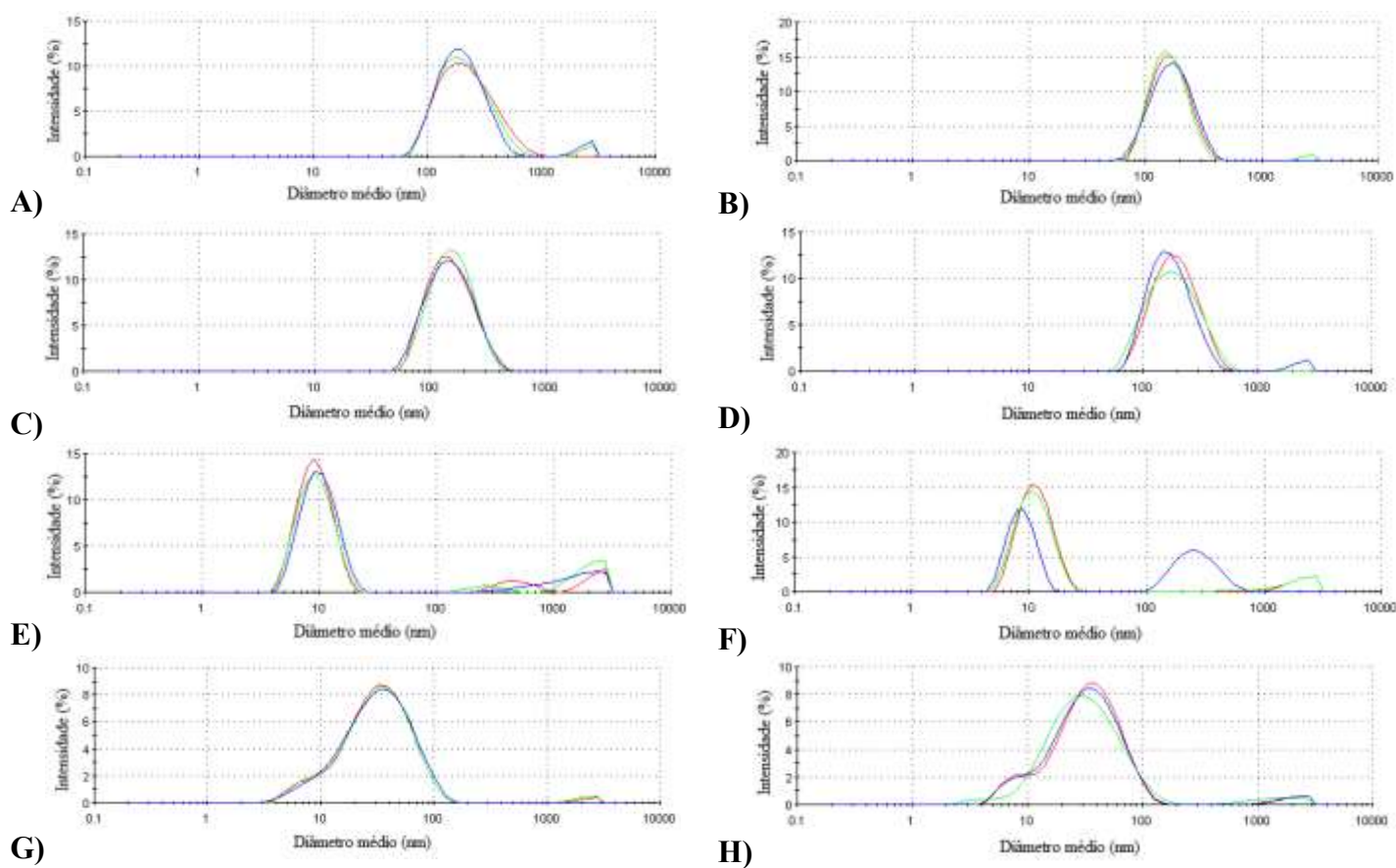


Símbolos iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

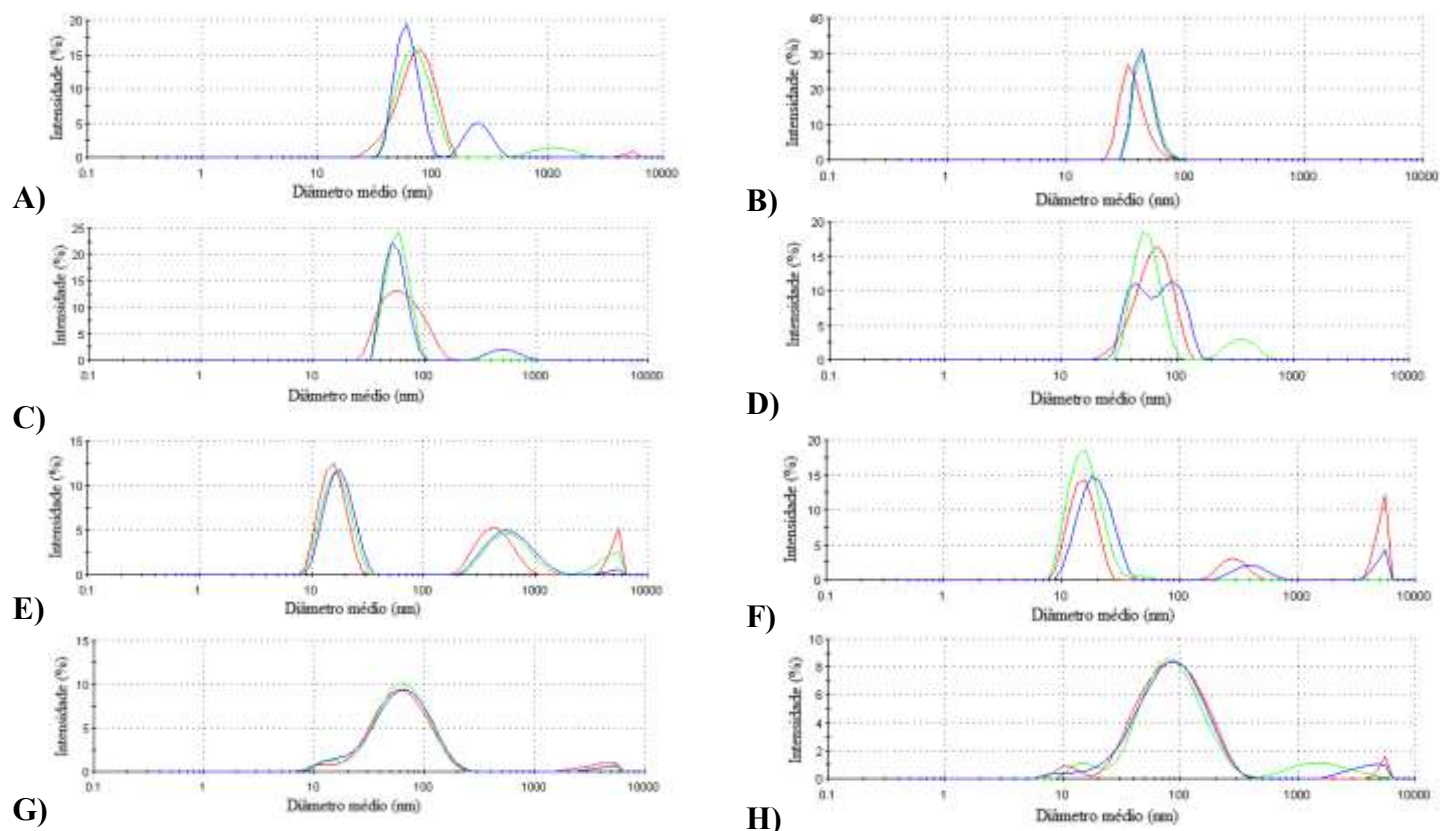
**Tabela 2.** Média e desvio padrão do índice de polidispersidade (PdI) das formulações preparadas através da sonicação e analisadas 24 horas, T15, T30, T45 e T60 dias após o preparo.

Formulações	T24 horas	T15 dias	T30 dias	T45 dias	T60 dias
F1	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>a</sup>
F2	0,16 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>b</sup>
F3	0,21 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,23 ± 0,04 <sup>c/d</sup>	0,27 ± 0,07 <sup>c/d</sup>	0,37 ± 0,08 <sup>c/d</sup>	0,39 ± 0,03 <sup>d</sup>
F4	0,37 ± 0,003 <sup>e</sup>	0,32 ± 0,03 <sup>e/f</sup>	0,34 ± 0,02 <sup>e/f</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>e/f</sup>	0,30 ± 0,04 <sup>f</sup>
F1.RES	0,14 ± 0,02 <sup>g</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>g</sup>	0,12 ± 0,03 <sup>g</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>g</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>g</sup>
F2.RES	0,20 ± 0,02 <sup>h</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>h</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>h</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>i</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>i</sup>
F3.RES	0,26 ± 0,18 <sup>j</sup>	0,17 ± 0,12 <sup>j</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>j</sup>	0,29 ± 0,08 <sup>j</sup>	0,42 ± 0,23 <sup>j</sup>
F4.RES	0,37 ± 0,003 <sup>k</sup>	0,44 ± 0,03 <sup>k</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>k</sup>	0,42 ± 0,04 <sup>k</sup>	0,39 ± 0,03 <sup>k</sup>

Símbolos iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8.** Distribuição do diâmetro médio por intensidade das nanopartículas analisadas no tempo 24 horas após o preparo, sendo: A) formulação F1; B) formulação F1.RES; C) formulação F2; D) formulação F2.RES; E) formulação F3; F) formulação F3.RES; G) formulação F4 e H) formulação F4.RES.



**Figura 9.** Distribuição do diâmetro médio por intensidade das nanopartículas analisadas no tempo 60 dias após o preparo, sendo: A) formulação F1; B) formulação F1.RES; C) formulação F2; D) formulação F2.RES; E) formulação F3; F) formulação F3.RES; G) formulação F4 e H) formulação F4.RES.

Verificou-se que, em relação ao diâmetro médio das partículas (Figura 7), as formulações preparadas com estearato de polioxietileno (40) acrescidas ou não de RES (F3; F4; F3.RES e F4.RES) foram as que apresentaram menor diâmetro médio, quando analisadas 24 horas após o preparo.

Todas as formulações testadas não demonstraram estabilidade em relação ao diâmetro médio (nm) das nanopartículas formadas, pois sofreram alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) durante os 60 dias de análise. O diâmetro médio (nm) das partículas demonstrou valores que variaram de  $69,80 \pm 0,12$  nm a  $412,77 \pm 3,10$  nm para a formulação

F1,  $58,53 \pm 0,46$  a  $333,03 \pm 3,99$  nm para a formulação F2,  $9,87 \pm 3,41$  nm a  $81,20 \pm 59,48$  nm para a formulação F3 e  $24,60 \pm 0,15$  a  $57,47 \pm 1,50$  para a formulação F4 (Figura 7). Estas mesmas formulações, após a adição de RES (F1.RES, F2.RES, F3.RES e F4.RES), apresentaram diâmetro médio de  $62,81 \pm 0,42$  nm a  $359,13 \pm 10,70$  nm para a formulação F1.RES,  $60,83 \pm 0,79$  nm a  $358,60 \pm 4,75$  nm para a formulação F2.RES,  $16,48 \pm 3,17$  nm a  $140,30 \pm 30,12$  nm para a formulação F3.RES e  $25,80 \pm 0,23$  nm a  $78,07 \pm 10,79$  nm para a formulação F4.RES (Figura 7). Embora tenha-se observado alterações no diâmetro médio das formulações durante o armazenamento, não foram observadas alterações organolépticas e macroscópicas nos 60 dias de estudo.

As formulações F1, F2, F2.RES e F1.RES apresentaram aumento de duas vezes no diâmetro médio inicial tanto para as formulações sem a adição do RES (formulações F1 e F2), quanto para as formulações acrescidas de RES (F1.RES e F2.RES), passando de  $\sim 200$  nm para  $\sim 400$  nm a formulação F1 e  $\sim 155$  nm para  $\sim 350$  nm a formulação F2, F1.RES e F2.RES (Figura 7).

As formulações F3 e F3.RES sofreram variações de até nove vezes no diâmetro médio, variando entre  $9,87 \pm 3,41$  nm a  $81,20 \pm 59,48$  nm para a formulação F3 e  $16,48 \pm 3,17$  nm a  $140,30 \pm 30,12$  nm para a formulação F3.RES (Figura 7).

Para as formulações F4 e F4.RES, após 15 dias, observou-se aumento de duas vezes do diâmetro inicial para a formulação F4 e de 3 vezes para a formulação F4.RES, passando de  $\sim 25$  nm para  $\sim 50$  nm, para a formulação F4 e de  $\sim 27$  nm para  $\sim 75$  nm para a formulação F4.RES, conforme demonstrado na Figura 7.

Verificou-se ainda que as formulações F1, F2, F1.RES e F2.RES após 60 dias de armazenamento apresentaram redução no diâmetro médio das partículas quando comparado



com demais tempos, sendo que este evento pode estar relacionado à precipitação das partículas de diâmetro maior, sendo detectadas apenas partículas menores.

Verifica-se pela Figura 8E, F, G e H que as formulações F3, F3.RES, F4 e F4.RES, respectivamente, apresentaram ampla distribuição no diâmetro médio por intensidade no tempo 24 horas após o preparo, indicando presença de mais de uma população de partículas na formulação. Isso pode indicar a presença de uma mistura de estruturas, como NLS e micelas. A presença de hidrocarbonetos presentes no estearato de polioxietileno (40) pode ter contribuído para este quadro, pois os polioxietilenos contribuem positivamente para a formação micelar (BARRY; EINI, 1976). O mesmo não ocorreu para as formulações F1, F1.RES, F2 e F2.RES, conforme observado na Figura 8A, B, C e D, respectivamente, sendo que as formulações apresentaram distribuição homogênea, indicando a predominância de uma população de tamanho de partícula.

Após estocagem das formulações durante 60 dias, pode-se verificar na Figura 9 que todas as formulações apresentaram ampla distribuição no diâmetro médio por intensidade das partículas, indicando que durante o armazenamento pode ter ocorrido aglomeração das partículas presentes nas formulações (JIANG; OBERDÖRSTER; BISWAS, 2009).

As alterações no diâmetro das partículas podem ter ocorrido devido à estocagem das formulações em frascos de vidro transparentes. Estudo conduzido por Freitas e Müller (1998) verificou que formulações de NLS armazenadas em embalagem de vidro transparente apresentaram aumento no diâmetro médio das partículas após 24 horas de armazenamento. Neste período, não foram possíveis observar alterações macroscopicamente. Após 3 dias, as amostras ainda apresentam-se visivelmente homogêneas, mas houve floculação após a diluição das mesmas com água. Após 7 dias houve um aumento acentuado no diâmetro médio das partículas (em torno de 90%) e a viscosidade foi visivelmente aumentada. Após 14 dias, todas

as amostras estavam completamente sólidas, não sendo possível determinar o diâmetro médio das partículas. Os autores sugerem o armazenamento de formulações contendo NLS em frascos âmbar.

O tamanho de partícula ideal para a permeação da substância ativa é de até 700 nm. Entretanto, são encontrados na literatura científica estudos demonstrando que partículas com outros tamanhos também permeiam a pele humana (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004). Schaefer e colaboradores (1990) demonstraram que partículas poliméricas com diâmetro na faixa de 3 a 10  $\mu\text{m}$  apresentaram permeação seletiva através dos ductos foliculares, enquanto que partículas maiores que 10  $\mu\text{m}$  permaneceram sobre a superfície cutânea. Todavia, partículas de outros tamanhos também demonstraram permear através da pele, como, por exemplo, partículas de poliestireno de 20 nm (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004).

O tamanho das partículas é substancial para a permeação cutânea (KÜCHLER *et al.*, 2009). Shim e colaboradores (2004) aplicaram nanopartículas poliméricas contendo minoxidil com diâmetro médio de 40 e 130 nm em orelha suína e compararam a quantidade permeada do fármaco. Os resultados sugeriram que nanopartículas com diâmetros menores facilitaram a permeação cutânea de minoxidil para o compartimento receptor, entretanto a quantidade de minoxidil retida na pele não foi dependente do tamanho das nanopartículas (SHIM *et al.*, 2004). Isso provavelmente ocorre, pois NLSs de diâmetro menores formam um filme homogêneo na superfície cutânea, diminuindo a perda transepidermal de água (TEWL), o que favorece a penetração cutânea de fármacos (DE VRINGER; DE RONDE, 1995). Além disso, a presença de lipídios nas NLSs pode apresentar uma ação solubilizante do estrato córneo, promovendo assim maior facilidade do fármaco em atravessar a barreira cutânea (LEE; TOJO, 1998).

O índice de polidispersidade é um parâmetro para definir a distribuição do tamanho das partículas. Amostras com ampla distribuição de tamanho das partículas apresentam índice de polidispersão  $> 0,7$  (NIDHIN *et al.*, 2008). Para um índice de polidispersidade de 0,4 considera-se distribuição de tamanho de partícula heterogêneo e presença de aglomerados na dispersão. Já para um índice de polidispersidade de 0,2 considera-se menor polidispersidade das partículas (KRAUSE *et al.*, 2010).

Verifica-se nos resultados (Tabela 2) que as formulações F1 e F2, acrescidas ou não de RES, apresentaram índice de polidispersidade próximo de 0,2, demonstrando ser formulações com partículas monodispersas, quando comparada com as demais formulações testadas, que utilizaram a mesma metodologia de preparo, a sonicação. Além disso, a análise estatística dos resultados demonstrou que essas formulações são estáveis em relação ao PdI durante o tempo de estudo ( $p < 0,05$ ).

Pode-se observar também que a formulação F3 apresentou índice de polidispersidade próximo à 0,2 até 45 dias após o preparo. Após esse período observou-se aumento significativo no índice de polidispersidade, podendo indicar presença de aglomerados na formulação. O mesmo não pode ser observado para a formulação F3.RES, a qual apresentou índice de polidispersidade estável durante todo o período de estudo, conforme demonstrado na Tabela 2.

A formulação F4, acrescida ou não de RES, apresentou índice de polidispersidade estável até 45 dias de estocagem para a formulação F4 e até 30 dias para a formulação F4.RES (Tabela 2). Porém, tais formulações apresentaram valores de PdI  $> 0,3$ , o que indica amostra mais polidispersa, podendo causar a formação de aglomerados (KRAUSE *et al.*, 2010).

Schwarz e colaboradores (1994) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas constituídas de Dynasan<sup>®</sup> 112 (trilaurina), Lipoid<sup>®</sup> S75 (lecitina de soja com 68% de fofatidilcolina) e poloxamer 188 e observaram que o aumento na concentração de

fosfatidilcolina de soja promoveu redução no diâmetro médio das partículas. Porém, estes mesmo pesquisadores observaram que o aumento da concentração de fosfatidilcolina de soja promoveu aumento no índice de polidispersidade das formulações.

Os resultados obtidos demonstram semelhança aos resultados encontrados por Schwarz e colaboradores (1994) em relação ao diâmetro médio das partículas apenas para as formulações F1, que ao ser acrescido de fosfatidilcolina de soja (F2), apresentou redução do diâmetro médio das partículas. Porém, o mesmo não foi observado para essa formulação após a adição de RES, bem como para as formulações preparadas com estearato de polioxietileno (40), que apresentaram aumento no diâmetro médio das partículas após a adição de fosfatidilcolina de soja. Em relação ao índice de polidispersidade das formulações após o acréscimo de fosfatidilcolina de soja, pode-se observar que todas as formulações apresentaram aumento do PdI, com exceção apenas da formulação F1, que apresentava  $PdI = 0,23 \pm 0,01$  e após a adição da fosfatidilcolina de soja (F2) apresentou  $PdI = 0,16 \pm 0,02$  (Tabela 2). Esse resultado também foi observado por Akhtar & Pathak (2012), que verificaram que altas concentrações de fosfatidilcolina de soja promoveram índice de polidispersidade menores, provavelmente devido à ação tensoativa dessa substância.

Um estudo demonstrou que a fosfatidilcolina de soja pode apresentar concentrações diferentes de ácidos graxos mono e poli-insaturados. O aumento das taxas de ácidos graxos monoinsaturados aumenta o tamanho das partículas. Além disso, a taxa de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa diminui o tamanho das partículas e aumenta o índice de polidispersidade (ZHANG *et al.*, 2012).

### **5.2.2 Análise do potencial zeta**

O potencial zeta é gerado quando uma partícula carregada eletricamente é dispersa em um meio e resulta na formação de um potencial elétrico entre a superfície da partícula e o meio, devido ao fato de que alterações na superfície da partícula atraem íons contrários (THIELBEER; DONALDSON; BRADLEY, 2011). A avaliação do potencial zeta é uma estratégia importante para a estabilidade de sistemas coloidais (ZHANG *et al.*, 2008). Embora dados suportam que um modesto potencial de superfície é suficiente para estabilizar dispersões contendo partículas maiores que 1  $\mu\text{m}$ , na prática os resultados não são satisfatórios (MCGOWN; PARFITT; WILLIS, 1965).

A estabilização de dispersões tem sido descrita tradicionalmente através da estabilização eletrostática. Porém, há outras formas de estabilização de dispersões preparadas com substâncias não iônicas, como, por exemplo, a estabilização estérica. A estabilização estérica é um mecanismo pelo qual certas substâncias, como os polímeros hidrossolúveis, inibem a floculação de suspensões. Estas substâncias envolvem o material suspenso e impedem a sua união. Sistemas estabilizados estericamente tendem a permanecer bem disperso, mesmo em condições em que o potencial zeta das superfícies é reduzido a valores próximos a zero (NAPPER, 1977).

A Tabela 3 descreve os resultados obtidos para a análise do potencial zeta para as formulações desenvolvidas. Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Média e desvio padrão do potencial zeta das formulações preparadas através da sonicação e analisadas 24 horas, T15, T30, T45 e T60 dias após o preparo.

Formulações	T24 horas	T15 dias	T30 dias	T45 dias	T60 dias
F1	-1,54 ± 0,31 <sup>a</sup>	-1,34 ± 0,08 <sup>a</sup>	-2,07 ± 1,25 <sup>a</sup>	-1,03 ± 0,59 <sup>a</sup>	-6,45 ± 1,03 <sup>b</sup>
F2	-2,22 ± 1,12 <sup>c</sup>	-4,01 ± 3,55 <sup>c</sup>	-2,82 ± 2,02 <sup>c</sup>	-2,33 ± 0,64 <sup>c</sup>	-3,51 ± 0,75 <sup>c</sup>
F3	-0,58 ± 0,65 <sup>d</sup>	-2,09 ± 0,48 <sup>d/e</sup>	-3,25 ± 0,58 <sup>e</sup>	-3,49 ± 0,63 <sup>e</sup>	-2,80 ± 0,51 <sup>e</sup>
F4	-1,55 ± 0,37 <sup>f</sup>	-1,42 ± 0,38 <sup>f</sup>	-1,44 ± 0,42 <sup>f</sup>	-1,64 ± 0,38 <sup>f</sup>	-1,91 ± 0,10 <sup>f</sup>
F1.RES	-2,60 ± 1,27 <sup>g</sup>	-1,85 ± 0,68 <sup>g</sup>	-0,70 ± 0,13 <sup>g</sup>	-1,49 ± 0,41 <sup>g</sup>	-4,52 ± 3,78 <sup>g</sup>
F2.RES	-2,66 ± 0,33 <sup>h</sup>	-2,49 ± 0,39 <sup>h</sup>	-2,73 ± 0,96 <sup>h</sup>	-1,13 ± 0,20 <sup>h</sup>	-2,19 ± 0,99 <sup>h</sup>
F3.RES	-2,58 ± 1,69 <sup>i</sup>	-1,24 ± 0,49 <sup>i</sup>	-3,30 ± 1,26 <sup>i</sup>	-1,68 ± 0,33 <sup>i</sup>	-1,78 ± 0,47 <sup>i</sup>
F4.RES	-2,63 ± 0,79 <sup>j</sup>	-1,89 ± 0,42 <sup>j</sup>	-2,05 ± 0,14 <sup>j</sup>	-2,13 ± 0,25 <sup>j</sup>	-2,51 ± 0,21 <sup>j</sup>

Símbolos iguais indicam medias sem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A redução no potencial zeta está relacionada com a redução da estabilidade física. Um potencial zeta de no mínimo  $\pm 60$  mV é requerido para uma excelente estabilidade e de no mínimo  $\pm 30$  mV para uma boa estabilidade física (FREITAS; MÜLLER, 1998). A diminuição no potencial zeta e na repulsão eletrostática resulta em desestabilização das formulações. A análise do potencial zeta mostra que a estabilização elétrica não é suficiente para promover NLS estáveis, sendo necessário associar um mínimo de estabilização eletrostática, que está em um potencial zeta de, aproximadamente, 8 a 9 mV. Potenciais zetas abaixo de 6 mV promovem SLN fisicamente instáveis (ZIMMERMANN; MÜLLER, 2001).

Os resultados demonstraram que todas as formulações apresentaram potencial zeta menores que 6 mV, conforme demonstrado na Tabela 3. Desta forma, as formulações selecionadas não apresentam um potencial zeta adequado para uma boa estabilização estática

da NLS. Este resultado já era esperado, uma vez que, o potencial zeta avalia a repulsão eletrostática das partículas e as matérias-primas utilizadas para o preparo das NLSs são não-iônicas. Para a preparação das nanopartículas foi utilizado um estabilizador estérico (poloxâmero 407), desta forma espera-se alcançar uma maior estabilidade física por arranjo estérico e não repulsão electrostática (LOURENÇO *et al.*, 1996). Após a adição da substância ativa RES não houve alteração significativa no potencial zeta das NLSs.

Além disso, verificou-se que não houve alterações significativas no valor do potencial zeta das formulações durante o tempo de estudo, com exceção apenas da formulação F3, a qual apresentou alterações estatisticamente significativas ( $p < 0.05$ ) no valor do potencial zeta após 15 dias de ensaio (Tabela 3).

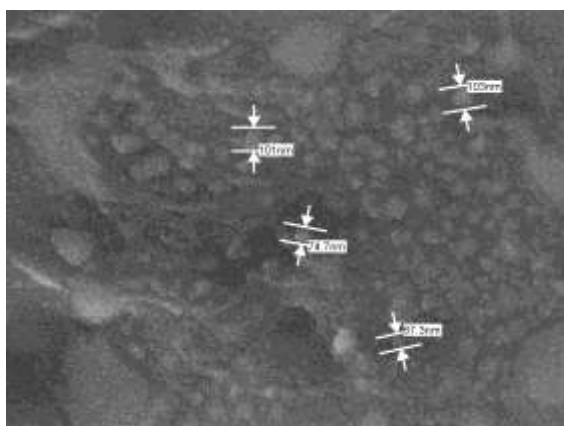
### **5.2.3 Análise microscópica das NLS e NLS-RES**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido muito empregada para avaliar a morfologia das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Por esta técnica, o microscópio eletrônico de varredura acelera os elétrons por meio de um filamento de tungstênio. Após a emissão, os elétrons interagem com as amostras, são acelerados e novamente capturados por lentes magnéticas, formando a imagem (NAGATANI *et al.*, 1987).

O aumento máximo conseguido pelo MEV fica entre o microscópio ótico e o microscópio eletrônico de transmissão (MET). Porém, a grande vantagem do MEV em relação ao microscópio ótico é a sua resolução, na ordem de 2 a 5 nm, enquanto o ótico está em 5  $\mu\text{m}$ . Comparando o MEV com o MET, a grande vantagem do MEV está na facilidade de preparo das amostras (NAGATANI *et al.*, 1987).

A microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (MEV-FEG) faz uma varredura mais ampla utilizando um feixe de elétrons, disparado através de um canhão que estabelece o campo elétrico no vácuo (NAGATANI *et al.*, 1987).

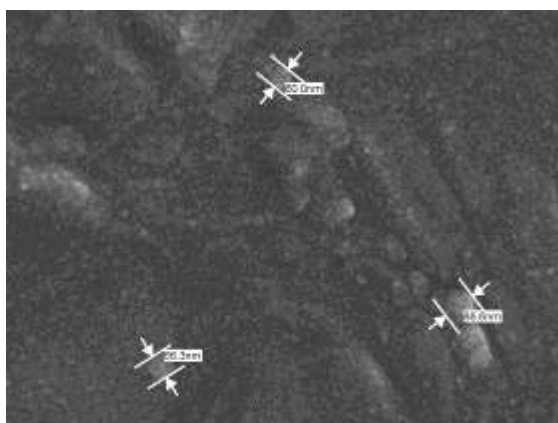
A Figura 10 a Figura 17 demonstram as imagens obtidas por MEV-FEG das formulações selecionadas.



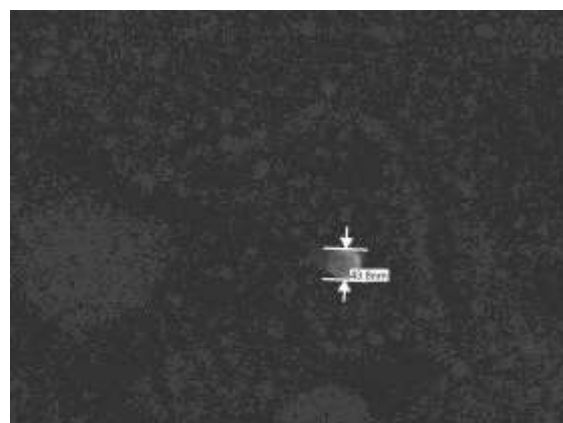
**Figura 10.** Fotomicrografia da formulação F1 (50.000x).



**Figura 11.** Fotomicrografia da formulação F1.RES (100.000x).



**Figura 12.** Fotomicrografia da formulação F2 (80.000x).

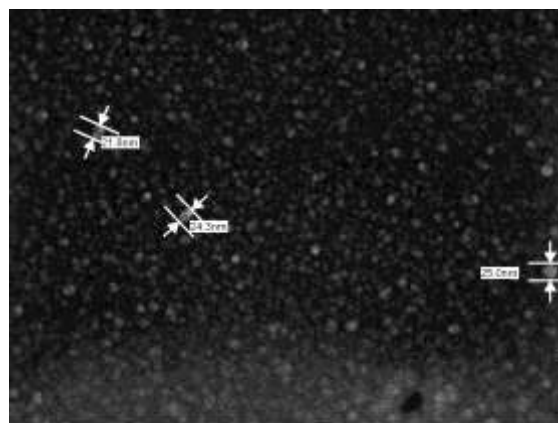


**Figura 13.** Fotomicrografia da formulação F2.RES (150.000x).





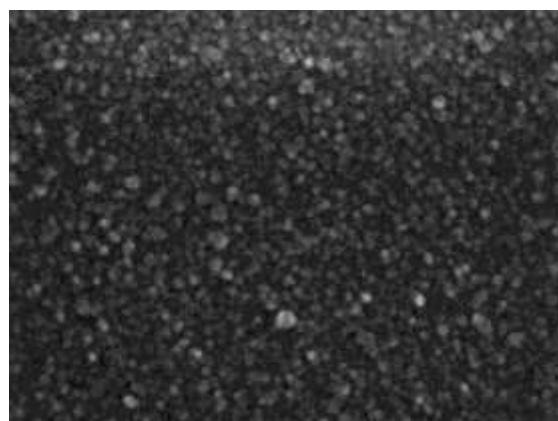
**Figura 14.** Fotomicrografia da formulação F3 (150.000x).



**Figura 15.** Fotomicrografia da formulação F3.RES (150.000x).



**Figura 16.** Fotomicrografia da formulação F4 (150.000x).



**Figura 17.** Fotomicrografia da formulação F4 (200.000x).

As fotomicrografias demonstraram a formação de nanopartículas regulares e com baixa dispersão no diâmetro médio (Figura 10 e Figura 17). As fotomicrografias obtidas não demonstraram a formação de cristais. Cristais podem ocorrer quando o composto a ser nanoencapsulado está presente em excesso no meio de dispersão ou devido a uma grande polidispersão no tamanho das nanopartículas obtidas.

Os resultados da microscopia sugerem que o método de produção por sonicação aplicado neste trabalho produz material com distribuição nanométrica de partículas com morfologias bem distintas. Nas figuras observa-se formação de nanopartículas com diâmetros entre 20 a 150

nm, resultados um pouco menor do que os encontrados na análise de diâmetro médio pela técnica de correlação de fótons, também conhecida como espalhamento de luz dinâmico (DLS). Isso ocorre, pois durante o preparo da amostra para a análise por MEV-FEG há a evaporação da água presente no sistema, essa secagem provoca aparentemente o encolhimento das partículas de modo que o diâmetro médio determinado por MEV é menor ao determinado por DLS (DUBES *et al.*, 2003).

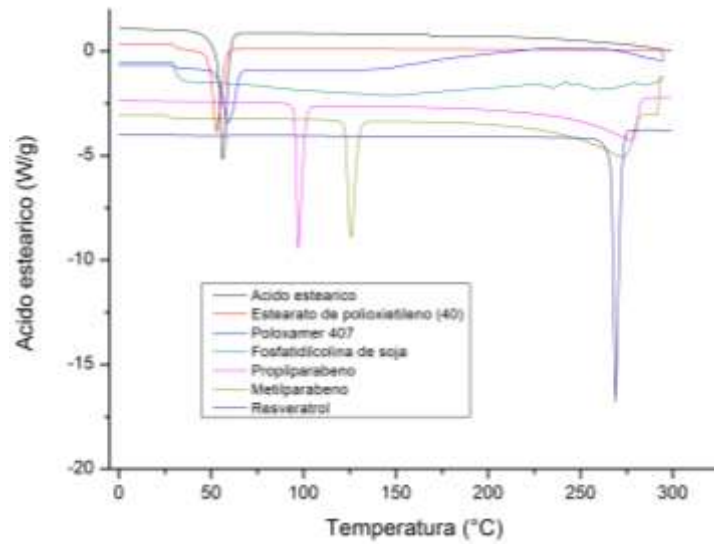
#### **5.2.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)**

A caracterização detalhada de nanopartículas lipídicas sólidas é importante durante a pesquisa e desenvolvimento, pois assegura as propriedades desejadas a partir do sistema obtido (LIRA *et al.*, 2007b). A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma das técnicas analíticas empregadas para este propósito, por promover informações estruturais das NLS úteis no entendimento da capacidade de incorporação do fármaco e perfil de liberação (BUNJES; UNRUH, 2007).

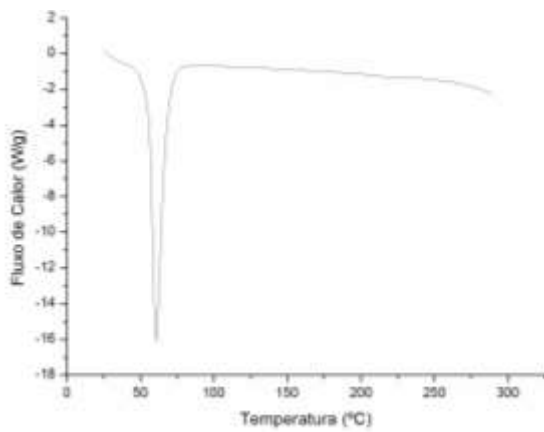
Métodos termoanalíticos são utilizados extensivamente para avaliar as propriedades físicas de fármacos, os quais incluem temperaturas de fusão e de vaporização e as suas entalpias correspondentes, as transições vítreas, pressão de vapor, bem como o estudo de compatibilidade e estabilidade dos componentes de preparações farmacêuticas (LIRA *et al.*, 2007b).

As Figura 18 a Figura 30 apresentam a curva de DSC das matérias-primas utilizadas para o preparo das nanopartículas lipídicas sólidas, bem como a curva das formulações desenvolvidas. Para as formulações foram realizados 3 ciclos de análise, no qual o ciclo 1 é o aquecimento, para verificar a fusão e a desidratação das amostras, o ciclo 2 é o resfriamento à temperaturas

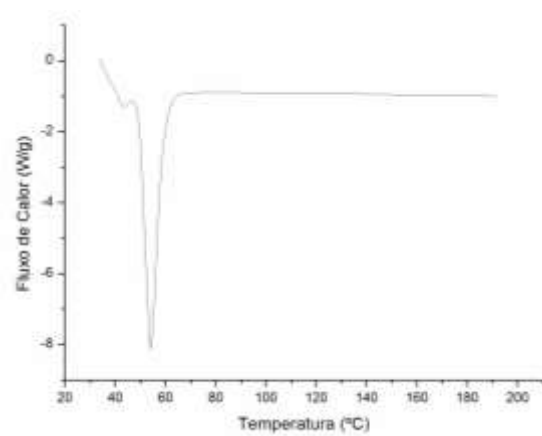
sub-zero para observar se o processo de fusão é reversível, e o ciclo 3, que ocorre o reaquecimento, para observar se a formulação funde na mesma temperatura inicial.



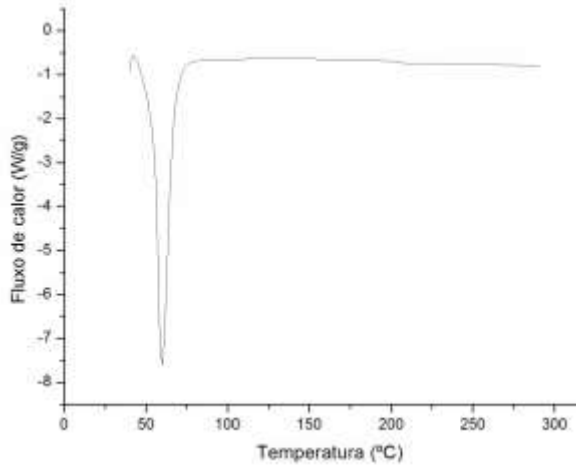
**Figura 18.** Termograma de aquecimento das matérias-primas utilizadas no preparo das NLSs.



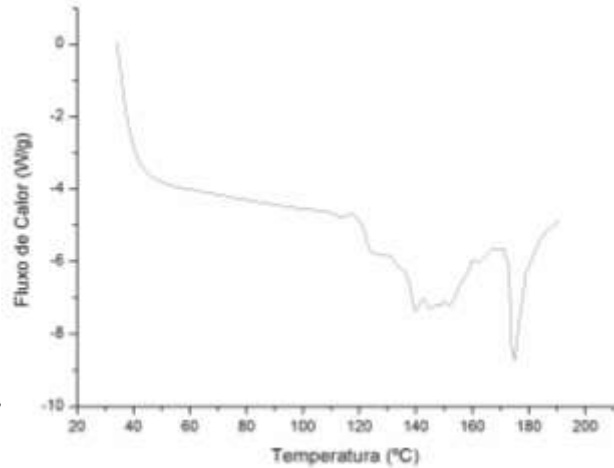
**Figura 19.** Termograma da mistura física ácido esteárico + RES (aquecimento).



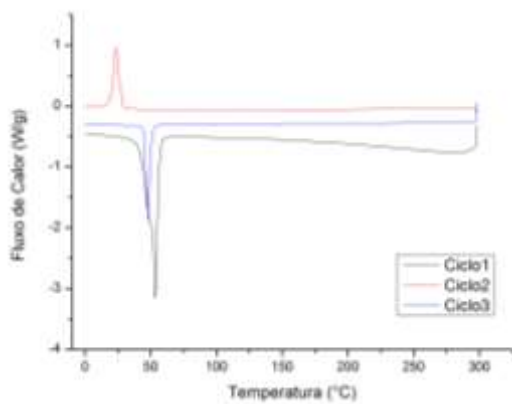
**Figura 20.** Termograma da mistura física estearato de polioxietileno (40) + RES (aquecimento).



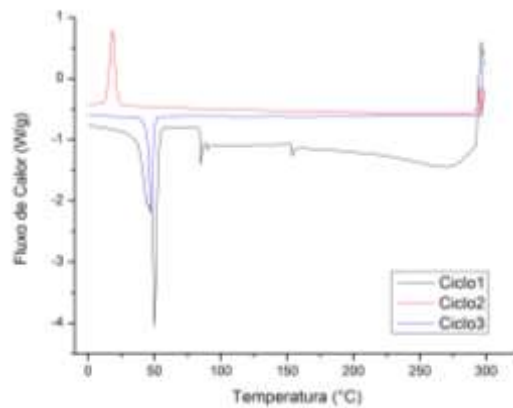
**Figura 21.** Termograma da mistura física poloxamer 407 + RES (aquecimento).



**Figura 22.** Termograma da mistura física fosfatidilcolina de soja + RES (aquecimento).



**Figura 23.** Termograma da formulação F1, após 3 ciclos de análise (aquecimento, resfriamento e reaquecimento).



**Figura 24.** Termograma da formulação F1.RES, após 3 ciclos de análise (aquecimento, resfriamento e reaquecimento).

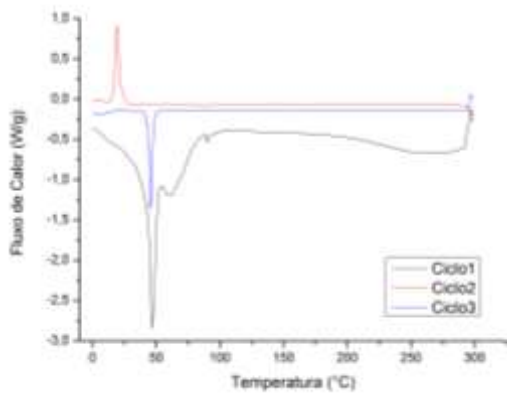


Figura 25. Termograma da formulação F2, após 3 ciclos de análise (aquecimento, resfriamento e reaquecimento).

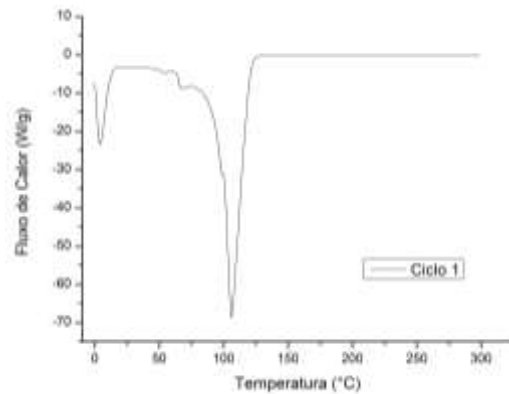


Figura 26. Termograma da formulação F2.RES.\*

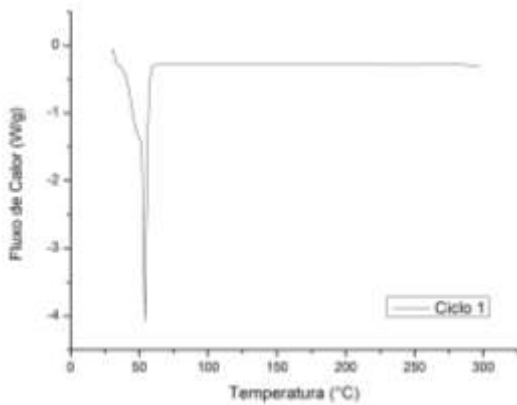


Figura 27. Termograma da formulação F3.\*

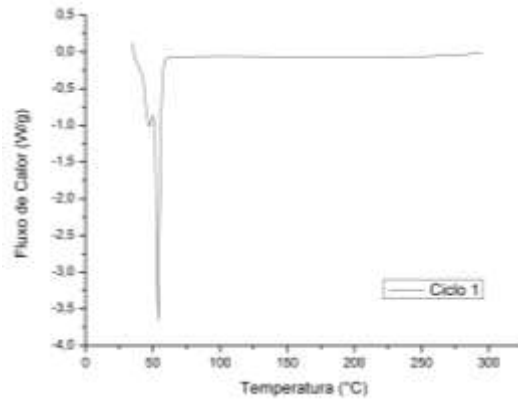


Figura 28. Termograma da formulação F3.RES.\*

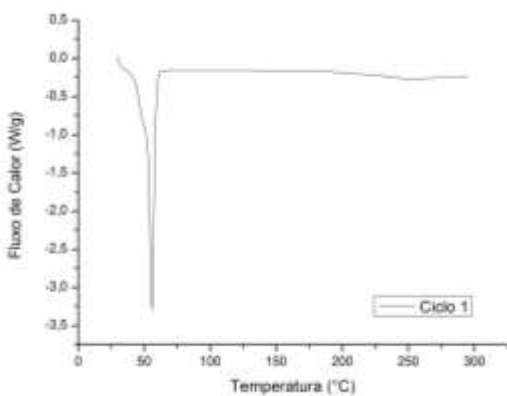


Figura 29. Termograma da formulação F4.\*

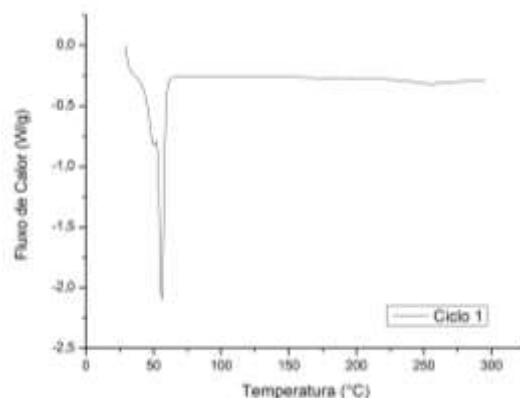


Figura 30. Termograma da formulação F4.RES.\*

\*Para todas as formulações foram realizadas as análises nos 3 ciclos. Porém, só foram representados nas figuras os ciclos que apresentaram eventos térmicos. As formulações, cujos termogramas estão representados nas Figura 23 a Figura 30, apresentaram eventos térmicos apenas no ciclo 1 de análise (aquecimento).

A fusão do estearato polioxietileno (40) isolado ocorreu a 54°C (Figura 18), evento diferente do descrito na literatura, que está em torno de 38°C (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006). O deslocamento do evento térmico para temperaturas maiores sugerem mudança da forma cristalina para o polimorfo A (ALMEIDA *et al.*, 2010).

O polimorfismo é definido como a habilidade de um cristal apresentar diferentes unidades estruturais, originados a partir de uma variedade de conformações moleculares. O polimorfismo é uma das mais importantes rotas da degradação física, a qual afeta a estabilidade do doseamento de sólidos, pois, embora sejam quimicamente idênticos, os polimorfos geralmente apresentam diferentes propriedades termodinâmicas, como ponto de fusão, padrão de difração de raio-X e solubilidade (SINHA *et al.*, 2010).

Verificou-se que a fosfatidilcolina de soja durante o aquecimento não apresentou pico de fusão (Figura 18). Isto ocorre possivelmente pelo fato da fosfatidilcolina não apresentar ponto de fusão aparente. Além disso, quando não se observa pico de fusão na curva de DSC, provavelmente a substância encontra-se em maior proporção no estado amorfo (CIDES *et al.*, 2006).

A curva de DSC do poloxamer 407 (Figura 18) apresentou evento endotérmico de fusão bem definido em 59 °C e apresentou um evento de degradação próximo a 150 °C. Um estudo verificou que o poloxamer 407 pode reduzir picos endotérmicos de algumas substâncias, pois o mesmo pode solubilizá-las e o pico endotérmico, indicando a forma amorfa, deixa de existir na curva de DSC das formulações (NEPAL; HAN; CHOI, 2010).

Os termogramas resultantes da análise do metil e propilparabenos (Figura 18) consistem de um único evento endotérmico atribuído ao processo de fusão. Os eventos endotérmicos exibiram um pico máximo a 129 °C e 97°C, respectivamente, correspondentes ao metilparabeno e ao propilparabeno. Os eventos observados no estudo DSC são consistentes com os valores dos pontos de fusão relatados na literatura de 124°C e 97,8°C, para o metilparabeno e propilparabeno, respectivamente (LIRA *et al.*, 2007a; RUDYANTO *et al.*, 2003).

As misturas físicas do material graxo com o RES, bem como dos tensoativos (poloxamer 407 e fosfatidilcolina de soja) não apresentam pico de fusão relacionado ao RES, o que sugere que esta substância está no seu estado amorfo e não cristalino, durante a análise. Além disso, a ausência de pico de fusão pode ser decorrente a não detecção do RES pelo equipamento, uma vez que as misturas foram realizadas na proporção de matéria-prima utilizada para a realização do ensaio de DSC.

Verifica-se que não aparecem nos termogramas das formulações F1 a F4 (Figura 23, Figura 25, Figura 27 e Figura 29) e F3.RES e F4.RES (Figura 28 e Figura 30) os picos endotérmicos referentes ao metilparabeno e ao propilparabeno. Também, em todos os termogramas das formulações F1 a F4 e F1.RES a F4.RES (Figura 23 a Figura 30) não apareceram os picos endotérmicos do RES. Estes fenômeno pode ser devido ao fato de que nas formulações os mesmos encontram-se em maior proporção no estado amorfo do que no estado cristalino ou altas concentrações de carreadores lipídicos tenha impedido a detecção dos picos de fusão destas substâncias na curva de DSC ou ainda o ácido esteárico, o estearato de polioxietileno (40) e o poloxamer 407, por apresentarem pontos de fusão menores que o metil e o propilparabeno, poderiam dissolvê-los, impedindo a verificação de seus estados cristalinos (NEWA *et al.*, 2007; BIKIARIS *et al.*, 2005).

Nas Figura 23 a Figura 25, que representam o DSC das formulações F1, F1.RES e F2, pode-se observar que a formulação apresentou eventos térmicos nos 3 ciclos de análise, sendo evidente o pico endotérmico (temperatura de fusão) no ciclo 1, bem como o pico exotérmico de recristalização no ciclo 2 e o pico de fusão após o reaquecimento no ciclo 3. Isso demonstra que as formulações após o aquecimento e resfriamento conseguiram retornar ao seu estado cristalino inicial. O mesmo não foi observado para as formulações F2.RES; F3; F3.RES; F4 e F4.RES, as quais não apresentaram picos exotérmicos referentes a recristalização.

Pode ser observado mais de um pico endotérmico para as formulações F1.RES e F2 (Figura 24 e Figura 25), sendo que esse evento pode estar relacionado com a presença de algumas mudanças no evento térmico na formulação, o mesmo pode ser observado no pico endotérmico das formulações F3.RES e F4.RES (Figura 28 e Figura 30).

Na Figura 26, correspondente à formulação F2.RES, verifica-se um deslocamento do pico exotérmico para 106°C, parecendo ter ocorrido um aumento no tamanho médio de estruturas cristalinas e/ou remoção de defeitos estruturais, levando a um deslocamento da primeira transição endotérmica para temperaturas mais altas.

Possíveis interações entre os componentes e os diferentes adjuvantes podem ser observadas utilizando o DSC. Entretanto, diferenças entre as curvas de DSC dos componentes individuais e das misturas não necessariamente correspondem a uma incompatibilidade. Para confirmar se há uma incompatibilidade substancial é importante associar outras técnicas analíticas, como, por exemplo, a termogravimetria (TG) e a termogravimetria derivada (DTG) (LIRA *et al.*, 2007a).



### **5.3 Validação de metodologia analítica para quantificação de RES por CLAE**

Um estudo conduzido por Vian e colaboradores (2005) demonstrou que solução contendo *trans*-resveratrol padrão após ser exposta à luz solar, durante 1 hora, causou a conversão parcial do *trans*-resveratrol na forma *cis*-resveratrol (80-90% do *trans*-resveratrol foi convertido à *cis*-resveratrol). A intensidade da diminuição do pico cromatográfico referente ao *trans*-resveratrol foi proporcional à área do novo pico cromatográfico correspondente ao *cis*-resveratrol. O *cis*-resveratrol pode apresentar benefícios para a saúde, entretanto apresenta menor atividade biológica (BERTELLI *et al.*, 1996).

Desta forma, buscou-se o desenvolvimento de uma metodologia analítica capaz de separar as 2 formas isoméricas, *trans*- e *cis*-resveratrol, uma vez que a forma isomérica *trans*-resveratrol é a forma isomérica que apresenta maior atividade biológica e é de interesse no estudo.

A identificação dos analitos foi realizada seguindo-se o difundido por Pragst e colaboradores (2004) para análises cromatográficas por CLAE-DAD, que associa os tempos de retenção à avaliação dos espectros de absorção na região do ultravioleta gerados pelo arranjo de diodos para cada pico. Os espectros de UV gerados para o *trans*-resveratrol e para o *cis*-resveratrol pudessem ser diferenciados facilmente, devido à alta resolução, à exatidão e à sensibilidade no comprimento de onda, ampla faixa do espectro (de 200 a 400 nm) e comparação computacional com biblioteca de espectros (ORTIZ; ANTUNES; LINDEN, 2010).

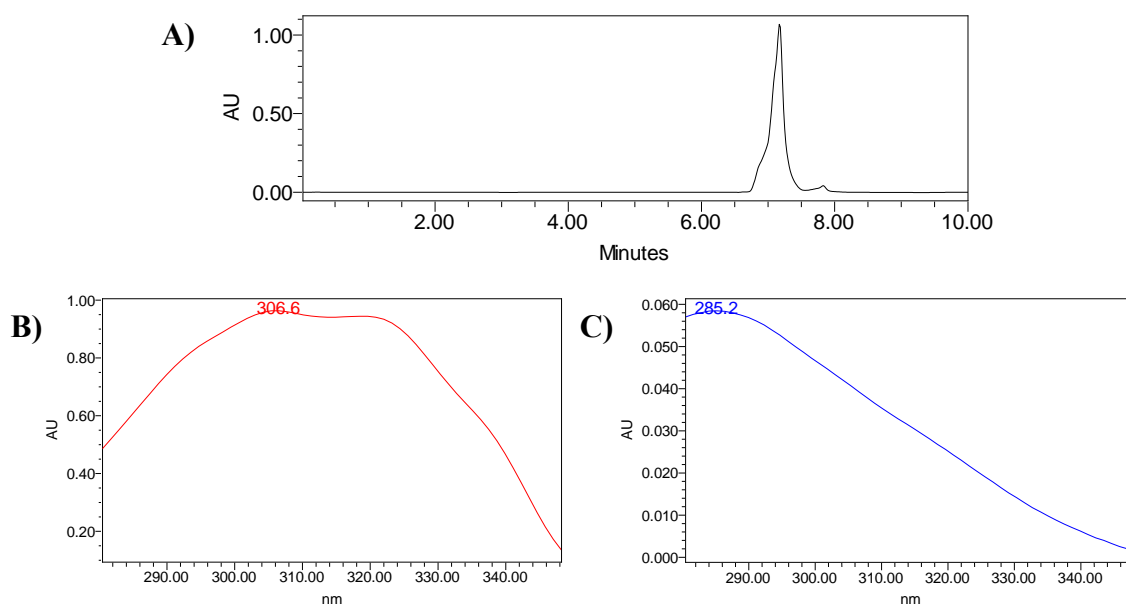
A identificação de um espectro é feita pela comparação matemática com espectros da biblioteca mediante o cálculo vetorial do índice de similaridade, que inclui todos os pares de dados na faixa de comprimentos de onda medidos (por exemplo, 181 pontos de comparação no caso da faixa de 200 a 380 nm, não somente mínimos e máximos) seguindo um procedimento

que independe da concentração (PRAGST; HERZLER; ERXLEBEN, 2004; ORTIZ; ANTUNES; LINDEN, 2010).

A Tabela 4 demonstra o tempo de retenção das amostras analisadas, a resolução dos picos e o  $\lambda$  máximo ( $\lambda$ ) para cada analito. A análise cromatográfica está demonstrada na Figura 31a e o espectro de absorção ultravioleta do *trans*- e *cis*-resveratrol está demonstrada nas Figura 31b e Figura 31c, respectivamente.

**Tabela 4.** Tempo de retenção, resolução dos picos e  $\lambda$  máximo para o *trans*- e *cis*-resveratrol.

	Tempo de retenção (min.)	Resolução	Comprimento de onda		$\lambda$ Máximo
			Inicial	Final	
<i>Trans</i> -resveratrol	7,194	1,2	280 nm	350 nm	306,6 nm
<i>Cis</i> -resveratrol	7,847	1,2	280 nm	350 nm	285,2 nm



**Figura 31.** A) Separação cromatográfica obtida com monitoramento em 280-350 nm: calibrador 100% de *trans*-resveratrol após 1 hora de exposição ambiente a radiação ultravioleta (50  $\mu$ g/mL); B) espectro UV do pico com retenção em 7,194 min (*trans*-resveratrol); C) espectro UV do pico com retenção 7,847 min (*cis*-resveratrol) gerados pelo arranjo de diodos.

O espectro do *trans*-resveratrol (Figura 31b) apresenta  $\lambda$  máximo de absorção em 306,6 nm, enquanto que o espectro do *cis*-resveratrol (Figura 31c) exibe  $\lambda$  máximo em 285,2 nm. Estes resultados estão de acordo com a literatura, a qual descreve que o *cis*-resveratrol apresenta espectro de absorção UV em 285 nm e o *trans*-resveratrol apresenta espectro de absorção UV em 306 nm (BONDA; ZHANG; PAVLOVIC, 2011; ROSSI *et al.*, 2012).

A resolução dos picos cromatográficos é uma medida da separação tendo em conta a largura dos picos. Para completa resolução do pico o valor ideal é maior que 1,2 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Os resultados demonstraram que os picos apresentam resolução de 1,2.

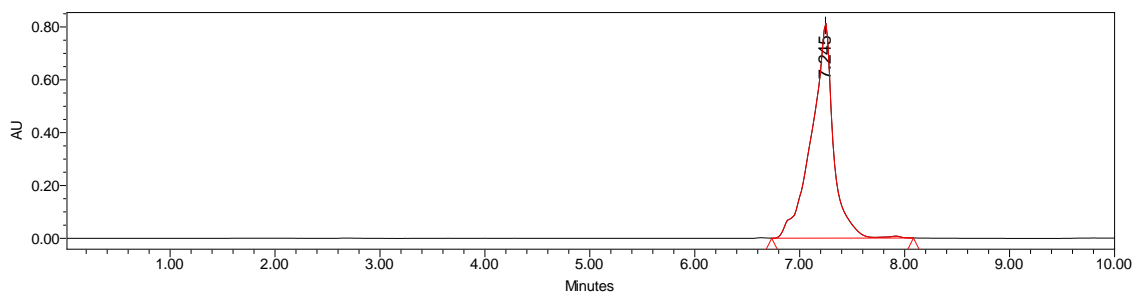
Para a validação da metodologia analítica para a quantificação do *trans*-resveratrol foi fixado o comprimento de onda de 306,6 nm.

### **5.3.1 Linearidade**

A linearidade é a capacidade de uma metodologia de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra. A Figura 33 demonstra a curva analítica do *trans*-reveratrol.

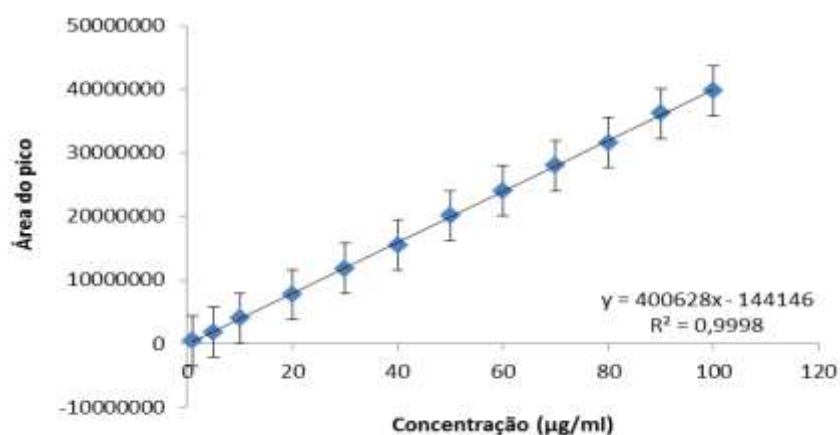
A determinação da linearidade e intervalo foi executada em triplicata, através da elaboração de curvas analíticas. Segundo a RDC 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva analítica é de 0,99 (BRASIL, 2003), sendo obtido um valor médio de 0,9998 no experimento.

A curva obtida demonstrou que os resultados da metodologia analítica são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, obtida correlacionando a área do cromatograma (Figura 32).



**Figura 32.** Cromatograma obtido com injeção de uma diluição teórica de 30 µg/mL de *trans*-resveratrol.

A faixa de trabalho (concentração na alíquota de análise 1 a 100 µg/mL) possibilitou detectar o *trans*-resveratrol dentro dos limites de interesse e a resposta do detector de ultravioleta conservou-se linear. A Figura 33 representa a curva analítica utilizada na conversão entre as áreas obtidas e a concentração do ativo.



**Figura 33.** Curva analítica do *trans*-resveratrol por CLAE.

### 5.3.2 Precisão

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos da repetibilidade do método, a qual foi verificada pela análise de 3 concentrações (1, 50 e 100 µg/mL) em triplicata (n=3) de cada concentração, em 3 dias diferentes.

**Tabela 5.** Resultados da avaliação da precisão para a repetibilidade (precisão intra-corrída).

<b>ÁREA DOS PICOS</b>									
<b>Concentração</b>	<b>1º Dia</b>			<b>2º Dia</b>			<b>3º Dia</b>		
<b>teórica</b>	<b>1 µg/mL</b>	<b>50 µg/mL</b>	<b>100µg/mL</b>	<b>1 µg/mL</b>	<b>50 µg/mL</b>	<b>100 µg/mL</b>	<b>1 µg/mL</b>	<b>50 µg/mL</b>	<b>100µg/mL</b>
n=1	370310	20970062	41786394	430628	20087368	39838394	389666	21768477	43019155
n=2	391908	20983577	41692736	414141	20044882	39788771	389952	21385194	43035381
n=3	378346	20988688	41821031	412993	20220107	39703528	388743	21704146	43172668
Média	380188	20980775	41766720	419254	20117452	39776897	389454	21619272	43075734
Desvio Padrão	10916	9623	66372	9867	91404	68212	632	205253	84338
DPR	2,87	0,05	0,16	2,35	0,45	0,17	0,16	0,95	0,19

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos da precisão intermediária do método, a qual foi verificada através da análise de 3 concentrações (1, 50 e 100 µg/mL) em triplicata (n=3) de cada concentração em 3 dias diferentes.

**Tabela 6.** Resultados da avaliação da precisão intermediária (precisão inter-corridas).

<b>ÁREA DOS PICOS</b>			
<b>Concentração teórica</b>	<b>1 µg/mL</b>	<b>50 µg/mL</b>	<b>100µg/mL</b>
Média dia 1	380188	20980776	41766720
Média dia 2	419254	20117452	39776898
Média dia 3	389454	21619272	43075735
Média	396298	20905833	41539784
Desvio Padrão	19150	662346	1439947
DPR	4,83	3,17	3,47

O desvio padrão relativo (DPR) obtido na avaliação da precisão do método é adequado (menor que 5,0%), podendo atribuir ao método analítico alto grau de concordância entre os resultados quando realizados sob as mesmas condições experimentadas neste estudo.

### **5.3.3 Exatidão**

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos da recuperação do método, a qual foi verificada através da análise de 3 concentrações (5, 50 e 100 µg/mL) em triplicata (n=3) de cada concentração.

**Tabela 7.** Resultados da avaliação da exatidão.

<b>CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL</b>			
<b>Concentração teórica</b>	<b>5 µg/mL</b>	<b>50 µg/mL</b>	<b>100µg/mL</b>
n = 1	4,62	50,50	99,67
n = 2	4,63	50,39	99,46
n = 3	4,63	50,83	99,80
Média	4,626	50,57	99,64
Desvio Padrão	0,009	0,228	0,170
Exatidão	92,53 ± 0,19	101,15 ± 0,46	99,64 ± 0,170

\* Através da equação da reta ( $y = 400651x - 145812$ ) determinou-se a concentração experimental.

A exatidão obtida na avaliação do método é adequado, podendo atribuir ao método analítico alto grau de concordância entre os resultados quando realizados sob as mesmas condições experimentadas neste estudo.

#### **5.3.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)**

Os valores calculados para o limite de detecção e de quantificação demonstram alta sensibilidade e especificidade do método para a determinação do *trans*-resveratrol. Foram encontrados 1,29 µg/mL para o limite de detecção e 4,29 µg/mL para o limite de quantificação (Tabela 8).

Não foi necessário realizar testes experimentais para comprovar os resultados calculados, visto que o método desenvolvido não tem o objetivo de detectar concentrações mínimas, como, por exemplo, em um estudo forense. A finalidade principal do método consiste em analisar formulações farmacêuticas que apresentam quantidades terapêuticas de *trans*-resveratrol.

**Tabela 8.** Resultados do limite de detecção e de quantificação do *trans*-resveratrol.

	Equação da reta	Inclinação (a)	Intercepto (b)
Dia 1	$y = 418390x - 422105$	418390	422105
Dia 2	$y = 395163x - 122243$	395163	122243
Dia 3	$y = 429356x - 106833$	429356	106833
Média		414303	217060
Desvio Padrão		17459	177741
LD		1,29 µg/mL	
LQ		4,29 µg/mL	

### 5.3.5 Robustez

A robustez é quantificação e a qualificação da habilidade do método em permanecer inalterado após pequenas flutuações deliberadas nas condições experimentais cromatográficas. A robustez do método pode ser medida através da avaliação do efeito sobre o tempo de retenção do pico, exatidão e valor DPR, obtidos após sofrer pequenas variações (SILVA *et al.*, 2012). A robustez foi verificada através da análise de uma solução de RES na concentração de 50 µg/mL, em triplicata (n=3), e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Resultados da robustez do método analítico cromatográfico para a quantificação do *trans*-resveratrol.

Parâmetros	Tempo de Retenção (min.)	Exatidão	DPR	
Fluxo	0,8 mL/min	$8,22 \pm 0,007^a$	$102,45 \pm 0,617^d$	$0,525^g$
	1,0 mL/min	$7,24 \pm 0,009^b$	$94,057 \pm 0,598^e$	$0,636^h$
	1,2 mL/min	$6,53 \pm 0,015^c$	$90,05 \pm 0,469^f$	$0,520^i$
Temperatura da coluna	25 °C	$7,24 \pm 0,009^j$	$94,06 \pm 0,598^m$	$0,64^o$
	30 °C	$7,15 \pm 0,100^k$	$91,76 \pm 0,235^n$	$0,26^p$
	35 °C	$7,06 \pm 0,006^l$	$93,24 \pm 0,648^n$	$0,70^p$

Símbolos iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



De acordo com a Tabela 9, foi observada alterações estatisticamente significativas após ter realizado pequenas variações nos parâmetros cromatográficos experimentais. Porém, as variações encontram-se dentre os valores permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que é de  $\pm 10\%$  para exatidão e  $5\%$  para DPR (BRASIL, 2003) Assim, o método pode ser considerado robusto.

#### **5.4 Quantificação do RES presente nas NLSs**

Inicialmente, realizou-se o ensaio de ultracentrifugação com a finalidade de sedimentar as nanopartículas formadas, coletar o sobrenadante e quantificar indiretamente a concentração de RES encapsulado. Após centrifugar as amostras, verificou-se que não houve a sedimentação das partículas formadas. Assim, o método não foi aplicável para o estudo da eficiência de encapsulação do RES nas formulações desenvolvidas.

Após, utilizou-se a filtração com membrana de diálise, buscando separar o RES encapsulado do RES livre. Para fármacos lipossolúveis é indicado o pré-tratamento da membrana, a fim de minimizar a retenção do fármaco pela membrana. Aplicou-se então, sobre a membrana pré-tratada, solução aquosa de polissorbato 80 a  $5,0\%$  e  $1\text{ mL}$  de solução aquosa de RES a  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ . Utilizou-se  $14\ 000\text{ rpm}$  e vários tempos de centrifugação, buscando atingir a recuperação de aproximadamente  $100\%$  do RES. Verificou-se que após a realização do ensaio, foi obtida baixa recuperação do RES, conforme demonstrado na Tabela 10. Assim, buscou-se a utilização de outra metodologia para a realização do ensaio.

**Tabela 10.** Validação do dispositivo com membranas de 10.000 NMWL (Millipore, Billerica, USA) para o ensaio de eficiência de encapsulação.

Concentração teórica	Concentração aferida	Concentração recuperada		
		15 min	30 min	1 hora
50,0 µg/mL	46,10 ± 6,83	Vol. insuficiente para análise.	2,69 ± 0,43	1,88 ± 0,16

Realizou-se a ultrafiltração. Para este teste, as amostras NLS com RES e sem o acréscimo de RES, para avaliar a seletividade do método, foram filtradas à vácuo, utilizando membrana de 30.000 NMWL (Millipore, Billerica, USA). O separado foi analisado por espectrofotômetro a 306 nm. Os resultados da validação da metodologia analítica para quantificação por espectrofotometria estão apresentados no Anexo B. Os resultados da análise do filtrado estão demonstrados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Análise do filtrado obtido por ultrafiltração para ensaio de eficiência de encapsulação.

Concentração (µg/mL)							
F1	F1.RES	F2	F2.RES	F3	F3.RES	F4	F4.RES
1,06 ± 0,10	0,57 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,33 ± 0,02	0,29 ± 0,04	6,79 ± 0,38	8,10 ± 0,40	9,08 ± 0,43

Verifica-se que o método de separação não foi eficaz, pois houve leitura tanto para a formulação sem RES (F1 a F4), quanto para as formulações acrescidas de RES (F1.RES a F4.RES), mostrando que parte das NLS foi capaz de atravessar a membrana e foi detectada nas análises.

Assim, todas as metodologias testadas não obtiveram resultados satisfatórios na separação do RES encapsulado do RES livre, não sendo possível a quantificação e a análise da eficiência de encapsulação.

Uma alternativa que pode ser utilizada para avaliar a eficiência de encapsulação do RES nas formulações desenvolvidas é a utilização da separação do RES livre por cromatografia de exclusão de tamanho, utilizando uma coluna de vidro empacotada com Sephadex.

### **5.5 Determinação do coeficiente de partição O/A do RES**

O coeficiente de partição O/A (log P) e a solubilidade em água de um fármaco apresenta grande influência no fluxo transdérmico, uma vez que moléculas de alta polaridade e de grande tamanho encontram dificuldade para penetração. Alto coeficiente de partição está relacionado com aumento no fluxo transdérmico (SWART *et al.*, 2005).

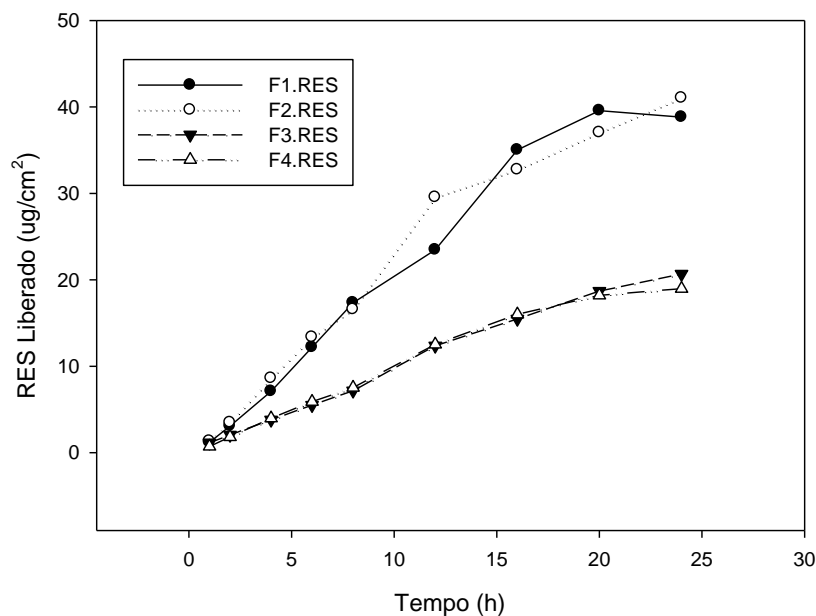
O estudo demonstrou que o valor do coeficiente de partição (Kp) óleo/água para o RES foi  $0,2798 \pm 0,0071$  e log Kp de 0,55. Estudos demonstram relação entre o fluxo dos componentes através da pele e o valor ótimo do coeficiente de partição (MAYORGA; PUISIEUX; COUARAZE, 1996). Surber e colaboradores (1993) demonstraram em estudo *in vitro* e *in vivo* que houve permeação de componentes com log Kp de no máximo 2 – 3. Desta forma, o RES apresenta tendências favoráveis para a permeação cutânea.

### **5.6 Estudo de liberação do RES *in vitro***

A liberação do fármaco das nanopartículas pode ocorrer por três diferentes mecanismos: (a) a liberação do fármaco da superfície das nanopartículas, (b) difusão do mesmo através da matriz maleável, e (c) a liberação do ativo por erosão do polímero. Na maioria dos casos, a liberação do fármaco ocorre por meio de um mecanismo, e a predominância de um deles depende da propriedade do polímero empregado para o preparo das nanopartículas (AGNIHOTRI *et al.*, 2004).

Os fármacos liberados por difusão passam por três estágios. Primeiramente, o solvente penetra dentro do sistema nanoparticulado, o que pode causar intumescimento da matriz. Após, ocorre à conversão do polímero do estado vítreo para o maleável e em seguida há a difusão do fármaco (AGNIHOTRI *et al.*, 2004).

Os perfis de liberação do RES nas diferentes formulações desenvolvidas são demonstrados na Figura 34 e o percentual de RES liberado das formulações desenvolvidas está representado na Tabela 12.



**Figura 34.** Perfil de liberação de RES em nanopartículas lipídicas sólidas após 24 horas de análises, sendo F1. RES; F2.RES; F3. RES e F4.RES.

**Tabela 12.** Percentual de RES liberado de nanopartículas lipídicas sólidas, F1. RES; F2.RES; F3. RES e F4.RES, após 24 horas de análise.

Formulações	Liberação do RES (%)
	24 horas
<b>F1.RES</b>	23,92 ± 1,36 <sup>a</sup>
<b>F2.RES</b>	26,63 ± 2,52 <sup>a</sup>
<b>F3.RES</b>	13,08 ± 2,10 <sup>b</sup>
<b>F4.RES</b>	12,30 ± 1,40 <sup>b</sup>

Símbolos iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A Tabela 12 demonstra que as taxas de liberação do RES para as formulações F1.RES e F2.RES não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si de acordo com os dados da análise estatística ( $p < 0,05$ ), assim como ocorreu com a formulação F3.RES e F4.RES (Figura 34b), demonstrando que a adição de fosfatidilcolina de soja na formulação não apresentou influencia sobre a liberação do RES da formulação.

As formulações desenvolvidas apresentaram liberação de RES somente após 1 hora de ensaio, sendo que a formulação F1.RES apresentou liberação de 23,92 ± 1,36%, a formulação F2.RES apresentou liberação de 26,63 ± 2,52%, a formulação F3.RES apresentou liberação de 13,08 ± 2,10% e a formulação F4.RES apresentou liberação de 12,30 ± 1,40% após 24 horas de ensaio (Tabela 12).

Pode-se verificar também que as formulações preparadas com ácido esteárico (Figura 34a) apresentaram taxas de liberação do RES maiores que as formulações preparadas com estearato de polioxietileno (40) (Figura 34b). Este resultado pode estar relacionado com o caráter mais hidrofóbico do ácido esteárico, que facilita a solubilização do RES, que é mais lipofílico e permite a sua liberação.

Existem algumas teorias e modelos matemáticos que descrevem a cinética de liberação do fármaco de sua forma farmacêutica, dentre os mais utilizados e que melhor descrevem o fenômeno de liberação de fármacos encontra-se os modelos de Higuchi, de cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem, de Weibull e de Korsmeyer-Peppas (COSTA & LOBO, 2001).

Takeru Higuchi (HIGUCHI, 1961; HIGUCHI, 1963) desenvolveu teoricamente vários modelos para a liberação de fármacos hidrossolúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes semisólidas e/ou sólidas. Foram obtidas relações matemáticas para partículas do fármaco homogeneamente dispersas em matriz uniforme, que se comporta como meio de difusão (COSTA, 2002). Porém, essa equação apresenta fortes limitações na interpretação dos mecanismos de liberação modificada, principalmente em sistemas que intumescem, pois estes podem ser erodíveis. Aplica-se essa equação com maior exatidão em matrizes unidimensionais pouco solúveis que não apresentem capacidade de intumescimento (TAHARA; YAMAMOTO; NISHIHATA, 1996; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

A cinética de ordem zero é aplicada a formas farmacêuticas que não sofrem desagregação e liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo; trata-se de um método ideal de liberação de fármaco para atingir uma ação farmacológica prolongada, já que a liberação é lenta (COSTA & LOBO, 2001).

As formas farmacêuticas que seguem a cinética de liberação de primeira ordem, como por exemplo, as que contêm fármacos hidrossolúveis em matrizes porosas, liberam o fármaco de forma proporcional à quantidade remanescente no seu interior, assim a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

O modelo de Weibull pode ser aplicado com sucesso em quase todos os tipos de curva de liberação e relaciona exponencialmente a fração do fármaco liberado. A equação de Weibull

expressa a quantidade acumulada de fármaco em função do tempo e deve ser aplicada aos dados dos primeiros 63,2% de liberação do fármaco (COSTA & LOBO, 2001; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Outro modelo baseia-se na equação semi-empírica proposta por Korsmeyer e colaboradores (KORSMEYER, PEPPAS, 1981; KORSMEYER *et al.*, 1983), utilizada para descrever a liberação do soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não-Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER, PEPPAS, 1987; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Os parâmetros calculados para os modelos matemáticos aplicados aos dados de liberação do RES são mostrados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Coeficiente de liberação *in vitro* do RES obtido, pelos de diferentes modelos matemáticos para as formulações F1.RES; F2.RES; F3.RES e F4.RES.

Modelos matemáticos	Valor r quadrado ( $r^2$ )			
	F1.RES	F2.RES	F3.RES	F4.RES
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	0,9680	0,9752	<b>0,9925</b>	0,9804
<b>Higuchi</b>	0,8469	0,8734	0,8516	0,8667
<b>Primeira Ordem</b>	0,9757	0,9814	<b>0,9939</b>	0,9788
<b>Weibull</b>	<b>0,9916</b>	<b>0,9939</b>	<b>0,9987</b>	<b>0,9983</b>
<b>Ordem Zero</b>	0,9700	0,9683	0,9123	0,9728

Baseado nos maiores valores de  $r^2$  ajustado, pode-se observar que na maioria dos casos, os modelos que retrataram mais adequadamente a liberação do RES foi o Weibull, indicando a ocorrência de um mecanismo complexo de liberação, envolvendo, simultaneamente, o relaxamento das cadeias poliméricas e a erosão do polímero durante a liberação do fármaco.

Estudo conduzido por Bhardwaj e Blanchardx (1996) comparou a difusão do peptídeo Melanotan-I em solução aquosa e solução aquosa acrescida de poloxamer 407. Os resultados obtidos por esses pesquisadores demonstraram que houve prolongamento das concentrações plasmáticas do peptídeo, devido à difusão mais lenta do MT-I a partir do gel formado na cavidade intraperitoneal. Assim, os pesquisadores concluíram que o poloxamer pode aumentar a eficácia terapêutica do peptídeo e outros fármacos por prolongar a sua ação.

Barzegar-Jalali e colaboradores (2008) compararam 13 modelos matemáticos de cinética de liberação de 32 fármacos em 106 formulações de nanopartículas. Os resultados obtidos mostraram que 3 modelos matemáticos, entre eles o modelo de Weibull, são superiores aos demais modelos no delineamento da cinética de liberação de nanopartículas. A justificativa teórica dada pelos pesquisadores, é que esses modelos conseguem relatar melhor os mecanismos complexos envolvidos na liberação de nanossistemas.

Verifica-se ainda que a formulação F3.RES apresentou cinética de liberação melhor representado por três modelos matemáticos, Weibull, primeira ordem e Korsmeyer-Peppas, sendo mais um indicativo da heterogeneidade estrutural da formulação, que possivelmente apresentou formação tanto de NLS como de estruturas micelares, também observadas na análise da distribuição do diâmetro médio por intensidade, demonstrada na Figura 8.

Além do polímero, o lipídeo utilizado para o preparo das nanopartículas lipídicas sólidas apresenta papel primordial para o delineamento da cinética de liberação do RES das nanopartículas, uma vez que é o lipídeo o responsável pelo encapsulamento do fármaco no sistema nanoestrutural. O ácido esteárico utilizados na formulação F1.RES e F2.RES forma uma matriz porosa que impede a saída do fármaco das nanopartículas. Entretanto, conforme o fármaco se dissolve, a porosidade da matriz aumenta, de modo que o fármaco pode ser liberado. Dados demonstram que o aumento da concentração de ácido esteárico na formulação



promove liberação modificada do fármaco, ao passo que aumento de polímero hidrofílico associado ao ácido esteárico promove solubilização da matriz, aumento da sua porosidade e consequente liberação do fármaco (GRASSI *et al.*, 2003).

A união da molécula de polioxietileno a grupamentos ésteres do ácido esteárico fazem com que os sistemas compactados possam ser dissolvidos por erosão progressiva, liberando flóculos de microcristais. O estearato de polioxietileno (40) é capaz de promover alta taxa de liberação de fármacos, devido ao aumento da solubilidade do fármaco em água. Assim, o estearato de polioxietileno (40) promove uma maior dispersão dos fármacos em sólidos, além de favorecer a liberação do mesmo por desintegração (KAUR; GRANT; EAVES, 1980).

### **5.7 Estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro* do RES em peles de modelo animal**

O ensaio de permeação cutânea tem como objetivo avaliar a habilidade de diferentes substâncias ativas permearem através da pele, utilizando como membrana modelo a pele da orelha de suínos ou pele humana proveniente de cirurgia plástica (HAWKINS; REIFENRATH, 1986; WAGNER *et al.*, 2001).

A utilização da pele suína para o estudo de doenças cutâneas humanas, bem como para os ensaios para o lançamento de um novo medicamento, se dá baseado na melhor similaridade anatômica, histológica e fisiológica à pele humana, quando comparado com outros animais (DICK; SCOTT, 1992).

O percentual de RES permeado através da pele suína após a aplicação de diferentes formulações estão demonstrados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Percentual de RES permeado, após 24 horas de análise.

<b>Formulações</b>	<b>Permeação do RES (%) após 24 horas</b>
<b>F1.RES</b>	45,26 ± 34,88 <sup>a</sup>
<b>F2.RES</b>	18,61 ± 16,99 <sup>b</sup>
<b>F3.RES</b>	33,76 ± 17,69 <sup>a</sup>
<b>F4.RES</b>	18,61 ± 16,99 <sup>b</sup>

Símbolos iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Pôde ser observado o aumento da quantidade de RES permeada com o tempo para todas as formulações. Após 24 horas de experimento, a quantidade média acumulada de RES permeado foi 45,26 ± 34,88% para a formulação F1.RES, 18,61 ± 16,99% para a formulação F2.RES, 33,76 ± 17,69% para a formulação F3.RES e 18,61 ± 16,99% para a formulação F4.RES (Tabela 14). Verifica-se que as formulações acrescidas de fosfatidilcolina de soja (F2.RES e F4.RES) apresentam menor permeação do RES quando comparado com as formulações que não continham fosfatidilcolina de soja em sua formulação (F1.RES e F3.RES), como demonstrado na Tabela 14.

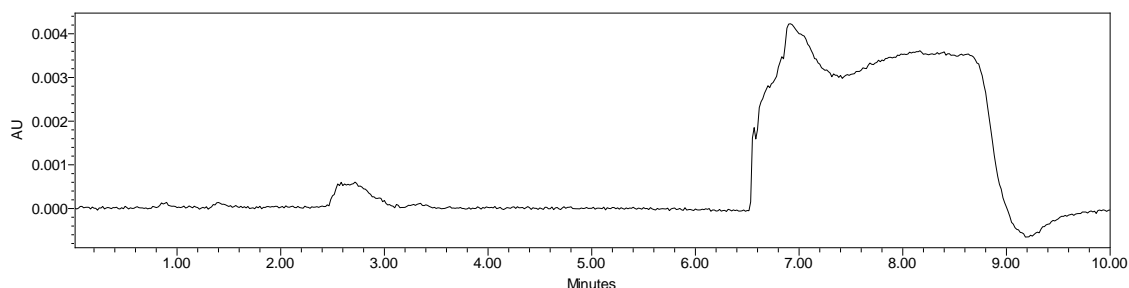
Bentley e colaboradores (1995, 1997) demonstraram que a presença de ureia ou fosfatidilcolina de soja como promotores da permeação cutânea influenciam o perfil de liberação e a retenção cutânea de fármacos lipofílicos em géis de poloxamer 407 (BENTLEY *et al.*, 1995, 1997). Devido a este fato, esses pesquisadores conduziram outro estudo com o objetivo de avaliar a influência da fosfatidilcolina de soja na permeação *in vitro* de acetonido de triancinolona incorporado em gel de poloxamer 407. Os resultados desse estudo demonstraram que o aumento na concentração de fosfatidilcolina de soja diminui a quantidade de acetonido de triancinolona permeada, além de aumentar sua retenção cutânea (BENTLEY *et*

*al.*, 1999). Isso pode ocorrer, possivelmente, pois a fosfatidilcolina leva a um aumento no depósito do fármaco na pele, em virtude de ser um fosfolípido constituinte do estrato córneo.

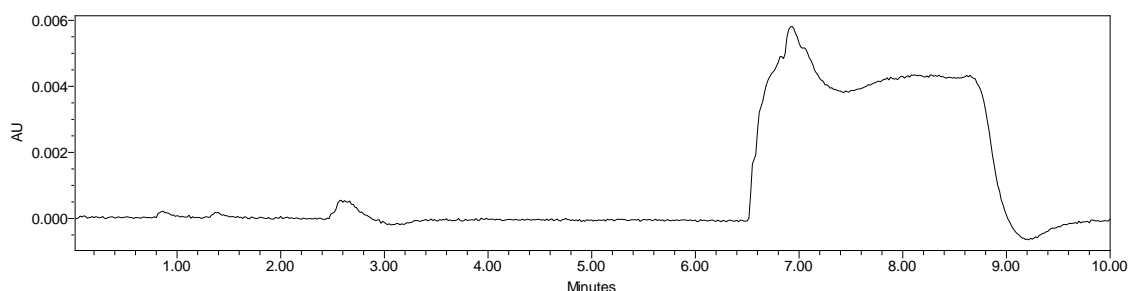
Embora as formulações preparadas com estearato de polioxietileno (40), F3.RES e F4.RES, terem apresentado menor diâmetro médio quando comparado com as formulações preparadas com ácido esteárico, F1.RES e F2.RES, e estudos demonstrarem que a diminuição do tamanho das partículas está relacionado ao aumento da permeação cutânea de fármacos (SHIM *et al.*, 2004), os resultados encontrados demonstraram que as formulações F1.RES e F3.RES, com diâmetro médio de partículas no T24 horas de  $155,50 \pm 0,26$  nm e  $16,48 \pm 3,17$  nm, respectivamente, conforme dados descritos no item 5.2.1, foram as que apresentaram maior permeação cutânea do RES. Desta forma, podemos concluir que o tamanho das partículas não interferiu na permeação cutânea do RES para essas formulações testadas.

A adição de fosfolípidios às formulações de uso tópico tem sido relacionada ao aumento da permeação de fármacos através da pele (BONINA *et al.*, 1995; YOKOMIZO; SAGITANI, 1996; DREHER *et al.*, 1997). Porém, verifica-se na Tabela 14, que as formulações acrescidas de fosfatidilcolina de soja (F2.RES e F4.RES) apresentaram menor percentual de permeação quando comparadas com as formulações F1.RES e F3.RES, que não apresentam em sua composição a fosfatidilcolina de soja. O mesmo foi observado por Ferderber e colaboradores (2009), que observaram que o aumento da concentração do fosfatidilcolina nas formulações diminuía a permeação de propranolol. Esse efeito se deve possivelmente, pois os fosfolípidos podem formar uma barreira lipídica extra sobre a superfície cutânea e conseqüentemente reduzir o fluxo do fármaco. Outra explicação para a redução do fluxo transdérmico se dá pela lenta liberação do fármaco após a adição de fosfatidilcolina na composição da formulação (KIRJAVAINENA *et al.*, 1999), resultado esse observado pelo estudo de liberação Tabela 12.

Nos ensaios de retenção cutânea não foi detectado RES nas peles suínas (derme, epiderme e estrato córneo), conforme demonstrado na Figura 35 e Figura 36.



**Figura 35.** Cromatograma obtido com injeção de solução de *trans*-resveratrol após sua extração da pele suína (derme + epiderme).



**Figura 36.** Cromatograma obtido com injeção de solução de *trans*-resveratrol após sua extração da pele suína (estrato córneo).

Os resultados demonstrados nas Figura 35 e Figura 36 demonstraram que possivelmente os métodos utilizados para a extração do RES da fita adesiva no *tape stripping*, bem como da pele suína não foram eficazes, uma vez que o RES não foi detectável em nenhum cromatograma após a extração. A extração eficaz da substância a ser analisada é dependente da escolha do solvente (ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2008). E o critério chave no processo de extração é que

o mesmo não degrade o fármaco, além de ser eficaz e reprodutível, e que seja livre de interferentes provenientes do estrato córneo e/ou da fita adesiva (HERKENNE *et al.*, 2008).

### **5.8 Avaliação despigmentante *in vitro* do RES incorporado em NLS**

De acordo com a equação 5 (item 4.2.8), foi possível calcular as porcentagens de inibição das diferentes concentrações de ácido kójico, para, posteriormente, traçar uma comparação com o RES e NLS-RES. Além disso, através das equações das retas obtidas após plotar os dados de concentrações e porcentagem de inibição da enzima tirosinase, é possível calcular a  $IC_{50}$  do ácido kójico nas 2 condições testadas (Tabela 15).

O aumento da concentração de ácido kójico é proporcional ao aumento da inibição da enzima tirosinase. Verifica-se que, com o aumento da concentração da enzima tirosinase, é necessário maior concentração de ácido kójico para se obter inibição de 50% da enzima, sendo que na 1ª condição, a  $IA_{50}$  do ácido kójico obtido pela reação com a tirosinase a 120 U/mL, calculada a partir da fórmula da regressão linear gerada após 120 minutos de reação, foi 1,85  $\mu\text{g/mL}$ . A  $IA_{50}$  de ácido kójico obtido pela fórmula da regressão linear gerada a partir da reação com a tirosinase a 480 U/mL após 60 minutos foi 8,66  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 15.** Porcentagem de inibição da tirosinase pelo ácido kójico em diferentes concentrações nas duas condições analisadas, 1<sup>a</sup> condição) Utilizando solução de tirosinase a 120 U/mL; 2<sup>a</sup> condição) Solução de tirosinase a 480 U/mL.

Porcentagem da Inibição da Tirosinase (IA%)												
		Conc. Ácido kójico (µg/mL)								Equação	R <sup>2</sup>	IA <sub>50</sub>
		0,312	0,625	1,25	2,5	3,0	4,0	5,0	10,0			
<b>1<sup>a</sup></b>												
<b>Condição</b>		19,73±0,04	37,22±0,04	42,15±0,05	47,08±0,05	79,82±0,05	80,27±0,05	105,83±0,15	--	y=16,581x + 19345	0,9223	1,85
<b>2<sup>a</sup></b>												
<b>Condição</b>		--	- 2,48±0,034	2,23±0,04	20,60±0,04	--	--	25,06±0,04	57,82±0,04	y=6,1282x - 3,1017	0,9595	8,66

### **5.8.1 Determinação da concentração correspondente à atividade inibitória 50% do RES e NLS-RES usando tirosinase com concentração de 480 U/mL**

Clinicamente, a via de síntese da melanina atua como uma ferramenta para o diagnóstico do melanoma, como, por exemplo, um marcador de diferenciação do melanoma de outros tumores; biologicamente, a presença de melanogênese afeta o comportamento das células de melanoma e o seu microambiente. Mais especificamente, a melanogênese pode gerar um ambiente oxidativo e alguns intermediários (quinonas e semiquinonas) que são tóxicos e também mutagênicos (SLOMINSKI *et al.*, 2001). Então, a melanogênese associada ao ambiente mutagênico pode potencializar a instabilidade genética. Além disso, os intermediários melanogênicos podem inibir a atividade das células imunes do ambiente imunossupressivo que podem cercar o tumor (SLOMINSKI; PAUS; MIHM, 1998). O fato de a melanogênese apresentar um efeito potencial no comportamento do tumor e na terapia do melanoma sugere que a supressão da melanogênese pode ser eficaz na terapia do melanoma (SLOMINSKI; ZBYTEK; SLOMINSKI, 2009).

A enzima tirosinase desempenha papel primordial na melanogênese e, por conseguinte, assume em estados patológicos a superexpressão de melanina, como, por exemplo, no melanoma, o qual pode ser associado com níveis enzimáticos anormais séricos e no tecido (SOHN *et al.*, 1969). O resveratrol tem demonstrado ser um potente inibidor da enzima tirosinase, sendo considerado um importante aliado na terapia antitumoral de melanoma (BERNARD, 2000).

Para avaliar a eficácia do RES e do NLS-RES, utilizou-se concentração de tirosinase em duas condições, sendo que na primeira condição utilizou-se tirosinase a 120 U/mL para verificar a sensibilidade do método aos componentes testados (MACRINI *et al.*, 2009). Assim,

para a determinação da concentração correspondente à atividade inibitória de 50% do RES e das formulações foi utilizado tirosinase na concentração de 480 U/mL.

Após o preparo das placas e a incubação das mesmas, analisaram-se as absorbâncias e, conseqüentemente, as porcentagens de inibição da tirosinase da solução de RES e do RES incorporado nas formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS-RES). A fim de minimizar a influência dos componentes da formulação na atividade enzimática, utilizou-se a NLS sem RES como branco.

**Tabela 16.** Porcentagem de inibição da enzima tirosinase (480 U/mL) pelo RES e pelas NLS-RES em diferentes concentrações.

Porcentagem da Inibição da Tirosinase (IA%)								
	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL	80 µg/mL	Equação	R <sup>2</sup>	IA <sub>50</sub>
<b>RES</b>	47,04	63,45	74,18	68,44	73,80	y=0,2314x + 58,208	0,4001	nd*
<b>F1.RES</b>	65,49	89,78	119,88	152,75	143,55	y=0,9413x + 85,111	0,6163	nd*
<b>F2.RES</b>	55,27	58,93	73,01	105,88	108,62	y=0,752x + 57,034	0,8114	nd*
<b>F3.RES</b>	27,11	43,78	58,56	77,46	81,59	y=0,6523x + 37,829	0,7568	nd*
<b>F4.RES</b>	39,66	55,17	65,76	71,63	79,28	y=0,4345x + 48,829	0,7387	nd*

\*não determinado.

Conforme demonstrado na Tabela 16, tanto as soluções de RES, quanto as soluções das formulações testadas (F1.RES a F4.RES) demonstraram atividade inibitória positiva da enzima tirosinase. Entretanto, a linearidade das curvas obtidas entre as concentrações das soluções de RES e das formulações com a porcentagem de inibição da atividade da enzima tirosinase para o cálculo do IA<sub>50</sub> não foram significantes (R<sup>2</sup> > 0,90). Assim, não foi possível fazer uma análise do IA<sub>50</sub> tanto para o RES em solução quanto incorporado nas formulações contendo nanopartículas lipídicas sólidas.



O ácido kójico foi adotado como controle positivo da inibição da reação, pois se sabe que é um potente inibidor da enzima tirosinase *in vitro* (SANDOVAL, 1999). Além disso, é um composto utilizado como clareador da pele, apresentando pouca ação citotóxica, além de ser hidrossolúvel e não se oxidar facilmente em contato com o ar (SU, 1999; SANDOVAL, 1999).

Verifica-se que a solução de RES, bem como as formulações F1.RES; F2.RES e F4.RES apresentaram maior porcentagem de inibição da enzima tirosinase, quando comparado com a solução de ácido kójico a 5,0 µg/mL, assim como as formulações F1.RES e F2.RES a 10,0 µg/mL mostraram ser mais eficazes que o ácido kójico na mesma concentração. A formulação F3.RES a 5,0 µg/mL demonstrou eficácia semelhante ao ácido kójico a 5,0 µg/mL, o mesmo ocorreu comparando a formulação F4.RES a 10,0 µg/mL com o ácido kójico a 10,0 µg/mL. Porém, foi observado menor ação sobre a enzima tirosinase pelas formulações F3.RES e F4.RES a 10,0 µg/mL quando comparado com solução de ácido kójico nesta concentração (Tabela 15 e Tabela 16).

A solução de RES a 5,0 µg/mL inibiu 1,87 vezes mais a enzima tirosinase que a solução de ácido kójico a 5,0 µg/mL e a solução de RES a 10,0 µg/mL inibiu 1,10 vezes mais que a solução de ácido kójico a 10,0 µg/mL. As formulações F1.RES e F2.RES a 5,0 µg/mL inibiram 2,61 e 2,20 vezes, respectivamente, mais a enzima tirosinase que a solução de ácido kójico na mesma concentração. A formulação F1.RES, quando em solução a 10,0 µg/mL, inibiu a enzima tirosinase 1,55 vezes mais que o ácido kójico na mesma concentração.

A formulação F1.RES, quando comparada com o RES livre, promoveu maior inibição da enzima tirosinase, sendo que inibiu 1,39 vezes mais que o RES livre quando em soluções a 5,0 µg/mL, 1,41 vezes mais quando em solução a 10,0 µg/mL, 1,61 vezes mais quando em solução a 20,0 µg/mL, 2,23 vezes mais quando em solução a 40,0 µg/mL e 1,79 vezes mais quando em solução a 80,0 µg/mL. Para a formulação F2.RES observa-se que nem todas as concentrações

das soluções preparadas com F2.RES foi superior a solução de RES livre, sendo que para a solução a 5,0 µg/mL, F2.RES foi 1,17 vezes mais eficaz que a solução de RES livre na mesma concentração. Porém, nas concentrações de 10,0 µg/mL e 20,0 µg/mL, a F2.RES foi semelhante ao RES livre, nas mesmas concentrações, na inibição da enzima tirosinase. Já, nas concentrações 40,0 µg/mL e 80,0 µg/mL, F2.RES foi 1,54 e 1,47 vezes mais eficaz que a solução de RES livre, nas mesmas concentrações, na inibição da enzima tirosinase, respectivamente. Tanto a formulação F3.RES, quanto a formulação F4.RES se mostraram mais eficazes na inibição da enzima tirosinase apenas quando em solução a 40,0 µg/mL e a 80,0 µg/mL. Para a formulação F3.RES, apresentou ser 1,13 e 1,10 vezes mais eficaz na inibição da enzima que o RES livre quando em solução de 40,0 µg/mL e 80,0 µg/mL, respectivamente. E, a formulação F4.RES foi 1,05 e 1,07 vezes mais eficaz na inibição da enzima tirosinase que a solução de RES livre quando em solução a 40,0 µg/mL e 80,0 µg/mL, respectivamente.

Verifica-se ainda que a formulação F1.RES a 40,0 µg/mL foi a que apresentou maior inibição da enzima tirosinase, 152,75%. Já a formulação F3.RES a 5,0 µg/mL foi a que apresentou menor inibição da enzima tirosinase, 27,11%.

## VI. CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios de caracterizações físico-químicas realizadas, como o tamanho médio, índice de polidispersibilidade e potencial zeta dos NLSs, mostrou que as formulações compostas por estearato de polioxietileno (40) apresentaram menor diâmetro médio quando comparadas com as compostas por ácido esteárico. O acréscimo de fosfatidilcolina de soja promoveu aumento do índice de polidispersidade das amostras, com exceção apenas da formulação F1.

As análises de calorimetria demonstraram que houve deslocamento dos picos cristalinos do estearato de polioxietileno (40) e do poloxamer 407 nas NLSs, sugerindo mudança de polimorfos. Pode-se verificar ainda ausência dos picos de fusão do RES nas formulações.

O método analítico desenvolvido para a quantificação do *trans*-resveratrol se mostrou satisfatório em relação à RDC nº 899/2003 e pode ser aplicado nas análises de RES encapsulado em nanopartículas.

Os resultados do ensaio de liberação de RES *in vitro* mostrou que as formulações analisadas apresentaram cinéticas de liberação segundo o modelo matemático Weibull, o que indica a ocorrência de um mecanismo complexo de liberação, envolvendo, simultaneamente, o relaxamento das cadeias poliméricas e a erosão do polímero, além da presença de ácido esteárico formar uma matriz porosa que conforme o fármaco se dissolve, a porosidade da matriz aumenta, promovendo liberação modificada do fármaco. Já o estearato de polioxietileno (40) é capaz de promover alta taxa de liberação de RES, devido ao aumento da solubilidade do fármaco em água.

O ensaio de permeação cutânea *in vitro* do RES demonstrou que as formulações que não possuíam fosfatidilcolina de soja na sua composição apresentaram maior permeação cutânea do que as formulações que continham a fosfatidilcolina de soja. Além disso, verificou-se que o diâmetro médio não influenciou a permeação do RES.

Verifica-se que a solução de RES, bem como as NLS acrescidas de RES apresentaram maior porcentagem de inibição da enzima tirosinase, quando comparado com a solução de ácido kójico.

Os resultados da microscopia (MEV-FEG) sugerem que o método de produção por sonicação aplicado neste trabalho produz material com distribuição nanométrica de partículas com morfologias bem distintas, sendo observada nas fotomicrografias a formação de nanopartículas com diâmetros entre 20 a 150 nm.

As metodologias testadas para a quantificação do RES encapsulado nas NLS não obtiveram resultados satisfatórios na separação do RES encapsulado do RES livre. Assim, não foi possível a quantificação e a análise da eficiência de encapsulação.

Os resultados obtidos sugerem que as formulações desenvolvidas e analisadas podem ser utilizadas para incorporação do RES, visando aumentar a sua eficácia terapêutica no tratamento do melanoma, sendo que a formulação preparada com ácido esteárico e fosfatidilcolina (F2.RES) foi a que apresentou resultados mais promissores, uma vez que as formulações contendo ácido esteárico foram as que apresentaram maior liberação do RES e o acréscimo de fosfatidilcolina na formulação promoveu menor permeação do RES, fazendo com que o RES fique localizado em camadas mais superficiais da pele, onde está localizado o melanoma.

## VII. REFERÊNCIA

AGAYAN, R. R.; HORVATH, T.; MCNAUGHTON, B. H.; ANKER, J. N.; KOPELMAN, R. Optical manipulation of metal-silica hybrid nanoparticles. **Proc. of SPIE**, v. 5514, p. 502-513, 2004.

AGGARWAL, B. B.; BHARDWAJ, A.; AGGARWAL, R. S.; SEERAM, N. P.; SHISHODIA, S.; TAKADA, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer Res.**, v. 24, n. 5A, p. 2783-840, 2004.

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINACHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 5-28, 2004.

AKHTAR, N.; PATHAK, K. Cavamax w7 composite ethosomal gel of clotrimazole for improved topical delivery: development and comparison with ethosomal gel. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 1, 2012.

ALMEIDA, E. D. P.; COSTA, A. A.; ROSSETI, F. C.; MARCHETTI, J. M.; ARAUJO, A. A. S.; BENTEY, M. V. L. B.; NUNES, R. S.; SERAFINI, M. R.; VALÉRIO, M. E. G.; ARAUJO, A. A. S.; LIRA, A. A. M. Obtenção e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo alumínio-cloro ftalocianina. In: VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, 2010, São Pedro SP. VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria book abstract, 2010.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **J Control Release**, v. 99, n. 1, p. 53–62, 2004.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 413–420, 1995.

AMRI, A.; CHAUMEIL, J. C.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? **J Control Release.**, v. 158, n. 2, p. 182-93, 2012.

ANDRADE, F. F. **Desenvolvimento e avaliação de cristais líquidos obtidos em emulsões O/A à base de óleo de andiroba e éster fosfórico.** 2008. 115p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

ANSARI, K. A.; VAVIA, P. R.; TROTTA, F.; CAVALLI, R. Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: in vitro characterisation, stability, cytotoxicity and permeation study. **AAPS PharmSciTech**, vol. 12, n. 1, 2011.

APOPA, P. L.; QIAN, Y.; SHAO, R.; GUO, N. L.; SCHWEGLER-BERRY, D.; PACURARI, M.; PORTER, D.; SHI, X.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V.; FLYNN, D. C. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive

---

oxygen species production and microtubule remodeling. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2009.

AUFFAN, M.; ROSE, J.; BOTTERO, J. Y.; LOWRY, G. V.; JOLIVET, J. P.; WIESNER, M. R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. **Nature Nanotechnology**, v. 4, p. 634 – 641, 2009.

AZIZ, M. H.; REAGAN-SHAW, S.; WU, J.; LONGLEY, B. J.; AHMAD, N. Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? **FASEB J.**, v. 19, n. 9, p. 1193-5, 2005.

BARRY, B. W; EINI, D. I. D. Surface properties and micelle formation of long-chain polyoxyethylene nonionic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 54, n. 3, p. 339–347, 1976.

BARZEGAR-JALALI, M.; ADIBKIA, K.; VALIZADEH, H.; SHADBAD, M. R. S.; NOKHODCHI, A.; OMIDI, Y.; MOHAMMADI, G.; NEZHADI, S. H.; HASAN, M. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v. 11, n. 1, p. 167-177, 2008.

BEAUMONT, K. A.; LIU, Y. Y.; STURM, R. A. Chapter 4 The Melanocortin-1 Receptor Gene Polymorphism and Association with Human Skin Cancer. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 88, p. 85–153, 2009.

BENTLEY, M.V.L.B., VIANNA, R.F., KEDOR, E.R.M. Use of poloxamer gels as vehicle for cutaneous drug delivery: in vitro evaluation of skin retention and percutaneous absorption through hairless mouse skin. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 47, p. 1128, 1995.

BENTLEY, M.V.L.B., KEDOR, E.R.M., VIANNA, R.F., COLLETT, J.H. The influence of lecithin and urea on the in vitro permeation of hydrocortisone acetate through skin from hairless mouse. **Int. J. Pharm.** v. 146, p. 255–262, 1997.

BENTLEY, M. V. L. B.; MARCHETTI, J. M.; RICARDO, N.; Z. ABI, A.; COLLETT, J. H. Influence of lecithin on some physical chemical properties of poloxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies. **Int. J. Pharm.** v. 193, p. 49–55, 1999.

BERNARD, B. Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, n. 3, p. 219–226, 2000.

BERTELLI, A. A.; GIOVANNINI, L.; BERNINI, W.; MIGLIORI, M.; FREGONI, M.; BAVARESCO, L.; BERTELLI, A. Antiplatelet activity of *cis*-resveratrol. **Drugs Exp Clin Res.**, v. 22, n. 2, p. 61-3, 1996.

BHALEKAR, M. R.; POKHARKAR, V.; MADGULKAR, A.; PATIL, N.; PATIL, N. Preparation and evaluation of miconazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, 2009.



---

BHARDWAJ, R.; BLANCHARDX, J. Controlled-release delivery system for the r-msh analog melanotan-i using poloxamer 407. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 9, p. 915–919, 1996.

BHATTACHARYA, S.; DARJATMOKO, S. R.; POLANS; A. S. Resveratrol Modulates the Malignant Properties of Cutaneous Melanoma via Changes in the Activation and Attenuation of the Anti-apoptotic Proto-oncogenic Protein Akt/PKB. **Melanoma Res.**, v. 21, n. 3, p. 180–187, 2011.

BIKIARIS, D.; PAPAGEORGIU, G. Z.; STERGIU, A. PAVLIDOU, E. KARAVAS, E.; KANAZE, F.; GEORGARAKIS, M. Physicochemical studies on solid dispersions of poorly water-soluble drugs, evaluation of capabilities and limitations of thermal analysis techniques. **Thermochimica Acta**, v. 439, p. 58-67, 2005.

BOLZINGER, M. A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156–165, 2012.

BONDA, C.; ZHANG, J.; PAVLOVIC, A. The photostability and photostabilization of *trans*-resveratrol. **Cosmetics & Toiletries magazine**, v. 126, n. 9, p. 652-660, 2011.

BONINA, F. P.; MONTENEGRO, L.; SCROFANI, N.; ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Effect of phospholipid based formulations on in vitro and

in vivo percutaneous absorption of methyl nicotinate. **J. Controlled Release**, v. 34, p. 53–63, 1995.

BRASIL - Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução -RDC nº 899/2003 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 2003.

BRASNYÓ, P.; MOLNÁR, G. A.; MOHÁS, M.; MARKÓ, L.; LACZY, B.; CSEH, J.; MIKOLÁS, E.; SZIJÁRTÓ, I. A.; MÉREI, A.; HALMAI, R.; MÉSZÁROS, L. G.; SÜMEGI, B.; WITTMANN, I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 383–389, 2011.

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 59, p. 379–402, 2007.

CHANG, T. S. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase. **Activity. Material**, v. 5, p. 1661-1685, 2012.

CHEN, X.; QIAO, H.; LIU, T.; YANG, Z.; XU, L.; XU, Y.; GE, H. M.; TAN, R-X.; LI, E. Inhibition of herpes simplex virus infection by oligomeric stilbenoids through ROS generation. **Antiviral Research**, v. 95, n. 1, p. 30–36, 2012.

CIDES, L. C. S.; ARAÚJO, A. A. S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J. R. Thermal behaviour, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and

non –isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, n. 2, p. 441-445, 2006.

COSTA, Paulo Jorge Cardoso da. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 38, n. 2, 2002 .

COSTA, P., LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

COSTIN, G. E.; VALENCIA, J. C.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; SOLANO, F.; MILAC, A. L.; VIEIRA, W. D.; VIEIRA, Y.; ROUZAUD, F.; PETRESCU, A. J.; LAMOREUX, M. L.; HEARING, V.J. Mutations in dopachrome tautomerase (Dct) affect eumelanin/pheomelanin synthesis, but do not affect intracellular trafficking of the mutant protein. **Biochem J.**, v. 391, p. 249–259, 2005.

COTTART, C. H.; NIVET-ANTOINE, V.; LAGUILLIER-MORIZOT, C.; BEAUDEUX, J. L. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Mol Nutr Food Res.**, v. 54, n. 1, p. 7-16, 2010.

CROSER, M.; BOVENZI, M.; MAINA, G.; ADAMI, G.; ZANETTE, C.; FLORIO, C.; LARESE, F. F. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 82, n. 9, p. 1043-1055, 2009.

DESAI, P.; PATLOLLA, R. R.; SINGH, M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. **Mol. Membr. Biol.**; v. 27, n. 7, p. 247–259, 2010.

DETONI, C. B.; SOUTO, G. D.; MAURER DA SILVA, A. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 72, n. 2, p. 317-23, 2009.

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

DE VRINGER, T.; DE RONDE, H.A.G. Preparation and structure of a water-in-oil cream containing lipid nanoparticles. **J. Pharm. Sci.**, v. 84, p. 466–472, 1995.

DICK, I. P.; SCOTT, R. C. Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. **J Pharm Pharmacol.**, v. 44, n. 8, p. 640-5, 1992.

DOLINSKY, V. W.; DYCK, J. R. B. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. **Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 11, p. 1477–1489, 2011.

DOWLING, A.; CLIFF, R.; GROBERT, N.; *et al.* **Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties**. London: The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. Report, v. 44, p. 7–10, 2004.

---

DREHER, F.; WALDE, P.; WALTHER, P.; WEHRLI, E. Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport. **J. Controlled Release**, v. 45, p. 131–140, 1997.

DUBES, A.; PARROT-LOPEZ, H.; ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H.; SHAHGALDIAN, P.; COLEMAN, A. W. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 55, n. 3, p. 279-82, 2003.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; MERINO-SANJUÁN, V.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; URBAN-MORLAN, Z.; PIÑÓN-SEGUNDO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. **J Pharm Pharmaceut Sci**, v. 11, n. 1, p. 104-130, 2008.

FARGNOLI, M.C.; GANDINI, S.; PERIS, K.; MAISONNEUVE, P.; RAIMONDI, S. MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis. **Eur. J. Cancer**, v. 46, n. 8, p. 1413–1420, 2010.

FERDERBER, K.; HOOK, S.; RADES, T. Phosphatidyl choline-based colloidal systems for dermal and transdermal drug delivery. **J Liposome Res.**,v. 19, n. 4, p. 267-77, 2009.

FIGUEIRAS, T. S.; NEVES-PETERSEN, M. T.; PETERSEN, S. B. Activation energy of light induced isomerization of resveratrol. **J Fluoresc**, v. 21, p. 1897–1906, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), U.S. Department of Health and Human Services, Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Guidance for Industry**. Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that are Color Additives. 2012.

FREEDMAN, J. A.; TYLER, D. S.; NEVINS, J. R.; AUGUSTINE, C. K. Use of Gene Expression and Pathway Signatures to Characterize the Complexity of Human Melanoma. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 6, p. 2513–2522, 2011.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN<sup>TM</sup>) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221–229, 1998.

FREUND, J. E.; SIMON, G. A. **Estatística Aplicada: Economia, Administração e Contabilidade**. 9 ed. Bookman: Porto Alegre, 2000, 404p.

GANDINI, S.; AUTIER, P.; BONIOL, M. Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 107, n. 3, p. 362–366, 2011.

GARBE, C.; EIGENTLER, T. K.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHILD, A.; KIRKWOOD, J. M. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. **The Oncologist**, v. 16, n. 1, p. 5-24, 2011.

---

GEHM, B. D.; MCANDREWS, J. M.; CHIEN, P. Y.; JAMESON, J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 14138–14143, 1997.

GARDOUH, A. R.; GAD, S.; GHONAIM, H. M.; GHORAB, M. M. Design and characterization of glyceryl monostearate solid lipid nanoparticles prepared by high shear homogenization. **British Journal of Pharmaceutical Research**, ISSN: 2231-2919, v. 3, n. 3, 2013.

GOVINDARAJAN, B.; SLIGH, J. E.; VINCENT, B. J.; LI, M.; CANTER, J. A.; NICKOLOFF, B. J.; RODENBURG, R. J.; SMEITINK, J. A.; OBERLEY, L.; ZHANG, Y.; SLINGERLAND, J.; ARNOLD, R. S.; LAMBETH, J. D.; COHEN, C.; HILENSKI, L.; GRIENDLING, K.; MARTÍNEZ-DIEZ, M.; CUEZVA, J. M.; ARBISER, J. L. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. **J Clin Invest.**, v. 117, n. 3, p. 719–729, 2007.

GRASSI, M.; VOINOVICH, D.; FRANCESCHINIS, E.; PERISSUTTI, B.; FILIPOVIC-GRCIC, J. Theoretical and experimental study on theophylline release from stearic acid cylindrical delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 92, n. 3, p. 275–289, 2003.

GRILL, A.E.; JOHNSTON, N.W.; SADHUKHA, T.; PANYAM, J. A review of select recent patents on novel nanocarriers. **Recent Pat. Drug Deliv. Formul.**, v.3, n.2, p.137-142, 2009.

---

GUO, L. et al. Anticancer activity and molecular mechanism of resveratrol-bovine serum albumin nanoparticles on subcutaneously implanted human primary ovarian carcinoma cells in nude mice. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v. 25, p. 471–477, 2010.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous application. **Drug Target Insights**, v.2, p.147-157, 2007.

HAWKINS, G. S.; REIFENRATH, W. G. Influence of skin source, penetration cell fluid, and, partition coefficient on in vitro skin penetration. **J. Pharm. Sci.**, v. 75, p. 378–381, 1986.

HAN, Y. K.; PARK, Y. J.; HA, Y. M.; PARK, D.; LEE, J. Y.; LEE, N.; YOON, J. H.; MOON, H. R.; CHUNG, H. Y. Characterization of a novel tyrosinase inhibitor, (2R,4R)-2-(2,4-dihydroxyphenyl)thiazolidine-4-carboxylic acid (MHY384). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1820, n. 4, p. 542–549, 2012.

HELSING, P.; NYMOEN, D. A.; ROOTWELT, H.; VÅRDAL, M.; AKSLEN, L. A.; MOLVEN, A.; ANDRESEN, P. A. MC1R, ASIP, TYR, and TYRP1 gene variants in a population-based series of multiple primary melanomas. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 51, n. 7, p. 654–661, 2012.

HENDERSON, E. J.; SHUHENDLER, A. J.; PRASAD, P.; BAUMANN, V.; MAIER-FLAIG, F.; FAULKNER, D. O.; LEMMER, U.; WU, X. Y.; OZIN, G. A. Colloidally stable silicon nanocrystals with near-infrared photoluminescence for biological fluorescence imaging. **Small**, v. 7, n. 17, p. 2507–2516, 2011.



HERKENNE, C.; ALBERTI, I.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; MATHY, F. X.; PRÉAT, V.; GUY, R. H. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. **Pharm Res.**; v. 25, n. 1, p. 87–103, 2008.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **J. Pharm. Sci.**, v.50, p.874-875, 1961.

HIGUCHI, W.I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.51, p.802-804, 1962.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.52, p.1145-1149, 1963.

HOWARD, K. A.; RAHBK, U. L.; LIU, X.; DAMGAARD, C. K.; GLUD, S. Z.; ANDERSEN, M. O.; HOVGAARD, M. B.; SCHMITZ, A.; NYENGAARD, J. R.; BESENBACHER, F.; KJEMS, J. RNA interference in vitro and in vivo using a chitosan/sirna nanoparticle system. **Molecular Therapy**, v. 14, p. 476–484, 2006.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Câncer de Pele**. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=333](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=333). Acesso em: 24 de maio de 2013.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology- Q2(R1)**, nov. 2005.

JAIN, P. K.; LEE, K. S.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYED, M. A. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, p. 7238-7248, 2006.

JENNING, V.; GYSLER, A.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. H. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, n. 3, p. 211–218, 2000.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **J. Nanopart. Res.**, v. 11, p. 77–89, 2009.

KATIYAR S.K. Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: inhibition of oxidative stress and protection of immune system. **Mol Nutr Food Res.**, v. 52, Suppl 1, p. S71-6, 2008.

KAUR, R.; GRANT, D. J.; EAVES, T. Comparison of polyethylene glycol and polyoxyethylene stearate as excipients for solid dispersion systems of griseofulvin and tolbutamide II: dissolution and solubility studies. **J Pharm Sci.**, v. 69, n. 11, p. 1321-6, 1980.

KENNEDY, C.; HUURNE, J.; BERKHOUT, M.; GRUIS, N.; BASTIAENS, M.; BERGMAN, W.; WILLEMZE, R.; BAVINCK, J. N. B. Melanocortin 1 receptor (mc1r) gene variants are

---

associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, p. 294–300, 2001.

KIM, A.; YANG, Y.; LEE, M. S.; YOO, Y. D.; LEE, H. G.; LIM, J. S. NDRG2 gene expression in B16F10 melanoma cells restrains melanogenesis via inhibition of Mitf expression. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 21, n. 6, p. 653–664, 2008.

KIM, M. Y. Nitric oxide triggers apoptosis in A375 human melanoma cells treated with capsaicin and resveratrol. **Molecular Medicine Reports**, v. 5, n. 2, p. 585-591, 2012.

KIRJAVAINENA, M.; URTTIA, A.; VALJAKKA-KOSKELAB, R.; KIESVAARAB, J.; MÖNKKÖNENA, J. Liposome–skin interactions and their effects on the skin permeation of drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 7, n. 4, p. 279–286, 1999.

KOBAYASHI, Y.; KAYAHARA, H.; TADASA, K.; NAKAMURA, T.; TANAKA, H. Synthesis of amino acid derivates of kojic acid and their tyrosinase inhibitory activity. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.59, p.1745-1746, 1995.

KORSMEYER, R.W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

---

KRAUSE, B.; MENDE, M.; PÖTSCHKE, P.; PETZOLD, G. Dispersability and particle size distribution of CNTs in an aqueous surfactant dispersion as a function of ultrasonic treatment time. **Carbon**, v. 48, n. 10, p. 2746–2754, 2010.

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

KÜCHLER, S.; ABDEL-MOTTALEB, M.; LAMPRECHT, A.; RADOWSKI, M. R.; HAAG, R. SCHÄFER-KORTINGA, M. Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p.169–172, 2009.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; WEIß, B.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C. M.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 159–164, 2007.

LANDI, M. T.; KANETSKY, P. A.; TSANG, S.; GOLD, B.; MUNROE, D.; REBBECK, T.; SWOYER, J.; TER-MINASSIAN, M.; HEDAYATI, M.; GROSSMAN, L.; GOLDSTEIN, A. M.; CALISTA D.; PFEIFFER, R. M. MC1R, ASIP, and DNA Repair in Sporadic and Familial Melanoma in a Mediterranean Population. **JNCI J Natl Cancer Inst**, v. 97, n. 13, p. 998-1007, 2005.

---

LARRUCEA, E.; ARELLANO, A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.52, p.113-119, 2001.

LEE, K. J.; MOWER, R.; HOLLENBECK, T.; CASTELO, J.; JOHNSON, N.; GORDON, P.; SINKO, P. J.; HOLME, K.; LEE, Y. H. Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies. **Pharm Res.**; v. 20, n. 7, p. 1015-21, 2003.

LEE, E. J.; LEE, Y. S.; HWANG, S.; KIM, S.; HWANG, J. S.; KIM, T. Y. **N-(3,5-Dimethylphenyl)-3-Methoxybenzamide (A3B5)** Targets TRP-2 and Inhibits Melanogenesis and Melanoma Growth. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, p. 1701–1709, 2011.

LEE, A.R. C.; TOJO, K. Characterization of skin permeation of vitamin C: Theoretical analysis of penetration profiles and differential scanning calorimetry study. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 46, n. 1, p. 174-177, 1998.

LIM, S. J.; LEE, M. K.; KIM, C. K. Altered chemical and biological activities of all-*trans* retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 53–61, 2004.

LIRA, A. A. M., NANCLARES, D. M. A., NETO, A. FEDERMAN, MARCHETTI, J. M. Drug: polymer interaction in the all-*trans* retinoic acid release from chitosan microparticles. **J. Therm. Anal. Cal.**, v.87, p. 899 - 903, 2007a.

LIRA, A. M.; ARAÚJO, A. A. S.; BASÍLIO, I. D. J.; SANTOS, B. L. L.; SANTANA, D. P.; MACEDO, R. O. Compatibility studies of lapachol with pharmaceutical excipients for the development of topical formulations. **Thermochimica Acta**, v. 457, n. 1–2, p. 1–6, 2007b.

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

LIU, X-Q.; WU, B-J.; PAN, W. H. T.; ZHANG, X-M.; LIU, J-H.; CHEN, M-M.; CHAO, F-P.; CHAO, H-M. Resveratrol Mitigates Rat Retinal Ischemic Injury: The Roles of Matrix Metalloproteinase-9, Inducible Nitric Oxide, and Heme Oxygenase-1. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 00, n. 00, 2012.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 2, 2005 .

LOURENÇO, C.; TEIXEIRA, M.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 138, p. 1-12, 1996.

MACRINI, D. J.; SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N.; OHARA, M. T. Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an in vitro evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 715-721, 2009.

MAINARDES, R.M.; URBAN, M.C.C.; CINTO, P.O.; CHAUD, M.V.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Liposomes and Micro/Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery. **Current Drug Delivery**, v.3, p. 275-285, 2006.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 376-399, 2002.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 1-37, 2009.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 195, n. 3, p. 298-308, 2004.

MAYORGA, P.; PUISIEUX, F.; COLLARRAZE, G. Formulation study of a transdermal delivery system of primaquine. **Int. J. Pharm.**, v.132, p. 71-79, 1996.

MCGOWN, D. N. L.; PARFITT, G. D.; WILLIS, E. Stability of non-aqueous dispersions. I. The relationship between surface potential and stability in hydrocarbon media. **Journal of Colloid Science**, v. 20, n. 7, p. 650–664, 1965.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Adv Drug Deliv Rev.**; v. 47, n. 2-3, p. 165-96, 2001.

MEI, Z.; CHEN, H.; WENG, T.; YANG, Y.; YANG, X. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 56, n. 2, p. 189-96, 2003.

MISHRA, R. N. Resveratrol -The New Rasayan (Anti-aging) Drug. **Current Research in Medicine and Medical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 5-18, 2011.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.5, n.1, p.561-573, 2006.

MÜLLER, R.H.; LUCKS, J.S. Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen, Feste Lipidnanosphären (SLN). European Patent EP 0605497, 1996.

MÜLLER, R. H.; MAAßEN, S.; WEYHERS, H.; SPECHT, F.; LUCKS, J.S. Cytotoxicity of magnetite loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 138, p. 85–94, 1996.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161–177, 2000.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131–S155, 2002.



MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra-high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**. v.11, p. 901-909, 1987.

NAPPER, D. H. Steric stabilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 58, n. 2, p. 390–407, 1977.

NDIAYE, M.; PHILIPPE, C.; MUKHTAR, H.; AHMAD, N. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. **Arch Biochem Biophys.**, v. 508, n. 2, p. 164-70, 2011.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Quim. Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

NEPAL, P. R.; HAN, H. K.; CHOI, H. K. Enhancement of solubility and dissolution of Coenzyme Q10 using solid dispersion formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1–2, p. 147–153, 2010.

NEWA, M.; BHANDARI, K. H.; LI, D. X.; KWON, T.; KIM, J. A.; YOO, B. K.; WOO, J. S.; LYOO, W. S.; YONG, C. S.; CHOI, H. G. Preparation, characterization and in vivo evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with poloxamer 188. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, p. 228-237, 2007.

NIDHIN, M.; INDUMATHY, R.; SREERAM, K. J.; NAIR, B. U. Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates. **Bull. Mater. Sci.**, v. 31, n. 1, p. 93–96, 2008.

NILES, R. M.; MCFARLAND, M.; WEIMER, M. B.; REDKAR, A.; FU, Y. M.; MEADOWS, G. G. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 190, p. 157–163, 2003.

NILES, R. M.; COOK, C. P.; MEADOWS, G. G.; FU, Y. M.; MCLAUGHLIN, J. L.; RANKIN, G. O. Resveratrol is rapidly metabolized in athymic (nu/nu) mice and does not inhibit human melanoma xenograft tumor growth. **J Nutr.**, v. 136, v. 10, p. 2542-6, 2006.

ORALLO, F. Comparative studies of the antioxidant effects of *cis*- and *trans*- resveratrol. **Curr Med Chem**, v. 13, n. 1, p. 87–98, 2006.

ORLOW, S. J.; SILVERS, W. K.; ZHOU, B. K.; MINTZ, B. Comparative decreases in tyrosinase, TRP-1, TRP-2, and Pmel 17/silver antigenic proteins from melanotic to amelanotic stages of syngeneic mouse cutaneous melanomas and metastases. **Cancer Res.**, v. 58, n. 7, p. 1521-3, 1998.

ORTIZ, R. S.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R. Determinação de citrato de sildenafila e de tadalafila por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 389-393, 2010.

PACE-ASCIAK, C. R.; HAHN, S.; DIAMANDIS, E. P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D. M. The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 235, n. 2, p. 207–219, 1995.

PETROVSKI, G.; GURUSAMY, N.; DAS, D. K. Resveratrol in cardiovascular health and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 22–33, 2011.

PANDO, D.; CADDEO, C.; MANCONI, M.; FADDA, A. M.; PAZOS, C. Nanodesign of olein vesicles for the topical delivery of the antioxidant resveratrol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 1158–1167, 2013.

PRAGST, F.; HERZLER, M.; ERXLEBEN, B. T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). **Clin Chem Lab Med.**, v. 42, n. 11, p.1325-40, 2004.

PRIMO, F.L.; BENTLEY, M.V.L.B.; TEDESCO, A.C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of foscan /nanoemulsion (NE) applicable to PDT skin cancer treatment . **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.8, p.340-347, 2008.

RAIMONDI, S.; SERA, F.; GANDINI, S.; IODICE, S.; CAINI, S.; MAISONNEUVE, P.; FARGNOLI, M. C. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: A meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 12, p. 2753–2760, 2008.

RITGER, P.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 37-42, 1987.

ROBYT, J. F.; WHITE, B. J. **Biochemical Techniques - Theory and Practices**. Chicago: Waveland; 1990.

ROSA, F.S.; TEDESCO, A.C.; LOPEZ, R.F.V.; PIERRE, M.B.R.; LANGE, N.; ROTTA, J.C.G.; MARCHETTI, J.M.; BENTLEY, M.V.L.B. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v.89, n.2, p.261-269, 2003.

ROSSI, D.; GUERRINI, A.; BRUNI, R.; BROGNARA, E.; BORGATTI, M.; GAMBARI, R.; MAIETTI, S.; SACCHETTI, G. *trans*-Resveratrol in nutraceuticals: issues in retail quality and effectiveness. **Molecules**, v. 17, p. 12393-12405, 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. London: Pharmaceutical Press, 5<sup>th</sup> edition, 2006.

RUDYANTO, M.; IHARA, M.; TAKASU, K.; YOSHIDA, M.; POERWONO, H.; SUDIANA, I. K.; INDRAYANTO, G.; BRITTAIN, H. G. Propylparaben: Physical Characteristics. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 30, p. 235–269, 2003.

SANDOVAL, B. Tratamiento del melasma com Ácido Kójico. **Folia Dermatológica Peruana**, Lima, v.10, n. 1, p. 53-56, 1999.

SCHAEFER, H.; WATTS, F.; BROD, J.; ILLEL, B. **Follicular penetration**. In: Scott, R. C.; Guy, R. H.; Hadgraft, J. Prediction of Percutaneous Penetration. Methods, Measurements, Modelling, IBC Technical Services, London (1990), p. 163–173.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 56, n. 3, p. 501-505, 2003.

SCHERER, D.; KUMAR, R. Genetics of pigmentation in skin cancer--a review. **Mutat Res.**, v. 705, n. 2, p. 141-53, 2010.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, p. 83-96, 1994.

SCHLUPP, P.; BLASCHKE, T.; KRAMER, K. D.; HÖLTJE, H. D.; MEHNERT, W.; SCHÄFER-KORTING, M. Drug release and skin penetration from solid lipid nanoparticles

---

and a base cream: a systematic approach from a comparison of three glucocorticoids. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 24, p. 199–209, 2011.

SCOGNAMIGLIO, I.; STEFANO, D. D.; CAMPANI, V.; MAYOL, L.; CARNUCCIO, R.; FABBROCINI, G.; AYALA, F.; ROTONDA, M. I. L.; ROSA, G. D. Nanocarriers for topical administration of resveratrol: A comparative study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, p. 179–187, 2013.

SHIM, J.; SEOK KANG, H.; PARK, W. S.; HAN, S. H.; KIM, J.; CHANG, I. S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. **J Control Release**.; v. 97, n. 3, p. 477-84, 2004.

SHUKLA, Y.; SINGH, R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 1–8, 2011.

SILVA, C.; LOPES, C. M.; FONSECA, J.; SOARES, M. E.; SANTOS, D.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. Risperidone release from solid lipid nanoparticles (SLN): validated HPLC method and modelling kinetic profile. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, p. 307-316, 2012.

SINHA, V. R.; SRIVASTAVA, S.; GOEL, H.; JINDAL, V. Solid lipid nanoparticles (sln's) – trends and implications in drug targeting. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 212-238, 2010.

SKOBOWIAT, C.; DOWDY, J. C.; SAYRE, R. M. TUCKEY RC, SLOMINSKI AT. Cutaneous hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis homologue - regulation by ultraviolet radiation. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, 2011 [Epub ahead of print].

SLOMINSKI, A.; PAUS, R.; MIHM, M. Inhibition of melanogenesis as an adjuvant strategy in the treatment of melanotic melanomas: selective review and hypothesis. **Anticancer Res.**; v. 18, p. 3709–16, 1998.

SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J.; CARLSON, A.; MATSUOKA, L.; BALCH, C. M.; MIHM, M. Malignant melanoma: an update. **Arch Pathol Lab Med.**; v. 125, p. 1295–306, 2001.

SLOMINSKI, A.; ZBYTEK, B.; SLOMINSKI, R. Inhibitors of melanogenesis increase toxicity of cyclophosphamide and lymphocytes against melanoma cells. **Int. J. Cancer.**; v. 124, n. 6, p. 1470–1477, 2009.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development.** New York: John Wiley & Sons, Inc. p. 722-723, 1997.

SOHN, N.; GUMPORT, S. L.; GANG, H.; GOLDSTEIN, M.; DEPPISCH, L. M. Generalized melanoses secondary to malignant melanoma. Report of a case with serum and tissue tyrosinase studies. **Cancer**, v. 24, n. 5, p. 897–903, 1969.

SOUTO, E. B.; ALMEIDA, A. J.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN<sup>®</sup>, NLC<sup>®</sup>) for cutaneous drug delivery: Structure, protection and skin effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, p. 317-31, 2007.

SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H.; ALEMIEDA, A. J. Topical delivery of oily actives using solid lipid particles. **Pharmaceutical Technology Europe**, v. 19, n. 12, 2007.

STURM, R.A. GSTP1 and MC1R in melanoma susceptibility. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 6, p. 1155–1156, 2012.

SU, E. G. Formulando com branqueadores da pele. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 57-63, 1999.

SUNDARAM, S.; ROY, S. K.; AMBATI, B. K.; KOMPELLA, U. B. Surface-functionalized nanoparticles for targeted gene delivery across nasal respiratory epithelium. **FASEB J.**; v. 23, n. 11, p. 3752–3765, 2009.

SURBER, C., WILHELM, K.P. AND MAIBACH, H.I. In-vitro and in-vivo percutaneous absorption of structurally related phenol and steroid analogs. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 39, p. 244-248, 1993.

SWART, H.; BREYTENBACH, J. C.; HADGRAFT, J.; PLESSIS, J. Synthesis and transdermal penetration of NSAID glycoside esters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, n. 1–2, p. 71–79, 2005.



TAVEIRA, S. F.; DE CAMPOS ARAÚJO, L. M. P.; DE SANTANA, D. C. A. S.; NOMIZO, A.; DE FREITAS, L. A. P.; LOPEZ, R. F. V. Development of cationic solid lipid nanoparticles with factorial design-based studies for topical administration of doxorubicin. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 219-228(10), 2012.

TESKAC, K. & J. KRISTL. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. **Int. J. Pharm.**, v. 390, p. 61–69, 2010.

TAHARA, K.; YAMAMOTO, K.; NISHIHATA, T. Application of model-independent and model analysis for the investigation of effect of drug solubility on its release rate from hydroxypropyl methylcellulose sustained release tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 133, n. 1, p. 17-27, 1996.

THIELBEER, F.; DONALDSON, K.; BRADLEY, M. Zeta potential mediated reaction monitoring on nano and microparticles. **Bioconjugate Chem.**, v. 22, n. 2, p. 144–150, 2011.

TRAPP, V.; PARMAKHTIAR, B.; PAPAZIAN, V.; WILLMOTT, L.; FRUEHAUF, J. P. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. **Angiogenesis**, v. 13, p. 305–315, 2010.

TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. **Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration**, v. 19, p. 106-121, 2006.

---

VAN GINKEL, P. R.; DARJATMOKO, S. R.; SAREEN, D.; SUBRAMANIAN, L.; BHATTACHARYA, S.; LINDSTROM, M. J.; ALBERT, D. M.; POLANS, A. S. Resveratrol inhibits uveal melanoma tumor growth via early mitochondrial dysfunction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 49, n. 4, p. 1299-1306, 2008.

VANG, O.; AHMAD, N.; BAILE, C. A.; BAUR, J. A.; BROWN, K.; CSISZAR, A.; DAS, D. K.; DELMAS, D.; GOTTFRIED, C.; LIN, H. Y.; MA, Q. Y.; MUKHOPADHYAY, P.; NALINI, N.; PEZZUTO, J. M.; RICHARD, T.; SHUKLA, Y.; SURH, Y. J.; SZEKERES, T.; SZKUDELSKI, T.; WALLE, T.; WU, J. M. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One.*, v. 6, n. 6, p. e19881, 2011.

VENUGOPAL, J.; PRABHAKARAN, M.P.; LOW, S.; CHOON, A.T.; DEEPIKA, G.; DEV, V.R.; RAMAKRISHNA, S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. *Curr. Pharm. Des.*, v.15, n.15, p. 1799-1808, 2009.

VIAN, M. A.; TOMAO, V.; GALLET, S.; COULOMB, P.O.; LACOMBE, J.M. Simple and rapid method for *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. *Journal of Chromatography A*, v. 1085, n. 2, p. 224–229, 2005.

VOLKOVOVA, K.; BILANICOVA, D.; BARTONOVA, A.; LETAŠIOVÁ, S.; DUSINSKA, M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. *Environmental Health*, v. 11, Suppl 1:S12, p. 1-13, 2012.

XUZHU, G.; KOMAI-KOMA, M.; LEUNG, B. P.; HOWE, H. S.; MCSHARRY, C.; MCINNES, I. B.; XU, D. Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. **Ann Rheum Dis**; v. 71, p. 129-135, 2012.

WAGNER, et al. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. **J. Controlled Rel.**, v. 75, p. 283-295, 2001.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E. JR.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metab Dispos.**, v. 32, n. 12, p. 1377-82, 2004.

WALLE, T. Bioavailability of resveratrol. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1215, pag. 9–15, 2011.

WANG, J. J.; LIU, K. S.; SUNG, K. C.; TSAI, C. Y.; FANG, J. Y. Skin permeation of buprenorphine and its ester prodrugs from lipid nanoparticles: lipid emulsion, nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 8, p. 734-747, 2009.

WIGHT, R. D.; TULL, C. A.; DEEL, M. W.; STROOPE, B. L.; EUBANKS, A. G.; CHAVIS, J. A.; DREW, PAUL D.; HENSLEY, L. L. Resveratrol effects on astrocyte function: Relevance to neurodegenerative diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 426, n. 1, p. 112–115, 2012.

WILLIAMS, K. A.; KOLAPPASWAMY, K.; DETOLLA, L. J.; VUCENIK, I. Protective Effect of Inositol Hexaphosphate Against UVB Damage in HaCaT Cells and Skin Carcinogenesis in SKH1 Hairless Mice. **Comp Med.**, v. 61, n. 1, p. 39–44, 2011.

YANG, Z.; YANG, S.; MISNER, B. J.; CHIU, R.; LIU, F.; MEYSKENS JR., F. L. Nitric oxide initiates progression of human melanoma via a feedback loop mediated by apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1, which is inhibited by resveratrol. **Mol Cancer Ther.**, v. 7, p. 3751-3760, 2008.

YÁÑEZ, M.; FRAIZ, N.; CANO, E.; ORALLO, F. Inhibitory effects of cis and *trans*-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 344, n. 2, p. 688–695, 2006.

ZHANG, G.; FLACH, C. R.; MENDELSON, R. Tracking the dephosphorylation of resveratrol triphosphate in skin by confocal Raman microscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 2, p. 141-147, 2007.

ZHANG, H. Y.; TEHRANY, E. A.; KAHN, C. J. F.; PONÇO, M.; LINDER, M.; CLEYMAND, F. Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 618–627, 2012.

ZHANG, Y.; YANG, M.; PORTNEY, N. G.; CUI, D.; BUDAK, G.; OZBAY, E.; OZKAN, M.; OZKAN, C. S. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of

nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. **Biomed Microdevices**, v. 10, p. 321–328, 2008.

YOKOMIZO, Y.;SAGITANI, H. The effect of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of guinea pig in vitro. 2. The effects of the hydrophobic group in phospholipids and a comparison with general enhancers. **J. Controlled Release**, v. 42, p. 37–46, 1996.

ZIMMERMANN, E.; MÜLLER, R. H. Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN<sup>TM</sup>) dispersions in artificial gastrointestinal media. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 203–210, 2001.

## VIII. ANEXOS

**Anexo A - Desenvolvimento das NLSs preparadas por diferentes metodologias: sonicação, homogeneizador de alta pressão e sonicação + homogeneizador de alta pressão**

Foram desenvolvidas 9 formulações, as quais continham 3% de material graxo (ácido esteárico) e 1,5% de tensoativo (fosfatidilcolina de soja + poloxamer 407), sendo que a concentração de material graxo foi fixa para todas as formulações, variando-se apenas as concentrações de tensoativo, conforme descrita na Tabela 1.

**Tabela 1.** Formulações testadas pelos 3 diferentes métodos.

	Concentrações (%)					Água Mili Q
	Ácido esteárico	Fosfatidilcolina de soja	Poloxamer 407	Metilparabeno	Propilparabeno	
<b>F1</b>	3,0	0,15	1,35	0,18	0,02	qsp*
<b>F2</b>	3,0	0,30	1,2	0,18	0,02	qsp*
<b>F3</b>	3,0	0,45	1,05	0,18	0,02	qsp*
<b>F4</b>	3,0	0,60	0,90	0,18	0,02	qsp*
<b>F5</b>	3,0	0,75	0,75	0,18	0,02	qsp*
<b>F6</b>	3,0	0,90	0,60	0,18	0,02	qsp*
<b>F7</b>	3,0	1,05	0,45	0,18	0,02	qsp*
<b>F8</b>	3,0	1,20	0,30	0,18	0,02	qsp*
<b>F9</b>	3,0	1,35	0,15	0,18	0,02	qsp*

\*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

As formulações foram preparadas utilizando 3 diferentes métodos, conforme descrito na metodologia do item 4.2.1. Desenvolvimento das NLSApós o preparo as formulações foram avaliadas quanto ao diâmetro médio e à polidispersidade, conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Média e desvio padrão do diâmetro médio (nm) e da polidispersidade das formulações preparadas através da sonicação, homogeneizador de alta pressão e a associação do sonicação + homogeneizador de alta pressão.

	Sonicação		Homogeneizador		Sonicação + Homogeneizador	
	DM (nm)	PdI	DM (nm)	PdI	DM (nm)	PdI
<b>F1</b>	921,5 ± 11,04	0,24 ± 0,03	1260,33 ± 57,36	0,28 ± 0,02	1713 ± 24,58	0,43 ± 0,13
<b>F2</b>	1088 ± 6,56	0,31 ± 0,01	1422 ± 48,28	0,30 ± 0,03	1851,33 ± 68,12	0,44 ± 0,02
<b>F3</b>	1056,67 ± 25,58	0,39 ± 0,05	1435 ± 33	0,43 ± 0,05	1522,33 ± 28,09	0,52 ± 0,13
<b>F4</b>	1073 ± 44,51	0,47 ± 0,09	810,4 ± 33,30	0,29 ± 0,03	890,77 ± 25,13	0,33 ± 0,07
<b>F5</b>	1169 ± 33,87	0,59 ± 0,09	868,3 ± 18,89	0,40 ± 0,06	919,77 ± 39,05	0,54 ± 0,07
<b>F6</b>	1089,33 ± 44,84	0,62 ± 0,09	695,43 ± 4,65	0,58 ± 0,07	825,37 ± 23,28	0,41 ± 0,12
<b>F7</b>	1338,67 ± 59,01	0,84 ± 0,13	720,63 ± 28,47	0,57 ± 0,06	Floculou	Floculou
<b>F8</b>	Floculou	Floculou	652,93 ± 21,71	0,49 ± 0,06	Floculou	Floculou
<b>F9</b>	Floculou	Floculou	679,6 ± 9,24	0,46 ± 0,12	Floculou	Floculou

Verificou-se que, em relação ao diâmetro médio das partículas, as formulações F1; F2 e F3 preparadas com a metodologia de sonicação foram as que apresentaram menor diâmetro médio.

O índice de polidispersidade é um parâmetro para definir a distribuição do tamanho das partículas. Amostras com ampla distribuição de tamanho das partículas apresentam índice de polidispersão  $> 0,7$  (NIDHIN *et al.*, 2008). Para um índice de polidispersidade de 0,4 considera-se distribuição de tamanho de partícula muito polidisperso e presença de aglomerados na dispersão. Já, para um índice de polidispersidade de 0,2 considera-se tamanhos pouco polidisperso de partículas (KRAUSE *et al.*, 2010).

Verifica-se nos resultados (Tabela 2) que apenas a formulação F1 apresentou índice de polidispersidade próximo de 0,2, demonstrando ser a formulação com tamanho de partícula menos polidisperso, quando comparada com as demais formulações testadas, que utilizaram a mesma metodologia de preparo, a sonicação.

Em relação as formulações preparadas utilizando o homogeneizador de alta pressão. Verifica-se que, em relação ao diâmetro médio das partículas, as formulações apresentaram redução do diâmetro médio com o aumento da concentração de fosfatidilcolina de soja, sendo que a formulação que apresentou menor diâmetro médio foi a F8 com  $652,93 \pm 21,71$  nm. Embora esta técnica tenha apresentado menor diâmetro médio quando comparado com a sonicação, as formulações apresentaram índice de polidispersidade  $> 0,4$ , mostrando que a distribuição das partículas, muito polidisperso podendo apresentar aglomerados (KRAUSE *et al.*, 2010).

Os resultados referentes a análise das formulações preparadas utilizando sonicação associado ao homogeneizador de alta pressão, mostra que as formulações preparadas por sonicação associadas ao homogeneizador de alta pressão apresentaram redução do diâmetro médio com o aumento da concentração de fosfatidilcolina de soja, sendo que a formulação que apresentou menor diâmetro médio foi a F6 com  $825,37 \pm 23,28$  nm. Esta técnica não foi adequada para produzir as nanopartículas lipídicas sólidas, com essas matérias-primas



utilizadas, pois produziu formulações com partículas com diâmetro médio alto, maior do que aquelas empregando a sonicação e a homogeneização de alta pressão isolados. Além disso, as formulações apresentaram índice de polidispersidade  $> 0,3$ , mostrando que a distribuição das partículas muito polidispersas, podendo apresentar aglomerados (KRAUSE *et al.*, 2010).

De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que o melhor método para o preparo das nanopartículas lipídicas sólidas foi a sonicação. Esta técnica não apresentou as partículas com menor diâmetro médio, mas produziu dispersões pouco polidispersas.

Devido ao fato dos resultados de diâmetro médio das partículas não terem sido satisfatórios, buscou-se alternativas para atingir o objetivo de produzir NLS com diâmetro médio de, aproximadamente, 25 nm.

Mei e colaboradores (2003) conduziu um estudo que teve como objetivo desenvolver NLS para incorporar triptolida para aplicação tópica. A formulação desenvolvida pelos pesquisadores utilizava 5,0% de ácido esteárico; 1,2% de fosfatidilcolina de soja ou 1,2% de poloxamer 188 e 3,6% PEG 400 MS. O diâmetro médio da NLS formulada com fosfatidilcolina foi  $157 \text{ nm} \pm 1,2$  e da NLS formulada com o poloxamer 188 foi  $173 \pm 2,3$  nm.

Outro estudo realizado por Henderson e colaboradores (2011) desenvolveu NLS utilizando uma mistura de ácido esteárico, estearato de polioxietileno (40) e Myrj<sup>®</sup> 56 (*poly(ethylene glycol)-100-stearate*). As nanopartículas lipídicas sólidas formadas apresentaram diâmetro médio de, aproximadamente, 100 nm.

Assim, foram desenvolvidas 13 novas formulações, utilizando o ácido esteárico ou o estearato de polioxietileno (40) ou a mistura dos dois, além disso, inicialmente utilizou-se apenas o poloxamer 407 como tensoativo, conforme demonstrado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Formulações desenvolvidas.

	Concentrações (%)					
	Ácido esteárico	Estearato de Polioxietileno (40)	Poloxamer 407	Metilparabeno	Propilparabeno	Água Mili Q
<b>F10</b>	2,75	0,25	1,5	0,18	0,02	qsp*
<b>F11</b>	2,75	0,25	2,0	0,18	0,02	qsp*
<b>F12</b>	2,72	0,25	2,5	0,18	0,02	qsp*
<b>F13</b>	3,0	-	1,5	0,18	0,02	qsp*
<b>F14</b>	3,0	-	2,0	0,18	0,02	qsp*
<b>F15</b>	3,0	-	2,5	0,18	0,02	qsp*
<b>F16</b>	-	3,0	1,5	0,18	0,02	qsp*
<b>F17</b>	-	3,0	2,0	0,18	0,02	qsp*
<b>F18</b>	-	3,0	2,5	0,18	0,02	qsp*
<b>F19</b>	-	5,0	3,0	0,18	0,02	qsp*
<b>F20</b>	-	5,0	3,5	0,18	0,02	qsp*
<b>F21</b>	-	5,0	4,0	0,18	0,02	qsp*
<b>F22</b>	2,5	2,5	2,5	0,18	0,02	qsp*

\*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

As formulações foram preparadas utilizando o método de sonicação, conforme descrito na metodologia do item 4.2.1. Após o preparo as formulações foram avaliadas quanto ao

diâmetro médio e a polidispersidade, conforme demonstrado na Tabela 4. As formulações F10 a F13 e F15 e F22 não foram analisadas, pois elas demonstraram-se instáveis, apresentando separação de fases.

**Tabela 4.** Média e desvio padrão do diâmetro médio (nm) e da polidispersidade das formulações desenvolvidas.

<b>Formulações</b>	<b>Diâmetro Médio (nm)</b>	<b>Polidispersidade</b>
<b>F14</b>	834,93 ± 3,95	0,247 ± 0,013
<b>F16</b>	81,32 ± 39,78	0,264 ± 0,088
<b>F17</b>	69,99 ± 45,31	0,206 ± 0,041
<b>F18</b>	30,61 ± 6,11	0,439 ± 0,031
<b>F19</b>	26,25 ± 0,34	0,423 ± 0,015
<b>F20</b>	20,72 ± 0,53	0,324 ± 0,075
<b>F21</b>	35,69 ± 9,92	0,230 ± 0,121

Os resultados demonstram que a adição de estearato de polioxietileno (40) na formulação promoveu a redução do diâmetro médio. A formulação F14 é composta apenas por 3,0% de ácido esteárico e apresentou diâmetro médio de 834,93±3,95 nm, semelhante ao resultado obtido pelas primeiras formulações preparadas. As formulações F16, F17 e F18, que foram preparadas utilizando apenas 3,0% estearato de polioxietileno (40) apresentaram significativa redução do diâmetro médio das partículas, sendo 81,32±39,78 nm, 69,99±45,31 nm e 30,61±6,11 nm, respectivamente. As formulações F19, F20 e F21, compostas por 5,0% de estearato de polioxietileno (40), apresentaram o menor diâmetro médio de partículas, a saber, 26,25±0,34 nm, 20,72±0,53 nm e 35,69±9,92 nm, respectivamente. Estes valores atingiram o

valor de diâmetro médio esperado de 25 nm. Porém, o índice de polidispersidade obtido para estas formulações (F19, F20 e F21) foram  $0,423\pm 0,015$ ,  $0,324\pm 0,075$  e  $0,230\pm 0,121$ , respectivamente, mostrando que a distribuição das partículas foi muito polidispersa, podendo apresentar aglomerados (KRAUSE *et al.*, 2010).

Selecionaram-se as formulações F19, F20 e F21, pois apresentaram os menores diâmetros médios (Tabela 4) e as mesmas foram submetidas à duas outras condições de banho: 1. Sonicadas utilizando banho de gelo durante o preparo e 2. Sonicadas e após a dispersão resfriadas em banho de gelo. De acordo com o método de preparo elas foram nomeadas de F19.1, F20.1 e F21.1, para as formulações F19, F20 e F21 preparadas por sonicação utilizando banho de gelo durante o preparo e F19.2, F20.2 e F21.2, para as formulações F19, F20 e F21 sonicadas e após a dispersão resfriada em banho de gelo (Tabela 5).

**Tabela 5.** Formulações selecionadas e submetidas a diferentes condições de banho.

<b>Formulação</b>	<b>Método de Preparo</b>
<b>F19</b>	Sonicação e amostras resfriadas à temperatura ambiente
<b>F19.1</b>	Sonicação utilizando banho de gelo durante o preparo
<b>F19.2</b>	Sonicadas e após a dispersão resfriada em banho de gelo
<b>F20</b>	Sonicação e amostras resfriadas à temperatura ambiente
<b>F20.1</b>	Sonicação utilizando banho de gelo durante o preparo
<b>F20.2</b>	Sonicadas e após a dispersão resfriada em banho de gelo
<b>F21</b>	Sonicação e amostras resfriadas à temperatura ambiente
<b>F21.1</b>	Sonicação utilizando banho de gelo durante o preparo
<b>F21.2</b>	Sonicadas e após a dispersão resfriada em banho de gelo

O valor do diâmetro médio e a polidispersidade estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Média e desvio padrão do diâmetro médio (nm) e da polidispersidade das formulações F19, F20 e F21 preparadas utilizando sonicação e duas condições diferentes de banho: 1. Sonicadas utilizando banho de gelo durante o preparo; 2. Sonicadas e após a dispersão resfriada em banho de gelo.

<b>Formulações</b>	<b>Diâmetro Médio (nm)</b>	<b>Polidispersidade</b>
<b>F19.1</b>	20,10 ± 7,187	0,250 ± 0,05
<b>F20.1</b>	21,75 ± 7,940	0,210 ± 0,17
<b>F21.1</b>	18,69 ± 5,300	0,381 ± 0,03
<b>F19.2</b>	18,35 ± 5,022	0,233 ± 0,06
<b>F20.2</b>	626,70 ± 259,5	0,299 ± 0,02
<b>F21. 2</b>	19,87 ± 2,763	0,359 ± 0,06

Os resultados demonstraram que o modo de preparo influenciam pouco no diâmetro médio das partículas, com exceção apenas da formulação F20.2, que apresentou grande aumento no diâmetro médio das partículas. O diâmetro médio alterou de 20,72±0,53 nm (formulação preparada por sonicação e a dispersão resfriada à temperatura ambiente - F20; Tabela 4) e 21,75±7,94 nm (formulação preparada com banho de gelo - F20.1; Tabela 6) para 626,7±259,5 nm (formulação preparada por sonicação e a dispersão resfriada em banho de gelo - F20.2; Tabela 6).

Já, em relação à polidispersidade, observa-se que as formulações que utilizaram o banho de gelo durante a sonicação apresentaram menores valores de polidispersidade, a saber,

0,250±0,05 e 0,210±0,17, referentes à formulação F19.1 e F20.1, respectivamente, apresentando uma distribuição pouco polidispersa.

Selecionou-se então a formulação F20.1, por apresentar diâmetro médio reduzido e menor polidispersidade, para ser acrescida a fosfatidilcolina de soja, a qual passou a ser chamada de F20.1f (Tabela 7). A fosfatidilcolina de soja foi adicionada com o objetivo de aumentar a estabilidade da NLS e também promover maior eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos, como o RES. Os resultados do valor do diâmetro médio (nm) e polidispersidade estão descritos na Tabela 8.

**Tabela 7.** Formulações selecionadas.

Concentrações (%)						
	Fosfatidilco- lina de Soja	Estearato Polioxietileno (40)	de Poloxamer 407	Metilparaben o	Propilparabeno	Água Mili Q
<b>F20.1</b>	-	5,0	3,5	0,18	0,02	qsp*
<b>F20.1f</b>	1,2	5,0	3,5	0,18	0,02	qsp*

\*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

**Tabela 8.** Média e desvio padrão do diâmetro médio (nm) e da polidispersidade das formulações.

Formulações	Diâmetro Médio (nm)	Polidispersidade
<b>F20.1</b>	21,75 ± 7,940	0,210 ± 0,17
<b>F20.1f</b>	40,83 ± 7,33	0,468 ± 0,102

A adição da fosfatidilcolina de soja promoveu aumento no diâmetro médio das partículas de  $21,75 \pm 7,940$  nm (F20.1) foi para  $40,83 \pm 7,33$  nm (F20.1f). Houve também aumento da polidispersidade da formulação de  $0,210 \pm 0,17$  (F20.1) para  $0,468 \pm 0,102$  (F20.1f). O aumento no diâmetro médio das partículas com a adição de fosfatidilcolina de soja foi contrário aos resultados obtidos por Schwarz e colaboradores (1994). Os pesquisadores observaram que o aumento na concentração de fosfatidilcolina de soja promoveu redução no diâmetro médio das partículas. Porém, estes mesmo pesquisadores observaram que o aumento da concentração de fosfatidilcolina de soja promoveu aumento no índice de polidispersidade das formulações, semelhante ao observado nos nossos estudos (SCHWARZ *et al.*, 1994).

O mesmo foi observado por Akhtar & Pathak (2012), que verificaram que altas concentrações de lecitina de soja promoveram índice de polidispersidade menor, provavelmente devido à ação tensoativa da lecitina de soja (AKHTAR; PATHAK, 2012).

Um estudo demonstrou que as lecitinas de soja podem apresentar concentrações diferentes de ácidos graxos mono e poli-insaturados. O aumento das taxas de ácidos graxos monoinsaturados aumenta o tamanho das partículas. Além disso, a taxa de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa diminui o tamanho das partículas e aumenta o índice de polidispersidade (ZHANG *et al.*, 2012).

## **Anexo B – Validação da metodologia analítica para a quantificação de RES por espectroscopia ultravioleta**

Para a validação da metodologia analítica para a quantificação do RES foi fixado o comprimento de onda de 306 nm. O método foi validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003), dentre eles: linearidade, precisão, especificidade, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação e precisão.

### **Linearidade**

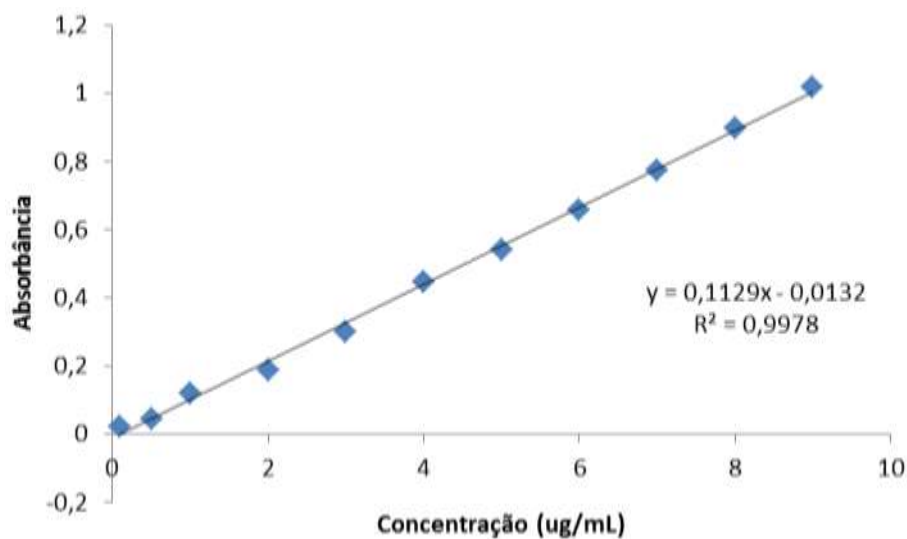
A linearidade é a capacidade de uma metodologia de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra. A Figura 1 demonstra a curva analítica do RES.

A determinação da linearidade e intervalo foi executada em triplicata, através da elaboração de curvas analíticas. Segundo a RDC 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva analítica é de 0,99 (BRASIL, 2003), sendo obtido um valor médio de 0,9998 no experimento.

A curva obtida demonstrou que os resultados da metodologia analítica são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.

A faixa de trabalho (concentração na alíquota de análise 0,1 a 9  $\mu\text{g/mL}$ ) possibilitou detectar o RES e a resposta do detector de ultravioleta conservou-se linear. A Figura 1 representa a curva analítica utilizada na conversão entre as áreas obtidas e a concentração do ativo.





**Figura 1.** Curva analítica do RES por espectroscopia ultravioleta.

### Precisão

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos da repetibilidade do método, a qual foi verificada pela análise de 3 concentrações (1, 4 e 9  $\mu\text{g/mL}$ ), em triplicata ( $n=3$ ) de cada concentração, em 3 dias diferentes.

**Tabela 9.** Resultados da avaliação da precisão para a repetibilidade (precisão intra-corrída).

ÁREA DOS PICOS									
Concentração teórica	1º Dia			2º Dia			3º Dia		
	1 µg/mL	4 µg/mL	9 µg/mL	1 µg/mL	4 µg/mL	9 µg/mL	1 µg/mL	4 µg/mL	9µg/mL
n=1	0,11432	0,45793	1,021	0,1277	0,45206	1,0162	0,11048	0,42435	0,98518
n=2	0,11727	0,45816	1,0361	0,11939	0,45014	1,0298	0,11519	0,43482	1,0085
n=3	0,1216	0,45816	1,0361	0,11939	0,45014	1,0298	0,11519	0,43482	1,0085
Média	0,11773	0,45886	1,03127	0,12249	0,44881	1,0252	0,11511	0,43089	1,0005
Desvio Padrão	0,0037	0,00141	0,0089	0,0045	0,0041	0,0078	0,0046	0,0057	0,0132
DPR	3,11	0,31	0,86	3,70	0,91	0,76	3,98	1,32	1,33

A Tabela 10 mostra os resultados obtidos da precisão intermediária do método, a qual foi verificada através da análise de 3 concentrações (1, 4 e 9 µg/mL) em triplicata (n=3) de cada concentração em 3 dias diferentes.

**Tabela 10.** Resultados da avaliação da precisão intermediária (precisão inter-corridas).

<b>ÁREA DOS PICOS</b>			
<b>Concentração teórica</b>	<b>1 µg/mL</b>	<b>4 µg/mL</b>	<b>9 µg/mL</b>
Média dia 1	0,11773	0,45886	1,03127
Média dia 2	0,12249	0,44881	1,0252
Média dia 3	0,11511	0,43089	1,0006
Média	0,11844	0,44619	1,0191
Desvio Padrão	0,00493	0,01278	0,0167
DPR	4,16	2,86	1,63

O desvio padrão relativo (DPR) obtido na avaliação da precisão do método é adequado (menor que 5,0%), podendo atribuir ao método analítico alto grau de concordância entre os resultados quando realizados sob as mesmas condições experimentadas neste estudo.

### **Exatidão**

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos da recuperação do método, a qual foi verificada através da análise de 3 concentrações (1, 4 e 9 µg/mL) em triplicata (n=3) de cada concentração.

**Tabela 11.** Resultados da avaliação da exatidão.

CONCENTRAÇÃO EXPERIEMNTAL			
Concentração teórica	1 µg/mL	4 µg/mL	9 µg/mL
n = 1	0,11773	0,45886	1,03127
n = 2	0,11249	0,44881	1,0252
n = 3	0,11511	0,43089	1,0006
Média	0,11511	0,44619	1,01901
Desvio Padrão	0,00262	0,01417	0,01626
Exatidão	103,65 ± 2,32	101,72 ± 3,14	101,58 ± 1,60

\* Através da equação da reta ( $y=0,1129x - 0,0132$ ) determinou-se a concentração experimental.

A exatidão obtida na avaliação do método é adequado, podendo atribuir ao método analítico alto grau de concordância entre os resultados quando realizados sob as mesmas condições experimentadas neste estudo.

### Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os valores calculados para o limite de detecção e de quantificação demonstram alta sensibilidade e especificidade do método para a determinação do RES. Foram encontrados 0,34 µg/mL para o limite de detecção e 1,18 µg/mL para o limite de quantificação (Tabela 12).

Não foi necessário realizar testes experimentais para comprovar os resultados calculados, visto que o método desenvolvido não tem o objetivo de detectar concentrações mínimas, como, por exemplo, em um estudo forense. A finalidade principal do método consiste em analisar formulações farmacêuticas que apresentam quantidades terapêuticas de RES.

**Tabela 12.** Resultados do limite de detecção e de qualificação do *trans*-resveratrol.

	<b>Equação da reta</b>	<b>Inclinação (a)</b>	<b>Intercepto (b)</b>
Dia 1	$y=0,1119x + 0,0002$	0,1119	0,0002
Dia 2	$y=0,1121x + 0,019$	0,1121	0,019
Dia 3	$y=0,1103x + 0,0256$	0,1103	0,0256
Média		0,11143	0,01493
Desvio Padrão		0,00098	0,01318
LD		0,34 µg/mL	
LQ		1,18 µg/mL	