

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E
MEDICAMENTOS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS LÍQUIDO-
CRISTALINOS PARA INCORPORAÇÃO DO *TRANS-RESVERATROL*: ENSAIOS
DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VIVO***

ANDRESSA TERUMI FUJIMURA

ORIENTADOR: PROF. DR. MARLUS CHORILLI
CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA RÚBIA CASAGRANDE

ARARAQUARA – SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS LÍQUIDO-
CRISTALINOS PARA INCORPORAÇÃO DO *TRANS-RESVERATROL*: ENSAIOS
DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VIVO***

ANDRESSA TERUMI FUJIMURA

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: RÚBIA CASAGRANDE

ARARAQUARA – SP
2014

Ficha Catalográfica

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

F961d Fujimura, Andressa Terumi
Desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido-cristalinos para incorporação do *trans*-resveratrol: ensaios de permeação cutânea *in vitro* e avaliação da eficácia *in vivo* / Andressa Terumi Fujimura . – Araraquara, 2014
131 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: Rúbia Casagrande

1. Sistema líquido-cristalino. 2. *Trans*-resveratrol. 3. Radiação UV. 4. Estresse oxidativo.
I. Chorilli, Marlus, orient. II. Casagrande, Rúbia, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

COMISSÃO EXAMINADORA

A Comissão organizadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado em sessão pública realizada no dia 28 de novembro de 2014, consideram a candidata:

(X) APROVADA () REPROVADA

Presidente da Banca: Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

**Membros:
Prof. Dr. MARCOS ANTÔNIO CORRÊA
Profa. Dra. PRYSCILA DANIELY MARCATO**

*Com todo amor, dedico este trabalho às
meus pais Augusto e Gelma, a minha irmã
Jéssica, ao meu sobrinho Arthur e ao
meu cunhado Anderson Ricardo*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por dar uma vida repleta de bênçãos e oportunidades, sou grata a minha família e amigos.

Agradeço aos meus pais Augusto e Gelma que nunca mediram esforços em oferecer a mim e a minha irmã apoio em todos os momentos difíceis, segurança, educação, conduta pessoal e profissional. Agradeço pelo imenso amor e incentivo constante. Obrigada pelo exemplo de caráter, sabedoria e determinação e por tanto confiarem na minha capacidade para realização desse trabalho.

Agradeço a minha irmã Jéssica e ao meu cunhado Anderson pelo carinho, amor, incentivo, confiança e dedicação em momentos difíceis da minha vida. Agradeço também pela chegada do meu sobrinho Arthur em 2013 que veio para alegrar ainda mais a minha família.

Agradeço a minha querida tia Queico e tio Sérgio pelo carinho, amor, incentivo e principalmente pela ajuda nos momentos difíceis. Agradeço a tia Queico, que me ensinou o quanto tenho que ser forte, mesmo nas situações mais extremas.

Agradeço a minha tia Cida e tio Fernando pelo enorme apoio nesta etapa da minha vida. Obrigada pelo carinho, amor e paciência.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli pela orientação, paciência, confiança, incentivo e pela ajuda no meu crescimento profissional. Obrigada por ajudar a tornar meu sonho realidade.

Agradeço a minha querida co-orientadora Profa. Dra. Rúbia Casagrande, um exemplo de dedicação e amor à pesquisa. Agradeço por me receber de braços abertos, pela orientação, carinho, amizade, dedicação, por dispor de todo apoio material, moral, intelectual e principalmente pela paciência. Sem dúvida, será uma referência para toda minha vida, não só profissional como pessoal também.

Agradecimentos

Sou eternamente grata ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, homem trabalhador e honesto que teve grande contribuição na realização deste trabalho e na qualificação. Obrigada pelo apoio e ajuda em situações difíceis.

Agradeço aos amigos do programa de pós-graduação, Juliana, Márcia, Andréia, Flávio, Bruno, Leonardo, Aline, Cristiane, Vanessa, Giovana, Lilian, Fernanda, Natália, Gisela, Jéssica, Roberta, Maíra, Liliane, Gustavo, Fabíola, Ana Luiza, Charlene, Mariana e Martina. Obrigada pela amizade, companheirismo, ideias e contribuição nos experimentos.

Em especial agradeço aqueles que se tornaram amigos pessoais e especiais em minha vida: Juliana Reis, Márcia Oyafuso, Andréia Meneguim, Bruno Fonseca-Santos, Flávio Campos. Obrigada pela linda amizade, pelos momentos agradáveis em que passamos juntos, momentos de alegria e de desabafo, e pela contribuição indispensável de cada um de vocês para a realização deste trabalho. Agradeço particularmente ao amigo Bruno Fonseca-Santos pela paciência e disposição em sempre ajudar com os problemas relacionados à formatação deste trabalho.

Agradeço à querida amiga Juliana Reis, primeira grande amizade que fiz ao chegar na UNESP, e que se estendeu para minha vida pessoal e se tornou essencial, sempre a guardarei em meu coração. Grata por todos os momentos que passamos juntas, pelo conhecimento transmitido, pelas longas conversas, pelos desabafos, pelos conselhos e por essa linda amizade que se estenderá pela vida toda. Agradeço também a família da Juliana por me receberem de braços abertos em sua casa e pelo enorme carinho.

Agradeço a querida Kelly Pestana, que não mediu esforços em me ajudar em um dos momentos que mais precisei durante a realização deste trabalho. Obrigada pelo conhecimento transmitido e pela enorme contribuição neste trabalho.

Em especial, agradeço também a amiga Renata Martinez e Felipe Pinho, os quais tiveram imensa contribuição durante a realização dos experimentos *in vivo* na UEL. Agradeço a Renata pela sua dedicação, paciência, pela linda amizade,

Agradecimentos

sabedoria, e pela pessoa honesta e trabalhadora que é. Com certeza um exemplo a seguir.

Agradeço as minhas grandes amigas pessoais Mariana Proença, Margareth Yonamine que apesar de não participarem da minha vida acadêmica, compartilharam comigo as alegrias e angustias de cada etapa deste trabalho. Obrigada pelos longos anos de amizade, conselhos, conversas, paciência, por sempre estarem dispostas a me ajudar em todos os momentos da minha vida. Sempre as guardarei em meu coração e em minhas orações.

Agradeço ao meu grande amigo João Victor Laureano, que mesmo longe, não mediu esforços em me ajudar nesta jornada. Obrigada pela enorme amizade, pelo companheirismo, pelos conselhos, pela paciência e pelas longas conversas.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, em particular a querida técnica do laboratório Natália Santos.

Agradeço a Seção de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, em especial à Cláudia, Daniela e Joyce, pela atenção e apoio.

Agradeço 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.

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

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

(Martin Luther King)

RESUMO

A exposição diária da pele à radiação ultravioleta pode causar dano direto ao DNA e ocasionar a proliferação de espécies reativas de oxigênio (EROs), conduzindo ao desequilíbrio entre estes radicais livres e as enzimas antioxidantes presentes na epiderme, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutational peroxidase (GPx). Este desequilíbrio leva a um estado definido como estresse oxidativo, o qual pode ser adiado e até mesmo tratado por meio da utilização de produtos com propriedades antioxidantes. Pesquisas têm demonstrado vários efeitos benéficos do *trans*-resveratrol (RES) à saúde humana, dentre eles a sua ação antioxidante e anti-inflamatória, podendo ser um importante aliado na prevenção e tratamento de desordens cutâneas como o fotoenvelhecimento, hiperpigmentação e câncer de pele. Entretanto, algumas propriedades físico-químicas como limitada solubilidade aquosa, dificultam a sua eficiência na terapia cutânea, uma vez que possui baixa penetração na pele. Dessa forma, a utilização de sistemas de liberação nanoestruturados para administração cutânea do RES, como o sistema líquido-cristalino (SLC), seria extremamente viável a fim de localizar o fármaco em seu sítio-alvo, modulando sua ação e reduzindo possíveis efeitos colaterais, além de aumentar a sua penetração através do estrato córneo. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver SLC para incorporação do RES e caracterizá-los por meio de microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS), análise de perfil de textura e reologia. Foram realizados ensaios de liberação, retenção e permeação *in vitro* empregando pele de modelo animal. Avaliou-se ainda a eficácia anti-inflamatória e antioxidante *in vivo* de RES incorporado nas formulações pelos seguintes ensaios: edema cutâneo, atividade da mieloperoxidase (MPO), secreção-atividade da metaloproteinase-9 (MMP-9) e IL-10, dosagem de GSH, FRAP, ABTS, catalase, hidroperóxidos lipídicos e produção do ânion superóxido. Os pontos de trabalho foram selecionados fixando-se a fase aquosa - FA (dispersão de Carbopol[®] 974 0,5%) em 25% e variando-se o tensoativo - silicone DC[®] 5329 (T) e a fase oleosa - silicone DC[®] 193 (FO). De acordo com os resultados de MLP e SAXS, as formulações apresentaram estrutura lamelar e se comportaram como um fluido não newtoniano, pseudoplástico e tixotrópico. Além disso, os estudos reológicos demonstraram que as formulações possuem certo grau de estruturação. Na análise do perfil de textura e bioadesão *in vitro*, as formulações desenvolvidas foram bioadesivas e apresentaram espalhabilidade na pele. Estudos de citotoxicidade realizados com células Caco-2 e SV-80 evidenciaram que os componentes da formulação não são citotóxicos. Os ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* evidenciaram pequena liberação, permeação e retenção cutânea para o RES incorporado em F1 (25% FA, 55% T e 20% FO). Nos ensaios *in vivo* observou-se que o RES incorporado nesta formulação possui elevada capacidade anti-inflamatória e antioxidante. Os resultados obtidos sugerem que este sistema contendo RES, em virtude das características estruturais, acitotóxicas, antioxidantes e anti-inflamatórias, é promissor para utilização no tratamento de desordens cutâneas decorrentes do estresse oxidativo.

Palavras Chave: sistemas líquido-cristalinos, nanotecnologia farmacêutica, *trans*-resveratrol, fotoenvelhecimento, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The daily exposure of the skin to ultraviolet radiation can cause direct damage to DNA and cause the proliferation of reactive oxygen species (ROS), which leads to an imbalance between free radicals and antioxidant enzymes in the epidermis, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). This imbalance leads to a state of oxidative stress and consequently to photoaging, which can be delayed and even treated by the use of products with antioxidant properties. Researches have shown many beneficial effects of *trans*-resveratrol (RES) to human health, including its antioxidant and anti-inflammatory actions. It can be an important ally on prevention and treatment of cutaneous disorders like cutaneous aging, hyperpigmentation and carcinogenesis. However, some of their physicochemical properties, such as limited aqueous solubility, make their effectiveness on therapeutic cutaneous more difficult since it has low penetration into the skin. Thus, the use of nanostructured delivery systems for cutaneous administration of the RES, such as liquid-crystalline systems (LCS) would be extremely viable in order to locate the active ingredient in its site of action, modulating their action and reducing possible side effects, and increasing their penetration through the stratum corneum. The objectives of this work are to develop LCS to incorporate the RES and to characterize them by means of polarized light microscopy, small-angle x-ray scattering (SAXS), texture evaluation and rheology. It was done release, retention and permeation tests using skin of an animal model. It was evaluated *in vivo* RES anti-inflammatory and antioxidant efficacy by following tests: edema, myeloperoxidase activity, cytokines levels, matrix metalloprotease-9 (MMP-9) secretion/activity, reduced glutathione (GSH), FRAP, ABTS, catalase activity, lipid peroxidation and superoxide anion. The working points were selected settling the aqueous phase - FA (Carbopol® 974 dispersion 5%) by 25% and varying the surfactant (T) - silicon DC® 5329 (T) and the oil phase – silicon DC® 193. According to the results of SAXS and MLP, the formulations showed lamellar structure and behave as non-Newtonian fluid, pseudoplastic and thixotropic. Additionally, rheological studies have demonstrated that the formulations have highly structured. In texture profile analysis and *in vitro* bioadhesion assays, the developed formulations were bioadhesion and showed skin spreadability. Cytotoxicity studies performed with Caco-2 and SV-80 cells showed that the formulation components are non-cytotoxic. The tests of *in vitro* release, permeation and skin retention showed little release, permeation and skin retention for RES incorporate into F1 (25% WP, 55% S e 20% OP). On *in vivo* tests it was noted that the RES incorporated into this formulation had a high anti-inflammatory and antioxidant capacity. The results suggest that this system with RES, due to structural, and non-cytotoxic features, anti-inflammatory and antioxidant efficacy, is promising for use in the treatment of skin disorders resulting from oxidative stress.

Keywords: Liquid-crystalline systems, pharmaceutical nanotechnology, *trans*-resveratrol, photoaging, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do <i>trans</i> -resveratrol e <i>cis</i> -resveratrol, respectivamente	29
Figura 2: Representação esquemática da reação de redução do AB.	44
Figura 3: Diagrama de fases – Análise visual. (●) sistema viscoso translúcido, (●) sistema viscoso transparente, (▼) sistema transparente de baixa viscosidade, (■) sistema líquido transparente, (■) sistema translúcido de baixa viscosidade e (▲) separação de fases.	56
Figura 4: Diagrama de fases para o sistema estabilizado com silicone DC 5329 como tensoativo, fase oleosa silicone DC 193 fase aquosa com 5% de dispersão de carbopol. As áreas delimitadas representam: ME - microemulsão, FC – fase cúbica, FH – fase hexagonal, FL – fase lamelar e TF – transição de fase.	58
Figura 5: Fotomicrografias das formulações obtidas por microscopia de luz polarizada – A: F1; B: F2; C: F3; D: F4	59
Figura 6: Fotomicrografias das formulações obtidas por microscopia de luz polarizada com a presença de 0,1% de <i>Trans</i> -resveratrol – A: F1R; B: F2R; C: F3R; D: F4R.....	60
Figura 7: Curvas de SAXS das formulações F1, F2, F3, e F4 acrescidas ou não de <i>trans</i> -resveratrol. (A) F1 e F1R, (B) F2 e F2R, (C) F3 e F3R, (D) F4 e F4R	61
Figura 8: tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F1	66
Figura 9: Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F2	67
Figura 10: Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F3	67
Figura 11: Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F1 e F1 acrescida RES (F1R).	70
Figura 12: Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F2 e F2 acrescida de RES (F2R).	70
Figura 13: Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F3 e F3 acrescida de RES (F3R).	71
Figura 14: Variação do módulo de armazenagem G', módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F1.	73

Figura 15: Variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F2.	74
Figura 16: Variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F3.	75
Figura 17: Variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F4.	75
Figura 18: Variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F1 e F1 acrescida de RES (F1R).	76
Figura 19: Variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F2 e F2 acrescida de RES (F2R).	77
Figura 20: Variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F3 e F3 acrescida de RES (F3R).	78
Figura 21: Variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F4 e F4 acrescida de RES (F4R).	79
Figura 22: Curva analítica do RES em solução receptora.	84
Figura 23: Cromatograma de 10ug/ml de RES em meio receptor.	86
Figura 24: Cromatograma do meio receptor.	87
Figura 25: Cromatograma da solução contendo a formulação.	87
Figura 26: Viabilidade celular em relação à porcentagem de controle de células Caco-2 tratadas com dispersão de carbopol 974 [®] , silicone DC [®] 193, silicone DC [®] 5329 em diferentes concentrações durante 24 horas.	88
Figura 27: Viabilidade celular em relação à porcentagem de controle de células Caco-2 tratadas com dispersão de carbopol 974 [®] , silicone DC [®] 193, silicone DC [®] 5329 em diferentes concentrações durante 48 horas.	89
Figura 28: Viabilidade celular em relação à porcentagem de controle de células SV-80 tratadas com dispersão de carbopol 974 [®] , silicone DC [®] 193, silicone DC [®] 5329 em diferentes concentrações durante 24 horas.	90

Figura 29: Viabilidade celular em relação à porcentagem de controle de células SV-80 tratadas com dispersão de carbopol 974 [®] , silicone DC [®] 193, silicone DC [®] 5329 em diferentes concentrações durante 48 horas.	90
Figura 30: Perfil de liberação <i>in vitro</i> do RES na formulação F1 R durante 24 horas de análise.....	92
Figura 31. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do RES incorporado em propilenoglicol durante 24 horas de análise.....	94
Figura 32. Sistema líquido-cristalino contendo RES no edema cutâneo induzido pela irradiação UVB. Os resultados são representados pela média ± EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado, e #comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES (p<0,05). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.....	97
Figura 33. Sistema líquido-cristalino contendo RES inibe a atividade da MPO induzida pela irradiação UVB. Os resultados são representados pela média ± EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado, #comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES (p<0,05). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.....	99
Figura 34. Sistema líquido-cristalino contendo RES na secreção/atividade da MMP-9 induzida pela irradiação UVB. Os resultados são representados pela média ± EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado, #comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES (p<0,05). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.....	101
Figura 35. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES na produção de citocinas induzidas pela irradiação UVB. Os resultados são representados pela média ± EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado (p<0,05). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle	

irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES..... 102

Figura 36. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES nos níveis de GSH após irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado e # comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES. 104

Figura 37. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES nos níveis do antioxidante catalase após irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado # comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES. 105

Figura 38. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES no poder redutor férrico após irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado # comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES. 107

Figura 39. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES em sequestrar o radical ABTS⁺ após irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado # comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES. 107

Figura 40. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES na produção de hidroperóxidos lipídicos após irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado # comparado com grupo controle irradiado e SLC

sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES. 109

Figura 41. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES na produção do ânion superóxido induzido pela irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado e # comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES. 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e variações nas concentrações de fase oleosa e tensoativo.	57
Tabela 2. Valores da razão entre as distâncias interplanares das formulações F1, F2, F3, F4 e F1R, F2R, F3R, F4R acrescidas de RES.	63
Tabela 3: Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) das formulações F1, F2, F3.....	68
Tabela 4: Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) das formulações F1, F2, F3 e F1, F2, F3 acrescidas de RES (respectivamente, F1R, F2R e F3R)...	71
Tabela 5: Propriedades mecânicas das formulações determinadas por meio do teste de TPA. Cada valor representa a média do ensaio \pm desvio padrão.	81
Tabela 6: Trabalho da força bioadesiva (mN.s) das formulações. Os valores representam a média \pm desvio padrão, à temperatura de 32°C.....	83
Tabela 7: Resultados da avaliação da precisão.....	85
Tabela 8: Resultados da avaliação da exatidão.....	86
Tabela 9. Coeficiente de liberação in vitro do RES obtido, pelos de diferentes modelos matemáticos para a formulação F1R.....	93
Tabela 10: Quantidade de RES retido na pele após 24h de experimento na formulação F1R.....	96

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1. Consequências da exposição aos raios UV.....	25
2.2. <i>Trans-resveratrol</i>	27
2.3. Sistemas líquido-cristalinos.....	31
3. OBJETIVO	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Material	35
4.1.1. Soluções e reagentes.....	35
4.1.2. Equipamentos.....	36
4.2. Métodos	37
4.2.1. Preparação da dispersão de Carbopol® C974.....	37
4.2.2. Construção do diagrama ternário de fases.....	38
4.2.3. Análise estrutural do sistema.....	38
4.2.3.1. Microscopia de luz polarizada.....	38
4.2.3.2. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	38
4.2.3.3. Determinação do comportamento reológico	39
4.2.3.4. Ensaio de perfil de textura (TPA)	39
4.2.3.5. Ensaio de bioadesão <i>in vitro</i>	40
4.2.4. Metodologia analítica para quantificação de RES por CLAE.....	40
4.2.4.1. Linearidade	41
4.2.4.2. Precisão	41
4.2.4.3. Exatidão	41
4.2.4.4. Especificidade / Seletividade	41
4.2.5. Avaliação da toxicidade em células Caco-2 e SV-80	42
4.2.5.1. Culturas celulares: manutenção e manuseio	42

4.2.5.1.1. Cultura celular.....	42
4.2.5.1.2. Meios de cultura	42
4.2.5.1.3. Tratamento das células.....	43
4.2.5.1.4. Ensaio de citotoxicidade utilizando Alamar Blue®	43
4.2.6. Estudo de liberação do RES in vitro	45
4.2.7. Ensaio de permeação cutânea in vitro	45
4.2.8. Avaliação da retenção cutânea in vitro do RES.....	46
4.2.9. Avaliação da eficácia in vivo do RES	46
4.2.9.1. Animais experimentais	46
4.2.9.2. Fonte de radiação UVB.....	47
4.2.9.3. Protocolo experimental para administração tópica do RES	47
4.2.9.4. Avaliação da eficácia anti-inflamatória <i>in vivo</i> do RES.....	48
4.2.9.4.1. Avaliação do edema cutâneo.....	48
4.2.9.4.2. Avaliação da atividade de MPO.....	48
4.2.9.4.3. Avaliação da inibição de secreção/atividade da MMP-9.....	49
4.2.9.4.4. Avaliação da produção de IL-10	50
4.2.9.5. Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> do RES na proteção da capacidade antioxidante da pele	51
4.2.9.5.1. Dosagem do antioxidante endógeno GSH.....	51
4.2.9.5.2. Avaliação do poder antioxidante redutor férrico (FRAP).....	52
4.2.9.5.3. Capacidade sequestradora do radical ABTS ⁺	52
4.2.9.5.4. Dosagem da atividade de catalase (CAT)	52
4.2.9.5.5. Avaliação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)	53
4.2.9.5.6. Produção de ânion superóxido	53
4.2.9.6. Análise estatística	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Construção do diagrama ternário de fases	55

5.1.1.	Formulações selecionadas	57
5.2.	Análise estrutural dos sistemas	58
5.2.1.	Microscopia de luz polarizada para as formulações selecionadas	58
5.2.2.	Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	60
5.2.3.	Determinação do comportamento reológico	64
5.2.3.1.	Análise reológica de fluxo contínuo.....	64
5.2.3.2.	Análise reológica oscilatória de varredura de frequência	72
5.2.3.3.	Ensaio de perfil de textura (TPA)	80
5.2.3.4.	Ensaio de bioadesão <i>in vitro</i>	82
5.3.	Metodologia Analítica.....	84
5.3.1.	Linearidade.....	84
5.3.2.	Precisão.....	85
5.3.3.	Exatidão.....	85
5.3.4.	Especificidade / Seletividade	86
5.4.	Avaliação da citotoxicidade em células Caco-2 e SV-80	88
5.5.	Avaliação da Liberação do RES <i>in vitro</i>	91
5.6.	Avaliação da permeação e retenção do RES <i>in vitro</i> em peles de modelo de animal	95
5.7.	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> do RES.....	96
5.7.1.	Avaliação da eficácia anti-inflamatória <i>in vivo</i> do RES	97
5.7.1.1.	Avaliação do edema cutâneo.....	97
5.7.1.2.	Avaliação da atividade de MPO	98
5.7.1.3.	Avaliação da inibição de secreção/atividade da MMP-9	100
5.7.1.4.	Avaliação da produção de IL-10	102
5.7.2.	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> do RES na proteção da capacidade antioxidante da pele	103
5.7.2.1.	Dosagem do antioxidante GSH e CAT.....	103
5.7.2.2.	Ensaio FRAP e ABTS	105

Sumário

5.7.2.3. Determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH).....	108
5.7.2.4. Produção do ânion superóxido	110
6. Conclusões	113
7. Referências.....	115

1. INTRODUÇÃO

A exposição da pele a diversos agentes externos pode causar sérios danos e contribuir para o desenvolvimento de várias doenças cutâneas. A radiação solar ultravioleta (UV) é dividida, de acordo com o comprimento de onda, em três regiões: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (200-280nm), sendo que esta última é absorvida pela camada de ozônio da atmosfera da Terra e, portanto, o seu papel na patogênese humana é mínimo (SKOBOWIAT et al., 2011). A radiação UVA é mais penetrante que a UVB e induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, interagem com proteínas e lipídeos ocasionando alterações na função celular e mutações no DNA. Já a radiação UVB é a responsável por vários danos imediatos à pele, como por exemplo, inflamação, queimadura e hiperpigmentação. Além disso, causa dano direto ao DNA e também ocasiona a proliferação de EROs (MONTAGNER & COSTA, 2009; KATIYAR, 2008).

Os efeitos da energia solar sobre a pele são determinados pela dose e duração da exposição aos raios UV, pela área exposta e pré-disposição genética do indivíduo (VOLKMER & GREINERT, 2011). Os efeitos nocivos dessa radiação sobre a pele podem ser imediatos, como queimaduras e prurido, ou crônicos, como fotoenvelhecimento, hiperpigmentação e câncer de pele (VENDITTI et al., 2011).

De acordo com Chang et al. (2010), a radiação UV tem sido associada à crescente incidência de câncer de pele ao redor do mundo. Desde 1940, houve crescimento de 600% nos casos de câncer de pele não-melanoma e melanoma (HATFIELD et al., 2009). O carcinoma do tipo não melanoma é o mais frequente no Brasil e corresponde a 25% dos tumores malignos, apresentando alto percentual de cura e baixa mortalidade. Já o carcinoma do tipo melanoma é o mais grave devido a sua alta possibilidade de metástase, porém, corresponde a 4% das neoplasias malignas registradas no país (INCA, 2012).

Estudos anteriores demonstraram que o *trans*-resveratrol (RES) atua como um importante aliado na prevenção e no tratamento de desordens cutâneas, como a carcinogênese, e também pode auxiliar no tratamento e prevenção do fotoenvelhecimento. Além disso, este composto natural apresenta outros efeitos benéficos à saúde humana, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, ação cardioprotetora, que inclui supressão da peroxidação lipídica e da síntese de

eicosanoides, inibição da agregação plaquetária e ação vasorrelaxante (NDIAYE *et al.*, 2011; AGGARWAL *et al.*, 2004; VANG *et al.*, 2011).

Um dos maiores problemas relacionados ao RES é a baixa biodisponibilidade *in vivo* 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).

Logo, a administração cutânea do RES pode ser conveniente a fim de localizá-lo no seu sítio de ação. No entanto, algumas propriedades físico-químicas, como limitada solubilidade aquosa, dificultam sua eficiência terapêutica tópica, uma vez que possui baixa penetração na pele (AZIZ *et al.*, 2005).

As estratégias tecnológicas que apresentem a capacidade de compartimentalizar eficientemente diversos grupos de princípios ativos e de modificar suas propriedades e comportamento em meio biológico, podem ser adotadas objetivando melhorar aspectos relacionados à formulação, como instabilidade e baixa eficácia. 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 diversas substâncias ativas, a re-introdução 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).

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

protegerem princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação (MOHANRAJ & CHEN, 2006; GUTERRES *et al.*, 2007; VENUGOPAL *et al.*, 2009).

Os sistemas líquido-cristalinos (SLC) apresentam propriedades de um sólido cristalino e de um líquido isotrópico e estão ganhando notoriedade como um carreador de substâncias ativas para administração cutânea, principalmente em virtude de suas características de interação com o estrato córneo e outras camadas da pele, além da capacidade de arranjo do fármaco com efeito protetor e sustentador da liberação. Quando comparado com outros veículos, como emulsões e géis, os SLC apresentam a vantagem de controlar a liberação do fármaco, promoverem baixa irritação cutânea e protegerem a substância ativa da ação da luz. Além do mais, os SLC apresentam tamanho de partícula reduzido, aumentando o contato com o estrato córneo e promovendo maior penetração cutânea. Tais sistemas também apresentam normalmente baixo custo, possibilidade de produção em escala industrial e, ainda, melhora da estética do produto final devido à sua aparência translúcida e transparente (ROSSETTI, 2010; ANDRADE, 2008; BOOCK, 2007).

Existem poucos estudos focados no desenvolvimento de sistemas de liberação contendo RES. Grande parte dos estudos envolve o uso de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e lipossomas para incorporação desta substância ativa. 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. Amri e colaboradores (2012) encapsularam RES em lipossomas e observaram aumento da estabilidade e da atividade antioxidante, permitindo também uma liberação sustentada desta substância.

De maneira geral, as publicações verificadas apresentaram resultados promissores que justificam estudos que evidenciem a liberação controlada do RES, dentre eles envolvendo SLC, objetivando aumentar sua biodisponibilidade e diminuir sua dose administrada. Logo, sua utilização em SLC para administração cutânea seria extremamente viável, a fim de localizá-lo no seu sítio de ação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Consequências da exposição aos raios UV

A pele é um dos órgãos mais importantes do corpo humano, sendo constituída por diversas camadas que, por sua vez, se diferem na estrutura e composição. A sua função é atuar como barreira protetora dos órgãos internos, ficando exposta a agentes químicos, físicos e microbiológicos, os quais são capazes de induzir alterações estruturais como o envelhecimento cutâneo e levar ao aparecimento de patologias (NDIAYEA *et al.*, 2011; NKENGNE & BERTIN, 2012).

Diariamente, estamos expostos a radiações UV emitidos pelo sol. A exposição prolongada à radiação UV desencadeia uma série de eventos fisiopatológicos na pele resultando em declínio funcional e mortalidade das células e organismos. Além disso, ocorre o processo definido como estresse oxidativo devido ao desequilíbrio entre os antioxidantes naturais da pele e a produção exacerbada de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROS) (MORIWAKI & TAKAHASHI, 2008; SHAH & MAHAJAN, 2013).

Os radicais livres são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital de valência (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2009). Quando formados, interagem facilmente com outras substâncias por meio de reações de oxi-redução para estabilizar rapidamente a sua configuração eletrônica (JENSEN, 2003; HALLIWELL, 2009).

Dentre as principais EROS formadas como consequência a exposição excessiva aos raios UV destacam-se o radical hidroxil ($\text{HO}\cdot$) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), os radicais peroxil e alcoxil ($\text{RO}_2\cdot$ e $\text{RO}\cdot$), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e orgânicos (ROOH). Além das EROs, também ocorre a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN), como por exemplo, óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (FRANCO *et al.*, 2009).

As EROS desempenham diferentes papéis *in vivo*, podendo ser benéfico ou prejudicial a saúde humana. Quando em concentrações baixas, participa de diversos processos fisiológicos, como produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose e síntese de substâncias importantes, tais como hormônios e enzimas (MARTINDALE; HOLBROOK, 2002; SCHNEIDER; OLIVEIRA,

2004; SILVA, 2013). Por outro lado, quando produzidos em excesso, reagem com lipídeos de membrana, proteínas e enzimas teciduais, carboidratos e ácido desoxirribonucléico (DNA), induzindo oxidação nestas moléculas, causando danos a membrana, modificações protéicas e danos ao DNA inibindo a sua função normal. Além disso, podem desregular as vias de transdução redox-sensível, de citotoxicidade e de apoptose. (PIETTA, 2000; IVAN, 2013; SILVA, 2013).

A epiderme é composta principalmente de queratinócitos que são ricos em enzimas sequestradoras de radicais livres (antioxidantes), tais como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutathione peroxidase (GPx). (GAO & ZHANG, 2008; VOLKMER & GREINERT, 2011).

De acordo com Gao & Zhang (2008), dentre as enzimas antioxidantes, a SOD é a mais eficiente. Esta enzima converte superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), evitando assim os possíveis danos que poderiam ser ocasionados por este radical. O H_2O_2 formado é removido pela CAT e GPx. A CAT é a enzima que catalisa a reação de decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio. Já a GPx catalisa as reações de doação de elétrons, tendo como agente redutor a glutathione reduzida (GSH) e conseqüentemente dando origem à glutathione oxidada (GSSG). Entretanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção dos radicais livres e as defesas antioxidantes pode ser prejudicado devido à produção exacerbada dessas espécies reativas ou à deficiência das defesas antioxidantes da célula (HALLIWELL, 2009). Dessa maneira, o estresse oxidativo tem sido apontado como uma das causas de numerosas doenças como câncer, aterosclerose, doenças autoimunes como a artrite reumatóide, Parkinson, doença neuro motora, doenças pulmonares, diabetes e propagação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em pacientes HIV positivos (ARUOMA, 1999; VASCONCELOS et al., 2007).

A exposição à radiação UV, além de induzir ao desequilíbrio entre os radicais livres e os antioxidantes da pele, ainda ocasiona a liberação de uma rede de citocinas inflamatórias. Essas citocinas, por sua vez causam vasodilatação, alargamento das junções endoteliais, extravasamento de proteínas e líquido no interstício resultando em edema na pele. Neutrófilos são ativados e ocorre a estimulação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e das metaloproteinases (MMPs). Além disso, ocorre o aumento de interleucinas, TNF - α , diferentes receptores de fatores de crescimento, ativação de NF- κ B e, por fim, diminuição nos

níveis de TGF. Dessa forma, ocorre à indução de um processo inflamatório. Tais eventos podem ser considerados primordiais para o aparecimento danos na pele e fotoenvelhecimento. O processo inflamatório decorrente da liberação dessas substâncias após a irradiação UV representa uma tentativa de proteção do organismo para restaurar a homeostasia. Entretanto, essa tentativa de restaurar o estado homeostático pode, ao mesmo tempo, ser prejudicial, resultando assim, em doenças inflamatórias como a psoríase e a dermatite de contato (CAMPANINI *et al.*, 2013).

2.2. Trans-resveratrol

Os compostos fenólicos têm atraído considerável interesse pela comunidade científica devido aos seus efeitos benéficos à saúde humana (SHI *et al.*, 2008).

O resveratrol é um composto polifenólico e não-flavonóide encontrado em uvas, amendoim, amora e outros alimentos que geralmente são consumidos como parte da dieta humana. Este composto foi isolado pela primeira vez em 1940 como um ingrediente das raízes de heléboro branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) e foi identificado em 1963 a partir de raízes secas de *Cuspidatum polygonum*, uma planta usada na medicina asiática tradicional (BAUR & SINCLAIR, 2006; NOTAS *et al.*, 2006; KUNDU & SURH, 2008). O resveratrol se acumula na planta em resposta ao estresse, lesões, infecção fúngica e irradiação UV (NOTAS *et al.*, 2006).

Desde a descoberta, e, especialmente, a partir de 1990, o resveratrol tem recebido muita atenção da comunidade científica. Este composto tem demonstrado não só a capacidade de inibir a ativação do câncer, mas também de diminuir o desenvolvimento do tumor em diversos tipos desta doença (LUCAS-ABELLÁN *et al.*, 2007). Outros efeitos benéficos foram demonstrados, incluindo proteção cardíaca (AMRI *et al.*, 2012; BRITTES *et al.*, 2010), anti-inflamatória, antimicrobiana (PIOTROWSKA *et al.*, 2012), inibição da agregação de plaquetas (LI *et al.*, 2007; ZAMIN *et al.*, 2006), melhoria do perfil lipídico e metabolismo das lipoproteínas, aumento na sensibilidade a insulina, prolongamento da sobrevida (LU *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2009), e, por fim, propriedades antioxidantes e atividade anti-envelhecimento (KALRA *et al.*, 2008; FERNÁNDEZ-MAR *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012).

Segundo Baur & Sinclair (2006) e King *et al.* (2005), as ações biológicas do resveratrol são decorrentes da sua capacidade para inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade humana, supressão de ciclo-oxigenase-2, diminuição da produção e atividade do óxido e redução do estresse oxidativo. Tais funções benéficas acentuam seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Há relatos também sobre a sua ação como agente terapêutico em doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla) (WIGHT *et al.*, 2012); modulação da artrite inflamatória por meio da supressão da resposta humoral, a qual é necessária para o desenvolvimento da doença (XUZHU *et al.*, 2012), inibição da síntese de tromboxano B2 e hidroxieptadecatrionato (HHT) e inibição de maneira dose-dependente da agregação plaquetária (PACE-ASCIK *et al.*, 1995).

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

O resveratrol existe na forma de dois isômeros estruturais: *cis*-(Z) e *trans*-(E) (Figura 1). O *trans*-isômero é biologicamente mais ativo que o *cis*-isômero provavelmente devido à sua conformação planar, o que lhe confere maior estabilidade numa faixa de pH de 1 a 7, além da viabilidade comercial (FULDA, 2010; RIUS *et al.*, 2010; AMRI *et al.*, 2012).

biodisponibilidade e metabolismo do RES. Eles observaram que após administração de 25 mg de RES, a absorção foi de 70% e o pico plasmático desta substância e seus metabólitos foi de 491 ± 90 ng/mL (aproximadamente $2\mu\text{M}$). Além disso, foi constatado que o tempo de meia-vida do RES plasmático foi de $9,2 \pm 0,6$ horas. A partir da dose de RES recuperada na urina, foram identificadas 3 vias metabólicas, para as quais observou-se a produção de sulfato e ácido glucurônico conjugado de grupos fenólicos e hidrogenação de ligação dupla alifática. Este último composto provavelmente foi produto da microflora intestinal. De acordo com os pesquisadores, provavelmente o fator limitante para a baixa biodisponibilidade do RES é a rápida conjugação pelo fígado e intestino (WALLE *et al.*, 2004).

Em outro estudo conduzido também por Walle e colaboradores (2011) avaliando a biodisponibilidade do RES, foi demonstrado que a absorção oral desta substância foi aproximadamente 75%. Este estudo está de acordo com pesquisas anteriores realizadas pelo mesmo grupo, indicando que a baixa biodisponibilidade oral do RES (menor que 1%) é devido ao extenso metabolismo intestinal e hepático (WALLE *et al.*, 2011).

A dose diária ideal de RES recomendada pela via oral é de 400mg, o que corresponde cerca de 1000 litros de vinho. Desta forma, nota-se a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas e formulações para ser administradas por outras vias de administração (SARAF & KAUR, 2010; NDIAYEA *et al.*, 2011; FONTES, 2013).

Recentemente há uma grande atenção por parte das indústrias farmacêuticas em sistemas de liberação que sejam capazes de aumentar a estabilidade de compostos sensíveis ao oxigênio, água e luz. Além disso, há o interesse também em sistemas que oferecem um melhor direcionamento para a camada superior da pele e que minimizem os efeitos adversos observados na administração pela via oral, o que conseqüentemente aumenta a aceitação pelo paciente (KAUR *et al.*, 2007).

2.3. Sistemas líquido-cristalinos

Estudos recentes têm demonstrado a importância dos sistemas de liberação na eficácia da farmacoterapia. Diversos são os problemas associados a falhas farmacoterápicas, tais como: toxicidade de alguns fármacos (fármacos na terapia do câncer), baixa solubilidade, baixas concentrações plasmáticas de alguns fármacos devido à baixa absorção, rápida metabolização e, ainda, rápida eliminação (RES). Com relação à biodisponibilidade dos fármacos, a via oral acarreta certos problemas como flutuações nos picos plasmáticos devido à absorção imprevisível e presença de alimentos provenientes do consumo diário (RIGON, 2013). Dessa maneira, estudos tem se focado no desenvolvimento de sistemas de liberação adequados para a finalidade pretendida de cada tratamento, como por exemplo, os sistemas líquido-cristalinos.

Em 1889, Lehmann descreveu um estado intermediário decorrente da transformação térmica do estado sólido para o líquido que, a partir deste momento, passou a ser conhecido como cristal líquido (CLs). Já em 1922, para tentar definir este novo estado da matéria, Friedel utilizou o termo —estado mesomórfico” (*mesos* – intermediário e *morphé* – forma). Dessa forma, os cristais líquidos passaram a ser conhecidos também como fases mesomórficas cristalinas ou simplesmente fases mesomórficas (MULLER-GOYMANN & FRANK, 1986; FERRARI, 1998; FERRARI *et al.*, 2004; MORAIS, 2006; CHORILLI *et al.*, 2009).

Os sistemas líquido-cristalinos apresentam, concomitantemente, propriedades de um sólido cristalino como rigidez e ligações definidas e, de um líquido isotrópico, como regiões desordenadas e fluidas. Esta mistura característica confere ao cristal líquido propriedades mecânicas típicas do estado líquido, incluindo fluidez e tensão superficial, porém com certa ordem molecular, ou seja, possui característica de uma fase fluida ordenada. Além disso, estas mesofases cristalinas exibem propriedades ópticas como anisotropia (direção óptica), birrefringência e dicromismo de acordo com o seu arranjo molecular (FERRARI, 1998; HYDE *et al.*, 2001; FERRARI *et al.*, 2004; MORAIS, 2006; CHORILLI *et al.*, 2009).

A anisotropia ocorre quando o material é capaz desviar a propagação da luz em direções não equivalentes. A birrefringência, também conhecida como refração dupla, ocorre quando um feixe individual de luz branca penetra no material e separam-se em dois feixes que passam a vibrar a ângulos retos um em relação ao

outro. Já o dicromismo é consequência da maior absorção de um componente de luz polarizada em relação a outro (CHORILLI *et al.*, 2009).

Os cristais líquidos são formados por moléculas de tensoativo que se auto-agregam quando estão na presença de água. Estas mesofases são classificadas em liotrópicas e termotrópicas. Os sistemas liotrópicos são formados por meio da adição de solventes; já para os termotrópicos, a sua formação é dependente da temperatura. De acordo com a variação na concentração de tensoativo, diferentes formas líquido-cristalinas podem ser formadas, como lamelares, hexagonais e cúbicas (FORMARIZ *et al.*, 2005).

A fase lamelar é formada por arranjos paralelos e planares, composta de uma bicamada de tensoativo que se estende por longa distância e é separada por camadas de água, formando uma rede unidimensional. Esta mesofase é caracterizada pela presença de cruz de malta sob o plano de luz polarizada. A fase hexagonal é formada pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bidimensionais. Sua característica sob o plano de luz polarizada é a presença de estrias. Já a fase cúbica, também conhecida como fase isotrópica viscosa, consiste em micelas normais (fase contínua polar) ou reversas (fase contínua apolar) empacotadas em simetria cúbica ou bicontínua. Diferentes das fases lamelar e hexagonal, a fase cúbica não apresenta birrefringência quando observada em microscópio de luz polarizada (FORMARIZ *et al.*, 2005; CARVALHO, 2012; CALIXTO, 2013).

Diversas técnicas físico-químicas podem ser utilizadas na identificação e diferenciação das fases líquido-cristalinas, dentre elas podemos citar difração de nêutrons, SAXS e reologia. Além disso, a microscopia de luz polarizada é uma ferramenta muito útil na identificação destas mesofases devido a sua birrefringência, apresentada em sistemas líquido-cristalinos, e facilidade de detecção desta técnica (BRINON *et al.*, 1999; URBAN, 2004, OYAFUSO, 2012).

Sob um plano de luz polarizada, se o material for capaz de desviar o plano de luz incidente é classificado como anisotrópico. Por outro lado, se a amostra não for capaz de desviar o plano de luz incidente, é classificada como isotrópica. As mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas são isotrópicas (FORMARIZ *et al.*, 2005; MORAIS, 2006; URBAN, 2004).

De acordo com Chorilli e colaboradores (2011), a vantagens de se utilizar os cristais líquidos como um sistema de liberação de fármacos é o grande potencial de solubilização e a melhor estabilidade física dos princípios ativos quando incorporados em sistemas líquido-cristalinos. Dessa maneira, os fármacos podem ser incorporados tanto na parte polar como na parte apolar dos cristais líquidos. Além disso, há a possibilidade de incorporação entre as moléculas de tensoativo (OTTO *et al.*, 2009).

Conforme Makai e colaboradores (2003), estas mesofases cristalinas tem sido muito utilizadas na liberação de fármacos pela via cutânea, principalmente a fase lamelar, devido à grande similaridade desta estrutura com a membrana lipídica intercelular da pele. Além disso, as mesofases lamelares e cúbicas, quando utilizadas como sistema de liberação e como veículos para administração de fármacos, apresentam propriedades bioadesivas (FORMARIZ *et al.*, 2005).

3. OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um sistema de liberação nanoestruturado para o RES que otimize a utilização desta substância ativa na terapia tópica antioxidante / anti-inflamatória e no tratamento de desordens cutâneas decorrentes do estresse oxidativo. Os objetivos específicos foram:

- Desenvolvimento do sistema líquido-cristalino (SLC) para incorporação do RES
- Caracterização dos SLC:
 - ✓ Microscopia de luz polarizada;
 - ✓ Espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS)
 - ✓ Reologia;
 - ✓ Ensaio do perfil de textura
 - ✓ Ensaio de bioadesão *in vitro*
- Avaliação da toxicidade em células Caco-2 e SV-80
- Realização de ensaios de liberação *in vitro* utilizando membranas de celulose;
- Realização de estudos de retenção e permeação *in vitro* empregando peles de modelo animal.
- Avaliação da eficácia anti-inflamatória e antioxidante *in vivo* do RES
 - ✓ Avaliação do edema cutâneo
 - ✓ Avaliação da atividade de MPO
 - ✓ Avaliação da inibição de secreção/atividade da MMP-9
 - ✓ Avaliação da produção de IL-10
 - ✓ Dosagem do antioxidante endógeno GSH
 - ✓ Avaliação do poder antioxidante redutor férrico (FRAP)
 - ✓ Capacidade sequestradora do radical ABTS⁺
 - ✓ Dosagem da atividade de catalase (CAT)
 - ✓ Avaliação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)
 - ✓ Produção de ânion superóxido

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Soluções e reagentes

- 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Sigma-Aldrich);
- 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich);
- 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) (Sigma-Aldrich);
- 2-deoxi-D-ribose (Acros);
- Acetonitrila grau CLAE (J.T. Baker, USA);
- Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) (Sigma).
- Ácido acético glacial (J.T. Baker, USA);
- Ácido linoléico (Sigma-Aldrich)
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) (Synth);
- Água (Milli-Q);
- AlamarBlue[®] (AB; Invitrogen, Alfagen, Portugal);
- Batofenantrolina (BPS) (Acros);
- Brometo de hexadecil trietil amônio (HTAB) (Sigma-Aldrich);
- Carbopol[®] 974 (Lubrizol - Cleveland, OH);
- Células Caco 2 (CLS, Eppelheim, Alemanha);
- Células SV-80 (CLS Cell Lines Service, Alemanha);
- Corante azul brilhante (Sigma-Aldrich);
- Ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) (Alexis Corporation);
- DMEM (Dulbeco's modified Eagle's medium) (Gibco, Life technologies, USA);
- Fenantrolina (Sigma-Aldrich);
- Fita adesiva 750 transparente Scotch[®] (3M Brasil);
- Fluoreto de fenilmetilsulfonila (Sigma-Aldrich);
- Glutationa Reduzida (GSH) (Sigma-Aldrich);
- Kits de ELISA para dosagem das citocinas IL-10 (Bioscience);
- L-glutamina (Gibco, Life technologies, USA);
- Metanol grau CLAE (J.T. Baker, USA);
- N-etilmaleimida (Sigma-Aldrich);
- o-Dianisidina (Sigma-Aldrich);

- Penicilina (Gibco, Life technologies, USA);
- Polissorbato 80 (Sigma-Aldrich, USA);
- Silicone DC[®] 193 (Dow Corning - Brasil);
- Silicone DC[®] 5329 (Dow Corning - Brasil);
- Soro fetal bovino, FBS (Gibco, Life technologies, USA);
- streptomina (Gibco, Life technologies, USA);
- Substância química de referência (SQR) é o trans-resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxi-trans-estilbeno), 99% de pureza (Sigma-Aldrich, USA).;
- *Trans-resveratrol* (Regu[®] Fade, Sarfam, Brasil).
- Trietanolamina (Synth - Brasil);
- Tripsina- EDTA 0,05 % (v/v), (Gibco, Life technologies, USA).
- Trolox (Acros)
- Xilene cianol (Amresco);

4.1.2. Equipamentos

- Agitador mecânico (Fisatom[®]);
- Agitador Orbital, modelo 255 (Fanem[®]);
- Amostrador Auto Multi Fill[™] (Hanson Research, USA);
- Analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK);
- As medidas de SAXS foram realizadas na linha D11-A SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas-SP;
- Balança analítica, Micronal B160;
- Banho Maria 100 (Fanem);
- Banho, modelo 314/2 DN (Nova Ética);
- Bomba de vácuo;
- Centrífuga refrigerada, modelo Rotina 46 R (Hettich Zentrifugen);
- Centrífuga Sorvall[®] TC6 (Sorvall, Brasil);
- Centrífuga, modelo Baby I 206-BL (Fanem);
- Coluna C18 Luna (250 mm x 4,6mm I.D. 5um; Phenomenex, Torrance, EUA);
- Compartimento de madeira projetado para irradiação;
- Contador automático (TC10 automated cell conter) (BIO-RAD, Portugal)

- Cromatógrafo de Alta Eficiência Waters® Alliance, modelo 2695, equipado com detector UV-Vis Photodiodearray, modelo 2996;
- Deionizador de água, modelo Purebal Option-Q (Elga);
- Espectrofotômetro, modelo Evolution 60 (Thermo Scientific);
- Espectrofotômetro, modelo Helios alfa (Thermo Spectronic);
- Estufa 0-120 °C (De LEO & Cia);
- Fonte elétrica para eletroforese, modelo MS 300V (Major Science);
- Homogeneizador de tecido, modelo Tissue-Tearor (Biospec);
- Homogeneizador de tecidos Ultra Turrax®, modelo T18 basic (IKA);
- Lâmina de leitura (BIO-RAD, Portugal);
- Lâmpada ultravioleta fluorescente, modelo PHILIPS TL/12 40W RS-UVB (MedicalHoland);
- Leitor de microplaca, modelo Asys Expert Plus (Biochrom);
- Leitor de microplaca, modelo Victor X3 (Perkin Elmer);
- Microscópio Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena;
- Permeador Microette Plus™ (Hanson Research, USA);
- pHmetro, modelo Tec-3MP (TECNAL);
- Pipetas automáticas 20, 100, 200 e 1000 M, modelo LabMate (HTL);
- Radiômetro IL 1700 (Research Radiometer);
- Reômetro AR 200 EX – TA Instruments ;
- Ultrassom Ultrasonic Cleaner Unique Modelo USC 2800A (Unique Ind., Brasil);
- Ultrassom Unique;
- Vortex Phoenix® AT56 (Phoenix, Brasil);

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação da dispersão de Carbopol® C974

A dispersão de Carbopol® C974 (C974) foi preparada na concentração de 5,0% (m/m). Este polímero foi suspenso em água Milli-Q e misturado com o auxílio de grau e pistilo. Após a completa solubilização, o pH foi ajustado para 7,0 com trietanolamina.

4.2.2. *Construção do diagrama ternário de fases*

Foi construído um diagrama ternário de fases fixando-se o silicone DC[®] 193 como fase oleosa, o silicone DC[®] 5329 como tensoativo e a dispersão polimérica de Carbopol[®] 974 a 0,5% como fase aquosa.

Inicialmente, misturou-se 10% da dispersão polimérica a 5% com água, de modo que resultasse numa percentagem polimérica final nos sistemas de 0,5%.

Os sistemas foram preparados por mistura direta dos componentes à temperatura ambiente e homogeneização com a utilização de bastão de vidro durante 10 minutos.

Para delimitar as diferentes regiões no diagrama de fase, os sistemas formados e suas consistências foram analisados visualmente, contra fundo escuro e classificados como sistemas viscosos ou líquidos opticamente transparentes, translúcidos ou opacos, ou ainda separação de fases.

A partir desses dados, foram selecionadas as regiões dos sistemas para a análise estrutural. A incorporação de RES foi feita na fase oleosa. Incorporou-se 0,1% do fármaco no sistema (RIGON, 2013), uma vez que a incorporação de maiores quantidades de fármaco ocasionava a alteração estrutural do sistema.

4.2.3. *Análise estrutural do sistema*

4.2.3.1. *Microscopia de luz polarizada*

Realizou-se a microscopia de luz polarizada colocando-se uma pequena quantidade das formulações obtidas sobre lâmina de vidro, coberta com lamínula, para análise em microscópio de luz polarizada Jenamed, Carl Zeiss. Foi avaliada a homogeneidade da formulação e, com auxílio de polarização, analisou-se a presença de área de anisotropia, o que é um indicativo da presença de cristal líquido (CHORILLI *et al.*, 2009). A análise foi realizada à temperatura ambiente e utilizou-se aumento de 20 vezes.

4.2.3.2. *Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)*

As formulações selecionadas foram analisadas por SAXS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Brasil), Campinas-SP, que é equipado com um

monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de 1,608 Å, um detector vertical localizado cerca de 1,5 m da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento $I(q)$, em função do vetor de espalhamento, q . Essa instalação permitiu um vetor de espalhamento, q , entre aproximadamente 0,1 e 2,3 Å⁻¹. O espalhamento por partículas existentes no sistema sem amostra foi subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades de todas as amostras foram medidas em unidades relativas, mas para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

4.2.3.3. Determinação do comportamento reológico

Os reogramas das formulações selecionadas foram obtidos utilizando Reômetro AR 200 EX – TA Instruments, com dispositivo cone-placa de 40mm e temperatura constante a 32 °C. As propriedades reológicas dos sistemas foram avaliadas por análise reológica contínua e por análise reológica oscilatória.

Para a realização do teste, as amostras foram aplicadas à placa inferior cuidadosamente, tentando assegurar o mínimo de cisalhamento possível da formulação. Logo após, a amostra foi deixada em repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação.

Na análise reológica de fluxo contínuo, fez-se um estudo da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento na região de 0 a 30 s⁻¹. Na análise reológica oscilatória de varredura de frequência as medidas foram realizadas em função da frequência (1 – 100 Hz), aplicando uma tensão de 1 Pa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.3.4. Ensaio de perfil de textura (TPA)

As formulações selecionadas foram submetidas ao teste TPA (*Texture profile analysis*) por meio do analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK).

Para a realização do teste, as formulações (10 g) foram colocadas em tubos de centrifuga cônicos de 50 mL (Falcon, BD[®], Franklin Lakes, EUA). Em seguida, esses tubos foram colocados embaixo da sonda analítica (10 mm de diâmetro) do analisador de textura, que foi programado para comprimir a amostra, em dois ciclos, à velocidade de 0,5 mm/s até a profundidade pré-definida (10 milímetros) e retornar

para a superfície da amostra na mesma velocidade. Após 5 segundos de repouso, a segunda compressão foi iniciada nas mesmas condições. Dessa forma, foi possível obter uma curva com as características mecânicas do sistema, como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão.

4.2.3.5. Ensaio de bioadesão *in vitro*

Para o ensaio de bioadesão foi utilizado o analisador de textura TAXTplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK), no modo *Adhesion Test*. Como membrana, utilizou-se a pele de orelha de porco dermatomizada. Na temperatura de 32°C, as formulações foram acondicionadas em recipientes de vidro pequenos sob a sonda. O teste foi iniciado abaixando a sonda a uma velocidade constante (1 mm/s) até que a pele entrasse em contato com a amostra. A pele e a amostra foram mantidas em contato durante 60 segundos e nenhuma força foi aplicada durante este tempo. Em seguida, a sonda subiu a velocidade constante (0,5 mm/s) até ocorrer o destacamento da pele da amostra. A força necessária para destacar a pele da amostra foi calculada pela curva força *versus* tempo, que resultou no pico de adesão e no trabalho de adesão do sistema. O teste foi realizado em triplicata (KOFFI *et al.*, 2006).

4.2.4. Metodologia analítica para quantificação de RES por CLAE

A metodologia analítica foi validada por Rigon (2013) e para a quantificação do RES neste trabalho foi utilizado o mesmo equipamento Waters® Alliance, modelo 2695, equipado com detector UV-Vis Photodiode Array 2996, com injetor automático. A coluna utilizada foi a coluna C18 Luna (250 mm x 4,6mm I.D. 5µm; Phenomenex, EUA), o comprimento de onda do detector foi fixado em 306,6 nm. 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) e o tempo de corrida foi de 10 minutos.

4.2.4.1. Linearidade

Construiu-se a curva analítica de RES em diferentes concentrações (0,1 – 10 µg/mL). Após a construção desta curva analítica em função da área de pico a linearidade do método na faixa de concentração testada foi avaliada pela análise da regressão linear (NEMEN; LEMOS-SENNÁ, 2011).

4.2.4.2. Precisão

A precisão foi avaliada através de ensaio de precisão intermediária. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada pela análise de 3 injeções consecutivas da solução padrão de RES, em três diferentes concentrações, em dois dias distintos (BRASIL, 2003).

4.2.4.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi verificada por meio de nove injeções, ou seja, três concentrações diferentes com três réplicas cada. Ela pode ser expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, sendo calculada pela Equação 1 (BRASIL, 2003).

$$\text{Exatidão} = (\text{CME}/\text{CT}) \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

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

4.2.4.4. Especificidade / Seletividade

A especificidade / seletividade expressa à capacidade do método em mensurar o RES no ambiente real de ensaio, especialmente na presença de interferentes, como o meio receptor e a formulação. Na análise deste parâmetro foi utilizada uma solução de trabalho contendo 10 µg/ml de RES em meio receptor do ensaio de liberação, permeação e retenção cutânea em comparação com uma solução contendo a formulação e outra solução apenas contendo o meio receptor (Polissorbato 80 a 2%).

4.2.5. Avaliação da toxicidade em células Caco-2 e SV-80

O presente ensaio foi realizado durante estágio no Centro de Investigação e Tecnologia de Ciências Agro-ambientais e Biológicas (CITAB), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal, sob supervisão da Profa. Dra. Amélia M. Lopes Dias da Silva.

4.2.5.1. Culturas celulares: manutenção e manuseio

4.2.5.1.1. Cultura celular

Células epiteliais Caco-2 (CLS, Eppelheim, isoladas a partir de adenocarcinoma de cólon humano) e SV-80 (CLS n.º. 300345; isoladas a partir de fibroblastos do pulmão) foram mantidas em meio de cultura completo numa incubadora (*Binder*) a 37 °C com 5 % de CO₂ / 95 % de ar no Laboratório de Biologia Celular e Bioenergética do Departamento de Biologia e Ambiente da Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro (DeBA-UTAD). Ambas as linhas celulares foram manipuladas em condições assépticas numa câmara de fluxo laminar, classe I (Faster, BH-En 2004) para prevenir quaisquer contaminações bacterianas, fúngicas ou virais (PHELAN, 2007; WILLARD; MERRITT & DEAN, 1965).

4.2.5.1.2. Meios de cultura

O meio de cultura para o crescimento destas células continha vitaminas, aminoácidos, glicose, íons inorgânicos, entre outros. Dessa forma, este meio foi capaz de fornecer todos os nutrientes essenciais para a proliferação celular, crescimento e metabolismo celular. Foram utilizados dois tipos diferentes de meio de cultura, um com soro (soro fetal bovino), denominado de meio de cultura completo e outro sem soro.

O meio de cultura completo consistiu de meio base DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), este já contém 25,0 mM de glicose e 0,1 g/L de piruvato. Em seguida foi suplementado com 2,0 mM de L-glutamina, 10 % (v/v) de soro fetal bovino, FBS e antibióticos (200 U/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina).

O meio de cultura sem soro foi constituído de meio base DMEM suplementado com 2 mM de L-glutamina e antibióticos (200 U/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina).

4.2.5.1.3. Tratamento das células

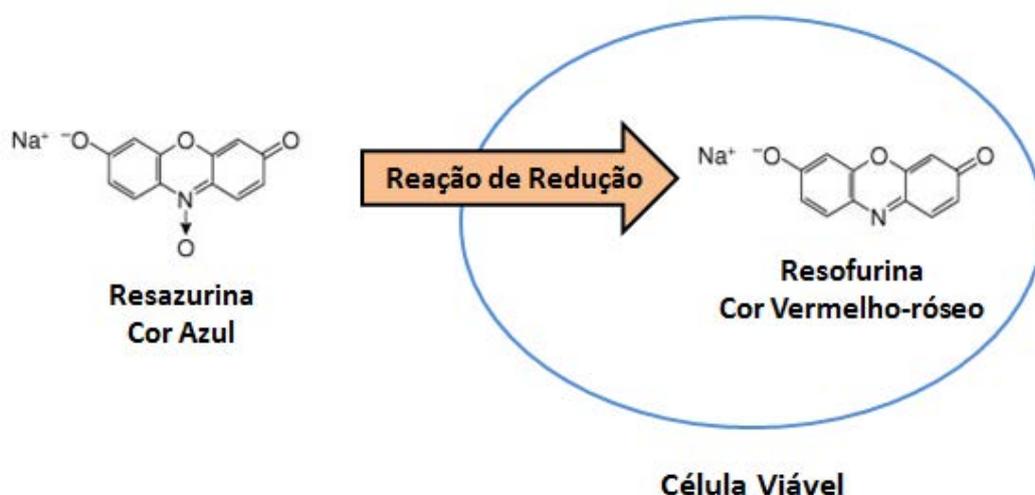
As células foram tratadas com 1 mL de solução de tripsina (tripsina- EDTA 0,05 % (v/v) por 4 a 10 minutos a 37°C para desagregar as células). Após este tempo, foi adicionado 1mL de meio de cultura com soro para inativar a tripsinização e individualizar as células. Em seguida colocou-se uma alíquota desta suspensão de células em lâmina de leitura e foi realizada a contagem das células utilizando um contador automático. Após a determinação do número de células por mililitro da suspensão, foram realizados cálculos de forma a obter a densidade de 5×10^4 células/mL.

As células já contadas foram diluídas em meio de cultura completo e 100 μ L de células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas por 24 h para restabelecimento das condições. Após as 24 h de cultura, o meio foi removido e substituído por 100 μ L de meio de cultura sem soro suplementado com as diferentes substâncias a serem testadas (Carbopol 974[®], silicone DC 193[®], silicone DC 5329[®]), nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μ g/mL ou por meio de cultura sem soro (controle).

4.2.5.1.4. Ensaio de citotoxicidade utilizando Alamar Blue[®]

Uma das formas de avaliar a viabilidade celular *in vitro* é o emprego de uma solução denominada Alamar Blue[®] (AB). Este reagente possui como substância ativa a resazurina que é capaz de permear as membranas celulares, é não-tóxica e apresenta cor azul na forma oxidada. Esta, por sua vez, pode ser facilmente reduzida por uma das oxiredutases da cadeia respiratória, dando origem ao composto resorufina que é fluorescente e de cor vermelho-rósea, sendo assim um indicador direto da atividade mitocondrial celular e do estado de viabilidade da célula. Quando o AB é adicionado em uma cultura de células, sua forma oxidada (cor azul) é capaz de entrar no citosol e, assim, é convertido a sua forma reduzida (cor vermelho-rósea) (AL-nasiry *et al.*, 2007; BOPP & LETTIERI, 2008). Logo, a taxa de conversão de resazurina e resorufina é diretamente proporcional ao número de células vivas (AL-NASIRY *et al.*, 2007). A Figura 2 demonstra a reação de redução do AB.

Figura 2: Representação esquemática da reação de redução do AB.



(adaptado de Promega, 2013).

A alteração de cor ocasionada pela redução do AB é facilmente medida por espectrofotometria ou fluorometria nos comprimentos de onda de 570 nm (resazurina, forma oxidada) e 620 nm (resorufina, forma reduzida).

Após 24 h de incubação da placa com os componentes da formulação, adicionou-se 10 μL /poço de uma solução de Alamar Blue[®] seguida por um período de incubação de 1 h (37°C, 5% de CO₂, 95% de umidade) e medida de absorbância nos comprimentos de onda de 570 nm e 620 nm. A placa foi incubada por 24 e 48 horas. O número de células viáveis é diretamente correlacionado com a quantidade de AB que foi reduzido, sendo expresso em percentagem de redução de AB (AL-NASIRY *et al.*, 2007; BOPP & LETTIERI, 2008). A equação 2 demonstra o cálculo da percentagem de redução de AB:

$$\% \text{ de redução de AB} = \frac{(\epsilon_{ox\lambda_2})(A\lambda_1) - (\epsilon_{ox\lambda_1})(A\lambda_2)}{(\epsilon_{red\lambda_1})(A\lambda_2) - (\epsilon_{red\lambda_2})(A\lambda_1)} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

(adaptado de Al-Nasiry *et al.*, 2007)

onde, ϵ_{λ_1} e ϵ_{λ_2} representa o coeficiente de extinção molar de AB a 570 e 620 nm, respectivamente, no estado oxidado (ϵ_{ox}) e reduzido (ϵ_{red}). $A\lambda_1$ e $A\lambda_2$ representam a

absorbância da amostra a 570 e 620 nm, respectivamente. $A'\lambda_1$ e $A'\lambda_2$ representam a média da absorbância do controle a 570 e 620 nm, respectivamente.

4.2.6. *Estudo de liberação do RES in vitro*

Os ensaios de liberação do RES *in vitro* foram conduzidos utilizando o sistema de célula de difusão vertical (células de Franz) com volume no compartimento receptor de 7 mL e área de contato com a amostra de 1,77 cm². Para avaliar a liberação, foi colocada entre o compartimento doador e receptor da célula de difusão uma membrana sintética de acetato de celulose com poro de 0,45 µm 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.

As formulações escolhidas foram previamente pesadas (300mg) e transferidas com auxílio de uma espátula para o anel dosador colocado sobre a membrana de acetato de celulose (DETONI *et al.*, 2012). Os experimentos foram conduzidos a 32 ± 2 °C e a solução receptora foi constantemente agitada a 300 rpm (DETONI *et al.*, 2009). Durante o ensaio, alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos 5, 15 e 30 minutos e 1, 2, 4, 8, 14, 20 e 24 horas, filtradas em membrana de 0,45 µm e analisadas por CLAE para avaliar a cinética de liberação do fármaco.

4.2.7. *Ensaio de permeação cutânea in vitro*

Neste ensaio foi utilizado peles de orelha de porco, obtidas no Frigorífico Olhos d'Água logo após o abate dos animais. As orelhas foram lavadas com água corrente, e os pêlos em excesso e tecidos não desejados foram removidos com o auxílio de tesoura. Logo após este procedimento, essas orelhas foram dissecadas com auxílio de bisturi e pinça. Em seguida, as peles foram dermatomizadas retirando-se apenas o estrato córneo, epiderme e a camada mais externa da derme com auxílio de um dermatômetro.

Uma porção da pele foi colocada entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz. Dessa forma, o estrato córneo ficou em contato com a formulação, e a derme em contato com a solução receptora (PRIMO *et al.*, 2008). O experimento foi conduzido nas mesmas condições do ensaio de liberação *in vitro* com coletas nos tempos 5, 15 e 30 minutos e 1, 2, 4, 8, 14, 20 e 24 horas. Em seguida, as

amostras coletadas foram filtradas em membrana de 0,45 μm e analisadas por CLAE para quantificar o RES na solução receptora. As peles submetidas ao estudo de permeação foram limpas com papel absorvente e avaliadas quanto à retenção.

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

Logo após o término do ensaio de permeação *in vitro* (24 horas), as peles foram retiradas das células de Franz e o excesso de formulação foi retirado com papel absorvente, sendo mantidas em vidro de relógio durante a técnica de *tape stripping* para não haver perda do fármaco. Dessa forma, o estrato córneo foi removido com o objetivo de quantificar a substância ativa que não permeou a pele. Para isso, foram utilizadas 16 fitas adesivas (Scotch 750 3M), descartando-se a primeira fita. As fitas foram transferidas para um tubo de ensaio com 5 mL de metanol, agitado em vórtex por 1 minuto e posteriormente submetido ao banho de ultrassom por 15 minutos. A solução foi filtrada em membrana 0,45 μm e quantificada por CLAE. Em seguida, o restante da pele já com o estrato córneo removido foi picotado com o auxílio de uma tesoura para avaliar a retenção na derme e epiderme. Este fragmentos foram colocados em tubos para centrifuga com 5 mL de metanol, agitados em vórtex por 2 minutos, levado ao homogeneizador Turrax[®] por 1 minuto e, por fim, foram colocados em lavadora ultrassônica por 30 minutos. Logo após, filtrou-se em membrana de e 0,45 μm e a quantificação de RES foi realizada por CLAE.

4.2.9. Avaliação da eficácia *in vivo* do RES

4.2.9.1. Animais experimentais

Como modelo animal foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, de ambos os sexos, adultos e com peso de 20 a 30 g. Os animais foram mantidos no biotério do Hospital Universitário de Londrina-PR, em sala com temperatura controlada, ciclo claro/escuro de 12h e com suprimento de água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos conforme as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Processo CEUA no. 25664.2012.35, OF. CIRC. CEUA No. 273/12,).

4.2.9.2. Fonte de radiação UVB

Para indução de estresse oxidativo foi utilizado como fonte de luz a lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS (Medical-Holand). A lâmpada emite radiação na faixa de λ de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em 313 nm. Esta lâmpada foi instalada em um compartimento de madeira desenvolvido para a indução do estresse oxidativo. Os animais foram colocados em caixas de plástico e cobertos com uma tela plástica para garantir a total exposição da região dorsal. Foi realizado um rodízio com as caixas contendo os animais devido a possíveis variações de radiação ao longo da lâmpada. Os animais ficaram a 20 cm da fonte de irradiação e movimentavam-se livremente na caixa (CASAGRANDE et al., 2006; CAMPANINI et al., 2013; IVAN et al., 2014).

4.2.9.3. Protocolo experimental para administração tópica do RES

Os animais foram aleatoriamente colocados em quatro grupos, (n= 5). Sendo:
Grupo CNI = não irradiados e não tratados;
Grupo CI = irradiados e não tratados;
Grupo SLC = irradiados e tratados com sistema líquido-cristalino sem RES;
Grupo SLC-RES = irradiados e tratados com sistema líquido-cristalino contendo RES;

As formulações foram aplicadas em todo o dorso dos animais com o auxílio de um pincel, cerca de 0,5 g, 12 h, 6 h, 5 min antes da irradiação e 6 h após o início da irradiação. A dose de irradiação utilizada para indução do estresse oxidativo foi de 4,14 J/cm² (SHINDO; WITT; PACKER, 1993; CASAGRANDE et al., 2006; CAMPANINI et al., 2013). Os animais foram terminalmente anestesiados e sacrificados, 2 h (dosagem da atividade de catalase e produção de ânion superóxido), 4 h (avaliação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos e dosagem de IL-10) e 12 h (avaliação de edema cutâneo, atividade de mieloperoxidase (MPO), avaliação do poder antioxidante redutor férrico (FRAP), sequestro do radical livre ABTS⁺ e dosagem dos níveis da glutathiona reduzida (GSH) após o término da

exposição à irradiação UVB, a pele do dorso foi retirada, limpa, lavada com NaCl 145 mM e armazenada a -70°C para as análises. Apenas a avaliação do edema cutâneo foi realizado no mesmo dia da coleta da amostra de pele.

4.2.9.4. Avaliação da eficácia anti-inflamatória *in vivo* do RES

4.2.9.4.1. Avaliação do edema cutâneo

O edema cutâneo foi avaliado por meio do aumento de peso da pele dorsal dos animais. Com o auxílio de um molde, coletou-se uma área constante de pele do dorso de cada animal e, posteriormente, a mesma foi pesada (AFAQ; ADHAMI; AHMAD, 2003; BATHIA et al., 2011; IVAN et al., 2014). O efeito do RES no edema induzido por radiação UVB foi mensurado por meio do aumento da espessura da pele na região dorsal. O resultado foi expresso em mg de pele.

4.2.9.4.2. Avaliação da atividade de MPO

A migração de neutrófilo na pele induzida por radiação UVB foi realizada pelo método cinético-colorimétrico da avaliação da atividade da MPO (BRADLEY et al., 1982, CASAGRANDE et al., 2006), uma enzima oxidorrredutora do peróxido de hidrogênio encontrada em grânulos de leucócitos.

As amostras de pele foram coletadas em 400 µL de tampão fostato 0,05 M (pH 6.0) com 0,5% de HTAB e trituradas com o triturador Tissue-Tearor (Biospec). O homogenato foi centrifugado (Rotina 46 R, HettichZentrifugen) a 11000 rpm por 2 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado para o ensaio.

Em microplaca preparou-se uma curva analítica com neutrófilos na concentração de 97,65 a 100.000 que foi utilizada para inferir o número de neutrófilos presentes nas amostras. A curva foi preparada com a adição de 100 µL de tampão fosfato 0,05M e uma solução contendo 200.000 neutrófilos no primeiro poço (A1) com posterior diluição seriada até o décimo primeiro poço (A11). O décimo segundo poço (A12) foi utilizado como branco ao qual foi adicionado apenas 200 µL de água deionizada.

O ensaio com as amostras foi realizado na mesma placa com a adição de 30 µL da amostra. A reação colorimétrica inicia-se pela adição em todos os poços de 200 µL de uma solução contendo 10% de tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0), 0,0167%

de o-dianisidina e 0,05% de H₂O₂ em água deionizada. A leitura foi realizada em até 5 minutos em 450 nm (Asys Expert Plus, Biochrom). Os resultados foram expressos em número de neutrófilos/mg de pele.

4.2.9.4.3. Avaliação da inibição de secreção/atividade da MMP-9

Para determinação de MMP-9 com atividade gelatinase foi utilizada zimografia em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

As amostras de pele foram diluídas (1:4) e trituradas (T18 basic, IKA) em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7.4) contendo cloreto de cálcio (CaCl₂) 10 mM e 1% de inibidores de proteinases (fenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonila e N-etilmaleimida). O homogenato foi duplamente centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4°C. Alíquota de 50 µL do sobrenadante foi coletada e diluída em 10 µL de tampão Tris/HCl (pH 6.8) contendo 20% de glicerol, 4% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,005% de xileno cianol. Para aplicação no gel de eletroforese foi utilizado 25 µL desta mistura. Também foi realizada a dosagem de proteínas das amostras pelo método de Lowry.

A espessura do gel utilizado foi de 1 mm e era composto por um gel de concentração (3 cm) e o gel de separação.

O gel de concentração foi preparado contendo:

- Água deionizada 4.060 µL
- Acrilamida / bisacrilamida (30:0,8) 860 µL
- Tampão Tris HCl/SDS (pH 6.8) 1.670 µL
- APS (Persulfato de amônio) 10% 33 µL
- Temed 6.6 µL

O gel de separação foi preparado contendo:

- Água deionizada 5.870 µL
- Acrilamida / bisacrilamida (30:0,8) 5.000 µL
- Tampão Tris HCl/SDS (pH 8.8) 3.750 µL
- Gelatina 10% 375 µL
- APS (Persulfato de amônio) 10% 50 µL
- Temed 10 µL

O gel foi submetido a uma pré-corrída de 10 mA por 15 min. Durante a eletroforese a corrente aplicada foi de 10 mA para o gel de largada e 13 mA para o

gel de corrida, sendo que a última corrente foi mantida constante por 15 min após a saída do corante do gel.

Após a eletroforese o gel de poliacrilamida foi lavado por 1 h com solução de triton X-100 2,5% sob constante agitação, posteriormente o gel foi incubado por 12 h a 37°C em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7.4) CaCl₂ 10 mM e 0,02% de azida sódica. Ao final da incubação o gel foi corado com uma solução contendo 0,25% de azul brilhante, 10% de ácido acético e 50% de metanol em água deionizada. Para visualização das bandas o gel foi descorado com ácido acético 20% (FONSECA et al., 2010). A atividade proteolítica foi analisada semi-quantitativamente por meio da comparação entre as bandas dos diferentes grupos pelo programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

4.2.9.4.4. Avaliação da produção de IL-10

A quantificação da citocina IL-10 foi realizada utilizando-se a técnica de enzima imunoensaio (ELISA) com kits comerciais (eBioscience) conforme descrito previamente por Verri et al. (2008).

As amostras de pele foram trituradas com o triturador Tissue-Tearor (Biospec) em 500 µL de solução NaCl 0,9%, centrifugadas a 2.000 g (Rotina 46 R, HettichZentrifugen) por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado para análise.

Para a realização do ensaio, microplacas com 96 poços foram incubadas por toda à noite a 4°C com anticorpos de captura contra as proteínas de interesse (10 µg/mL). Após esse tempo de incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e incubadas por 1 h à temperatura ambiente com uma solução a 1% de albumina bovina. Após esse bloqueio e lavagem das placas com tampão de lavagem, a curva padrão e as amostras foram adicionadas (100 µL) e incubadas a 4°C por 12 h. Posteriormente, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e os anticorpos policlonais biotinilados (anticorpo de detecção) foram adicionados (100 µL). Após incubação em temperatura ambiente por 1 h, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e 100 µL de enzima avidina-peroxidase foram adicionados. As placas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente, lavadas, e adicionado 100 µL de reagente contendo 0,04% de ortofenilenodiamina (OPD), 0,04% de H₂O₂ em tampão fosfato, a placa foi

mantida no escuro em temperatura ambiente por 15 min. A reação enzimática foi interrompida com uma solução de H_3PO_4 1M e a absorvância determinada em 450 nm (Victor X3, Perkin Elmer).

A curva padrão foi utilizada para quantificar a citocina presente na amostra e os resultados foram expressos em picogramas (pg) de citocina/mg de pele (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995; VERRI et al., 2008).

4.2.9.5. Avaliação da eficácia *in vivo* do RES na proteção da capacidade antioxidante da pele

4.2.9.5.1. Dosagem do antioxidante endógeno GSH

Dentre os diversos antioxidantes endógenos presentes na pele, o GSH é um dos principais, sendo seus níveis diminuídos pela exposição da pele a radiação UV (FUCHS, 1998). Neste ensaio realiza-se a detecção do ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico, um composto amarelo, liberado pela quebra da ligação dissulfeto do ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) pelo grupo sulfidril da glutatona (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

As amostras de pele foram diluídas (1:4) em EDTA 0,02 M e trituradas (Tissue-Tearor, Biospec). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50% na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 4000 rpm por 15 min a 4°C, o sobrenadante final foi retirado para análise.

O ensaio foi realizado em microplaca e adicionou-se 50 μL de amostra ao meio reacional contendo 100 μL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 5 μL de uma solução de DTNB em metanol (1,9 mg/mL em metanol). A absorvância foi determinada após 5 min de incubação a 405nm (Asys Expert Plus, Biochrom). A curva analítica foi preparada com 0 a 150 μM de GSH e no branco foi adicionado 50 μL de EDTA 0,02M, 100 μL Tris 0,4M (pH= 8,9) e 5 μL de DTNB. Os resultados foram expressos em μM de GSH/mg de pele (MORON; DEPIERRE; MANNERVIK, 1979; SRINIVASAN; SABITHA; SHYAMALADEV, 2007; IVAN, 2013).

4.2.9.5.2. Avaliação do poder antioxidante redutor férrico (FRAP)

Realizou-se o ensaio FRAP a fim de avaliar o poder antioxidante de redução férrica da pele. As amostras de pele foram homogeneizadas em 500µL de KCl (1,15%) com um triturador (Tissue-Tearor, Biospec) e centrifugadas a 1.000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi retirado para a análise. Para a reação foram utilizados 30 µL do sobrenadante e 1mL de reagente de FRAP. O reagente de FRAP foi preparado adicionando 2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) em HCl 40 mM a 2,5 mL de FeCl₃.6H₂O e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3,6). A solução foi incubada a 37°C por 30 min antes do uso.

A reação foi incubada por 30 min a 37°C e posteriormente foi realizada a leitura em 595 nm (ThermoSpectronic). Uma curva analítica com diferentes concentrações de trolox (0,5 a 20 µM) foi utilizada para posterior cálculo dos resultados em µM equivalente de trolox/mg de pele (KATALINIC et al., 2005).

4.2.9.5.3. Capacidade sequestradora do radical ABTS⁺

O ensaio é baseado na diminuição da absorvância devido ao sequestro do radical ABTS⁺. As amostras de pele foram homogeneizadas em 500µL de KCl (1.15%) com um triturador (Tissue-Tearor, Biospec) e centrifugadas a 1.000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi retirado para a análise.

O radical ABTS foi produzido reagindo 7 mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco âmbar e em temperatura ambiente por no mínimo 16 horas antes do uso. A solução ABTS foi diluída com tampão fosfato (pH 7,4) até uma absorvância de 0,700 a 0,800 nm.

Para a reação foi adicionado 40 µL do sobrenadante a 1mL de solução de ABTS. A reação foi incubada por 6 min e posteriormente foi realizada a leitura em 730 nm. Uma curva analítica com diferentes concentrações de trolox (1 a 25 µM) foi utilizada para posterior cálculo dos resultados em µM equivalente de trolox/mg de pele (KATALINIC et al., 2005).

4.2.9.5.4. Dosagem da atividade de catalase (CAT)

A análise da atividade da CAT foi determinada através do decaimento na concentração de H₂O₂ e geração de oxigênio, utilizando a técnica descrita por Aebi (1984). As amostras de pele (aproximadamente 100 mg) foram diluídas em 500 µL

de EDTA 0,02 M, trituradas (Tissue-Tearor, Biospec) e o homogenato foi centrifugado a 2.700 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 2.700 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante final foi retirado para análise.

A determinação da atividade da CAT na pele foi realizada em microplaca de 96 poços por meio da adição de 10 µL de amostra, 160 µL de tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0, 20 µL de água deionizada e 20 µL de H₂O₂ 200 mM. Ao teste foi incluído um branco para cada amostra preparado com 10 µL de amostra, 180 µL de tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0 e 20 µL de água deionizada. A velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação da CAT foi avaliada através da diminuição no valor da absorbância pela diferença entre a leitura inicial e a leitura 30 segundos após a adição do H₂O₂ 200 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (EnSpire, Perkin Elmer) em 240 nm com temperatura mantida em 25 °C. Os valores de catalase foram expressos como unidade de catalase/mg de pele/minuto.

4.2.9.5.5. Avaliação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

A avaliação da formação de LOOH por quimiluminescência (QL) foi realizada em uma adaptação da técnica descrita por Flecha et al. 1991. As amostras de pele (aproximadamente 100 mg) foram homogeneizadas em 800 µL de tampão fosfato (pH 7,4) com triturador (Tissue-Tearor, Biospec), centrifugadas a 700 g por 2 minutos a 4 °C e ao sobrenadante diluído em 1730 µL de meio de reação (KCl 120mM, tampão fosfato pH 7,4 30 mM) foi adicionado 20 µL de tert-butil hidroperóxido 3 mM. Este ensaio foi realizado em contador β marca Beckman® LS 6000 (Fullerton, CA, EUA) em uma faixa de contagem não coincidente com a resposta entre 300 e 620 nm. Todo o experimento foi realizado ao abrigo da luz para evitar a fosforescência dos frascos, a 30 °C, durante 120 minutos. Os resultados foram expressos em contagem por minuto (cpm) por mg de pele.

4.2.9.5.6. Produção de ânion superóxido

A quantificação da produção do ânion superóxido foi realizada usando o ensaio de redução de “nitroblue tetrazolium” (NBT) (CAMPANINI et al., 2013). As amostras de pele (aproximadamente 100mg) foram homogeneizadas em 500 µL de

EDTA 0,02 M com triturador (Tissue-Tearor, Biospec), centrifugadas a 2000 g por 20 segundos e o sobrenadante foi retirado para a análise.

Para a reação 50 µL do homogenato foi incubado em placas de 96 poços por 1 hora. Em seguida o sobrenadante foi cuidadosamente removido e às células fixadas foi adicionado 100 µL de NBT (1mg/mL). Após 15 minutos o sobrenadante foi cuidadosamente removido e ao precipitado foram adicionados 20 µL de metanol 100% para fixar, 120 µL de KOH 2M e 140 µL de DMSO para solubilizar o composto formado da redução do NBT, o formazan.. A redução do NBT foi determinada espectrofotometricamente em 620 nm e os resultados foram apresentados como densidade óptica (OD)/10 mg de pele.

4.2.9.6. Análise estatística

Para avaliação da eficácia anti-inflamatória/antioxidante *in vivo* do sistema líquido-cristalino contendo RES, os dados foram analisados pelo teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores correspondentes a $p < 0,05$. Os dados foram analisados pelo software GraphPadPrism®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Construção do diagrama ternário de fases

A construção do diagrama pode servir como ponto de partida para o delineamento de formas farmacêuticas, pois permite delimitar as regiões formadas com diferentes porcentagens de tensoativo, água e óleo. Dessa forma, o diagrama ternário de fases pode ser representado por um triângulo equilátero, cujo vértice superior representa 100% de tensoativo, o vértice esquerdo representa 100% de fase aquosa e o vértice direito representa 100% de fase oleosa. A mistura dessas diferentes fases pode gerar agregados, como emulsões, microemulsões, cristais líquidos ou separação de fases (LAWRENCE & REES, 2000; FEIGENSON *et al.*, 2001).

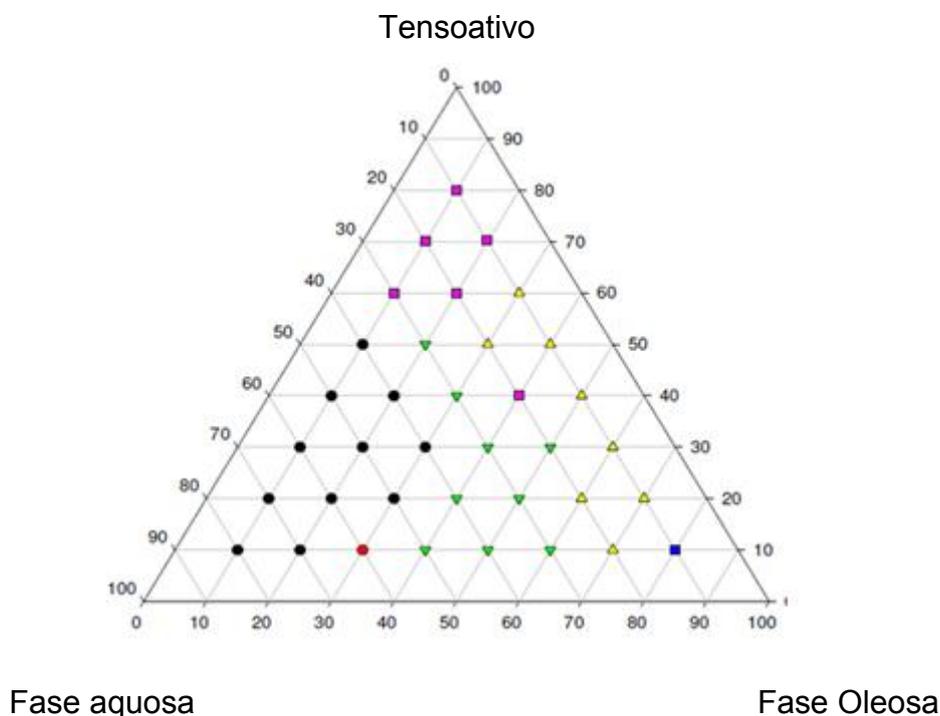
Foi construído um diagrama de fases empregando fase oleosa (silicone DC[®] 193), tensoativo (silicone DC[®] 5329) e fase aquosa (dispersão polimérica de Carbopol[®] 974 a 0,5%).

Atualmente, os silicones disponíveis no mercado atendem a várias exigências realizadas pelos formuladores, como por exemplo, aparência natural, toque leve e podem ser incorporados em produtos diferenciados (desde produtos para adolescentes até mesmo em produtos para a pele envelhecida) e não apresentam comedogenicidade (DONOLATO *et al.*, 2001).

Os silicones utilizados para o desenvolvimento do sistema líquido-cristalino também apresentam tais características citadas anteriormente. O silicone DC 5329 pode ser utilizados como emulsificante para uma série de óleos, além de ser menos irritante. O silicone DC 193⁰ é um silicone fluido de co-polímero glicol não irritante para a pele e olhos (CHORILLI, 2007). Devido ao alto teor de agentes emulsificantes utilizados na formulação de cristais líquidos, optou-se por utilizar este tensoativo que, teoricamente, é menos irritante.

A Figura 3 representa o diagrama de fases e as regiões formadas, de acordo com a análise visual contra fundo escuro.

Figura 3: Diagrama de fases – Análise visual. (●) sistema viscoso translúcido, (●) sistema viscoso transparente, (▼) sistema transparente de baixa viscosidade, (■) sistema líquido transparente, (■) sistema translúcido de baixa viscosidade e (▲) separação de fases.



Pela Figura 3, foi possível delimitar várias regiões: uma área em que se obteve um sistema viscoso translúcido (●), outra área de sistema viscoso transparente (●), sistema transparente de baixa viscosidade (▼), sistema líquido transparente (■) e sistema translúcido de baixa viscosidade (■). Observou-se também uma região de separação de fases (▲), podendo sugerir que a proporção de tensoativo nesta região não foi suficiente para estabilizar o sistema.

Além disso, nota-se a formação de sistemas viscosos transparentes ou translúcidos e sistemas de baixa viscosidade transparente ou translúcido em ampla faixa do diagrama. Esta consideração pode ser importante, pois um dos objetivos deste estudo foi trabalhar com sistemas nanoestruturados para aplicação por via tópica. Logo, seria interessante que a formulação apresentasse certa consistência e, simultaneamente, certa resistência ao escoamento, facilitando assim a aplicação do produto na pele.

5.1.1. *Formulações selecionadas*

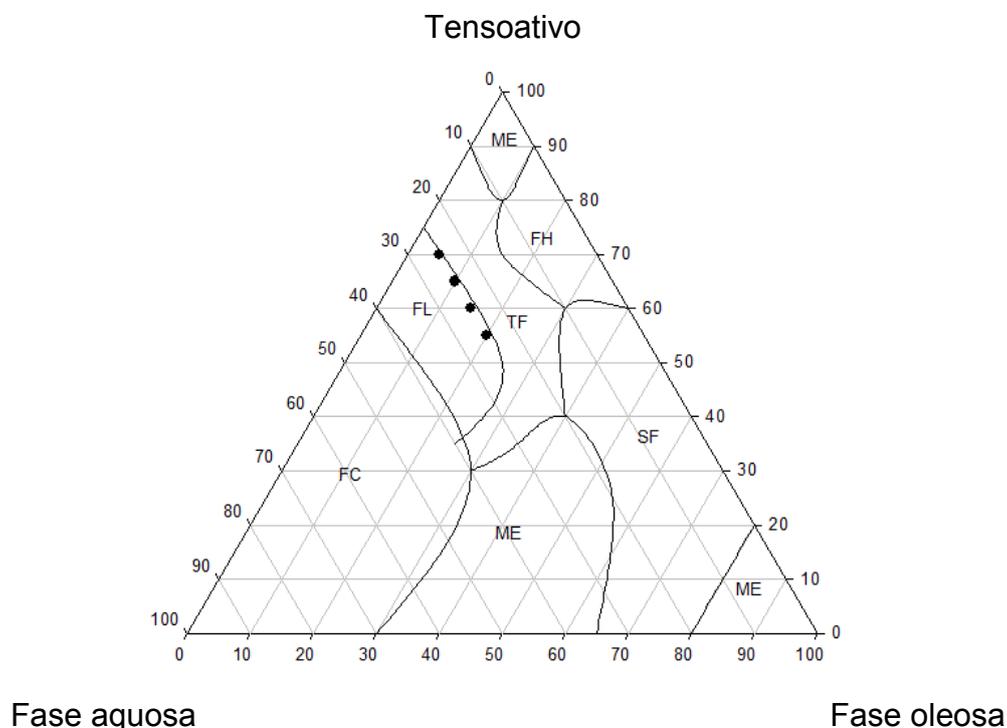
Do sistema obtido, foram selecionadas quatro formulações para posterior análise estrutural.

Para a seleção dessas formulações, utilizou-se como critério o fato de que, nos pontos selecionados, o sistema de maior interesse era constituído de regiões de sistema translúcido de baixa viscosidade. Manteve-se constante a concentração da fase aquosa (25%) e variou-se as proporções de fase oleosa e tensoativo (Tabela 1). A Figura 4 demonstra os pontos escolhidos no diagrama de fase.

Tabela 1: Formulações preparadas com concentração fixa de fase aquosa e variações nas concentrações de fase oleosa e tensoativo.

Componentes	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)
Silicone DC [®] 5329	55	60	65	70
Silicone DC [®] 193	20	15	10	5
Água	15	15	15	15
Dispersão de Carbopol [®] 974	10	10	10	10

Figura 4: Diagrama de fases para o sistema estabilizado com silicone DC 5329 como tensoativo, fase oleosa silicone DC 193 fase aquosa com 5% de dispersão de carbopol. As áreas delimitadas representam: ME - microemulsão, FC – fase cúbica, FH – fase hexagonal, FL – fase lamelar e TF – transição de fase.



5.2. Análise estrutural dos sistemas

5.2.1. Microscopia de luz polarizada para as formulações selecionadas

De acordo com Chorilli *et al.* (2007), a microscopia de luz polarizada é muito utilizada na identificação primária de mesofases de sistemas líquido-cristalinos e microemulsões.

As formulações são analisadas em microscópio de luz polarizada, os quais são capazes de alterar o plano da luz polarizada. As mesmas serão classificadas como anisotrópicas se forem capazes de desviar o plano da luz polarizada em direções não equivalentes. Já se as formulações não conseguirem desviar o plano de luz polarizada, serão classificadas como isotrópicas. As mesofases líquido-cristalinas lamelares e hexagonais são anisotrópicas e são identificadas,

respectivamente, por cruces de malta e estrias. Já as mesofases cúbicas e as microemulsões são classificadas como isotrópicas e são identificadas pela presença de como campo escuro.

Nas Figuras 5 e 6 estão representadas as fotomicrografias obtidas por microscopia de luz polarizada.

Figura 5: Fotomicrografias das formulações obtidas por microscopia de luz polarizada – A: F1; B: F2; C: F3; D: F4



A: F1 – Cruz de Malta
(Sistema Anisotrópico)



B: F2 - Cruz de malta
(Sistema Anisotrópico)



C: F3 - Cruz de malta
(Sistema Anisotrópico)

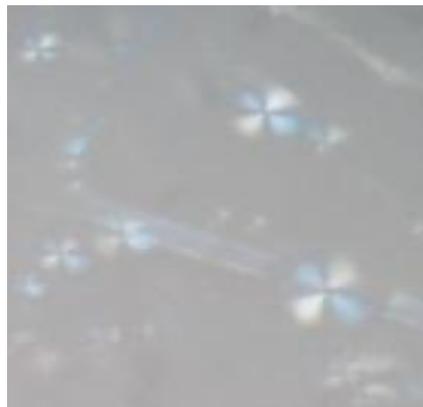


B: F2 - Cruz de malta
(Sistema Anisotrópico)

Figura 6: Fotomicrografias das formulações obtidas por microscopia de luz polarizada com a presença de 0,1% de Trans-resveratrol – A: F1R; B: F2R; C: F3R; D: F4R



A: F1R- Cruz de malta
(Sistema Anisotrópico)



B: F2R - Cruz de malta
(Sistema Anisotrópico)



C: F3R - Cruz de malta
(Sistema Anisotrópico)



D: F4R - Cruz de malta
(Sistema Anisotrópico)

As fotomicrografias das amostras F1, F2, F3, F4 apresentadas nas Figuras 5, e F1R, F2R, F3R e F4R apresentadas na Figura 6, revelaram a presença de cruz de malta, sendo característica de mesofase líquido-cristalina lamelar. É possível notar também que a presença do fármaco não alterou a estrutura do sistema.

5.2.2. *Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)*

Realizou-se a análise de SAXS com o intuito de confirmar os tipos de estrutura e arranjo sugeridos pela microscopia de luz polarizada, de forma a apresentar resultados mais fidedignos sobre a nanoestrutura das formulações escolhidas.

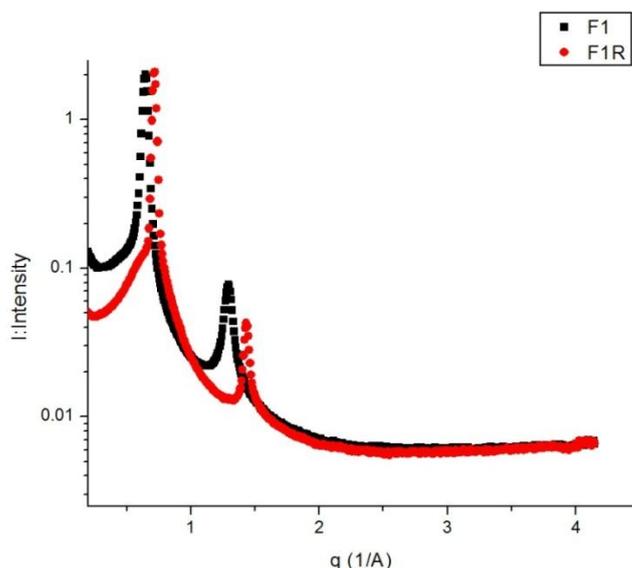
De acordo com o sistema nanoestruturado analisado, é possível observar a presença de picos pelos quais se pode determinar qual o tipo de estrutura existente. Em sistemas do tipo microemulsão e micelas, a curva de SAXS apresenta uma banda ou pico amplo. Já em sistemas líquido-cristalinos o que determinará o tipo de estrutura cristalina é a posição dos picos no eixo q , que permitirá calcular parâmetros estruturais (CALIXTO, 2013).

Em relação ao primeiro pico mais intenso, para estruturas lamelares, a posição relativa dos picos geralmente obedece à relação $1 \div 2 \div 3 \dots$; no entanto, para estruturas hexagonais a relação é de $1 \div 3 \div 2 \div 7 \dots$ (HOLMQVIST *et al.*, 1997). Já para os cristais líquidos de fase cúbica correlacionam-se os valores $1,41 \div 1,73 \div 2,82 \div 3$ (YARIV *et al.*, 2010).

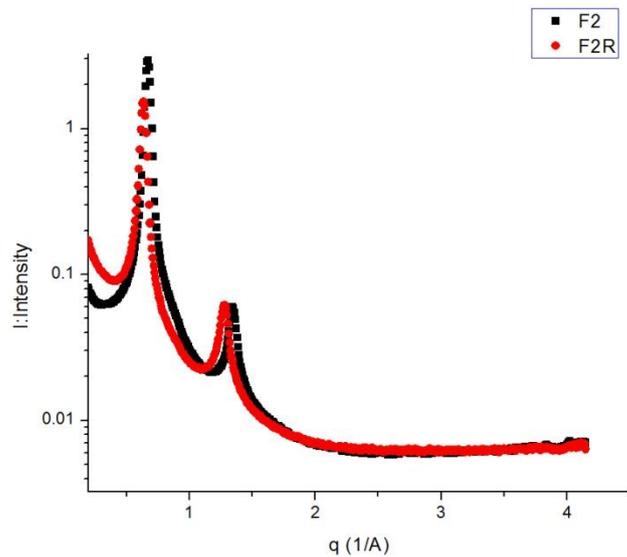
Dessa forma, verificou-se a posição dos picos (q_1, q_2, q_3, \dots) das formulações selecionadas e assim foi calculada a razão entre os (q) obtidos, em função da posição do primeiro pico (q_1). A partir destes resultados foi possível caracterizar estruturalmente os sistemas líquido-cristalinos.

A Figura 7 mostra as curvas de SAXS das formulações selecionadas acrescidas ou não de *trans*-resveratrol.

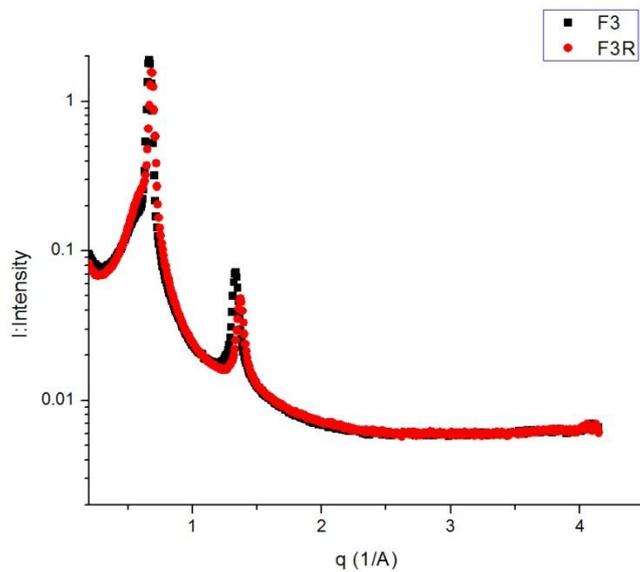
Figura 7: Curvas de SAXS das formulações F1, F2, F3, e F4 acrescidas ou não de *trans*-resveratrol. (A) F1 e F1R, (B) F2 e F2R, (C) F3 e F3R, (D) F4 e F4R



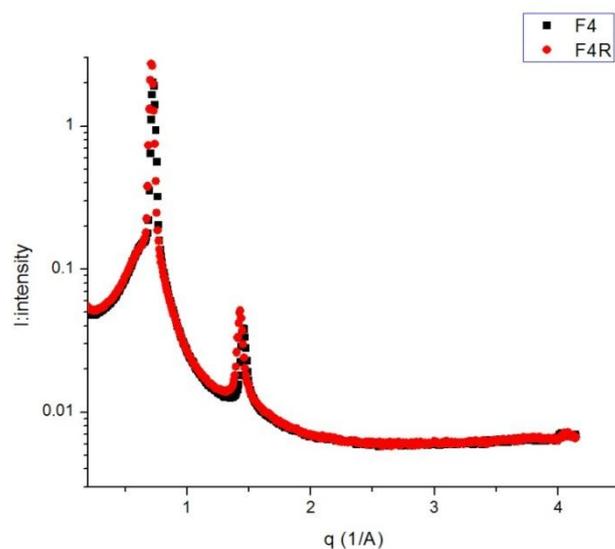
(A) F1 e F1R



(B) F2 e F2R



(C) F3 e F3R



(D) F4 e F4R

Os valores de picos obtidos correspondentes à Figura 7 revelaram a presença de estrutura lamelar. É possível observar que a adição do *trans*-resveratrol não alterou a estrutura das formulações.

A Tabela 2 representa os valores obtidos da razão entre as distâncias dos picos.

Tabela 2. Valores da razão entre as distâncias interplanares das formulações F1, F2, F3, F4 e F1R, F2R, F3R, F4R acrescidas de RES.

Formulação	qmax1	qmax2	d1/d2	Estrutura
F1	1.284	0.645	2.000	Lamelar
F2	1.347	0.672	2.000	Lamelar
F3	1.339	0.664	2.015	Lamelar
F4	1.452	0.725	2.013	Lamelar
F1R	1.437	0.727	1.981	Lamelar
F2R	1.273	0.649	1.982	Lamelar
F3R	1.361	0.682	2.000	Lamelar
F4R	1.435	0.718	2.012	Lamelar

Para determinar o tipo de estrutura das formulações analisadas, observou-se a posição dos picos (q_1 e q_2) e determinou-se a razão entre os diversos (q) em função da posição do primeiro pico (q_1). De acordo com os valores obtidos foi possível identificar qual a mesofase das estruturas líquido-cristalinas presentes (mesofase lamelar).

Dessa forma, os resultados das medidas de SAXS, presentes na Figura 7 e Tabela 2, estão coerentes com os resultados obtidos pela microscopia de luz polarizada, identificando fase lamelar para as oito formulações, independente de apresentarem ou não o *trans*-resveratrol. É interessante notar também que a variação de tensoativo e da fase oleosa não alterou a estrutura lamelar das formulações analisadas tanto na microscopia de luz polarizada quanto na análise de SAXS.

5.2.3. Determinação do comportamento reológico

5.2.3.1. Análise reológica de fluxo contínuo

A análise reológica de fluxo contínuo estabelece uma relação entre a microestrutura e o comportamento macroscópico do material por meio de estudos de comportamento de fluxo da amostra quando submetida a uma tensão (SAVIC *et al.*, 2011).

De acordo com Pestana *et al.* (2008) e Calixto (2013), este ensaio possui diversas aplicações, incluindo desde a avaliação da facilidade do material escoar de um frasco, o espalhamento de um creme ou loção sobre a pele, o bombeamento de um produto do equipamento em um processo industrial, até mesmo a passagem do produto pelo orifício de uma agulha. Dessa forma, a análise reológica de fluxo contínuo tem sido um método muito utilizado para caracterizar sistemas de liberação.

Recentemente, pesquisadores têm procurado estudar o comportamento da microestrutura dos sistemas líquido-cristalinos e sua fase lamelar quando estão sob cisalhamento. Entretanto, observa-se que, em determinados casos, o perfil reológico pode ou não estar relacionado com a natureza e a concentração de tensoativo presente na amostra (BERNI *et al.*, 2002; CHORILLI, 2007).

A partir da análise da curva de fluxo, que correlaciona a tensão de cisalhamento com a taxa de cisalhamento, é possível verificar o comportamento de

fluxo do material estudado. Este gráfico, por sua vez, é constituído por duas curvas, uma ascendente e outra descendente. A curva ascendente mostra o comportamento de fluxo da amostra quando ocorre o aumento da taxa de cisalhamento. Já a curva descendente mostra o comportamento de fluxo da amostra quando ocorre a diminuição da taxa de cisalhamento (ISAAC, 2008).

Analisando-se a curva ascendente, é possível determinar dois tipos de comportamento: newtoniano ou não newtoniano. A partir do comportamento não newtoniano pode-se ainda classificar o fluxo do material como sendo plástico, pseudoplástico ou dilatante. Já na curva descendente é possível classificar o fluxo do material como reopético ou tixotrópico (SCHRAMM, 2006).

Ainda de acordo com Schramm (2006), diz-se que um material possui fluxo newtoniano quando a sua viscosidade for constante, ou seja, a sua curva de fluxo ascendente for constituída por uma reta, passar pela origem e seus valores de taxa de cisalhamento e tensão forem constantes. A amostra estudada terá comportamento pseudoplástico quando sofrer uma diminuição na sua viscosidade concomitantemente com o aumento da taxa de cisalhamento. Tal fenômeno é classificado de *shear thinning*, ou também conhecido como afinamento por cisalhamento (SAVIC *et al.*, 2011). O comportamento plástico possui características idênticas ao comportamento pseudoplástico; entretanto, apresenta um limite de tensão de escoamento chamada de *yield stress*, a qual deve ser superada para que o material possa fluir. Desta maneira, o material necessita inicialmente de uma força maior que seja capaz de superar a sua reticulação interna para que possa fluir. Já o comportamento dilatante é o inverso, ou seja, aumenta sua viscosidade concomitantemente com o aumento da taxa de cisalhamento (MAZZARINO *et al.*, 2007).

Analisando-se a curva descendente, as amostras serão classificadas como sendo tixotrópicas ou reopéticas quando possuírem a capacidade de recuperar sua estrutura inicial à medida que diminuir a taxa de cisalhamento (ISAAC *et al.*, 2008).

Um material tixotrópico pode ter dois tipos de gráficos, ou seja, a curva descendente pode voltar por baixo da curva ascendente formando uma área denominada como área de histerese ou pode coincidir com a curva ascendente. Quando ocorre a formação da área de histerese, observa-se que a viscosidade aumenta mais lentamente do que diminui, sendo tixotrópico tempo dependente. Nos

materiais tixotrópicos tempo-independentes a curva descendente coincide com a curva ascendente, ou seja, o material rapidamente se recupera (FRESNO *et al.*, 2002).

Segundo Schramm (2006), os materiais que possuem comportamento reopético, apresentam a curva descendente voltando por cima da curva ascendente e no sentido anti-horário. Este tipo de material, durante o cisalhamento, é capaz de aumentar a sua viscosidade e à medida que este cisalhamento diminui, a sua viscosidade original volta a ser recuperada.

As Figuras 8, 9 e 10 demonstram a variação da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para as formulações F1, F2 e F3.

Figura 8: tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F1

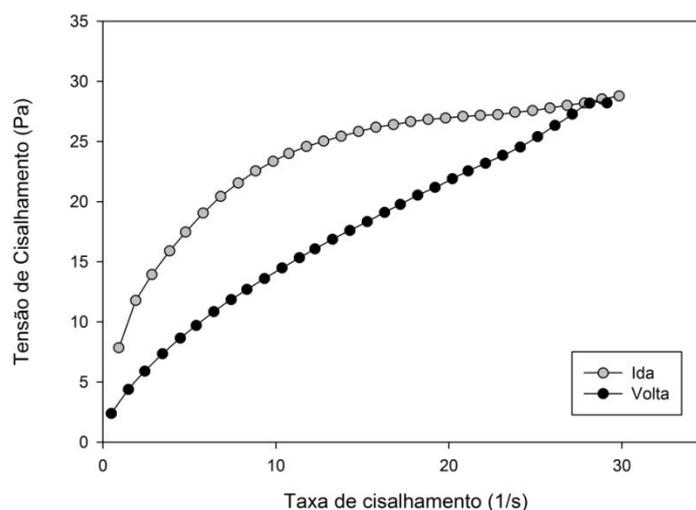


Figura 9: Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F2

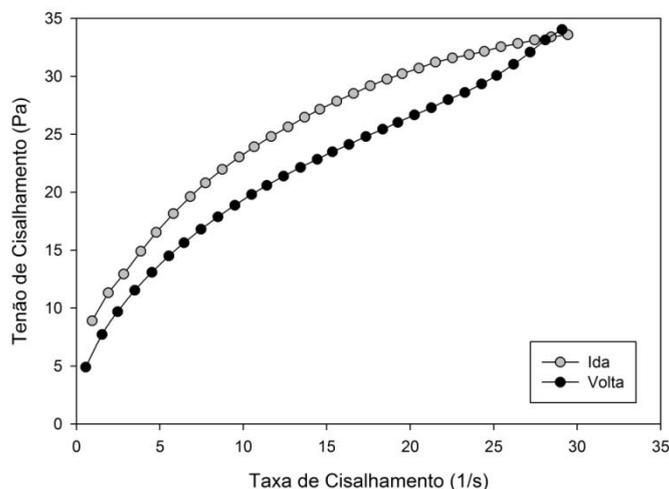
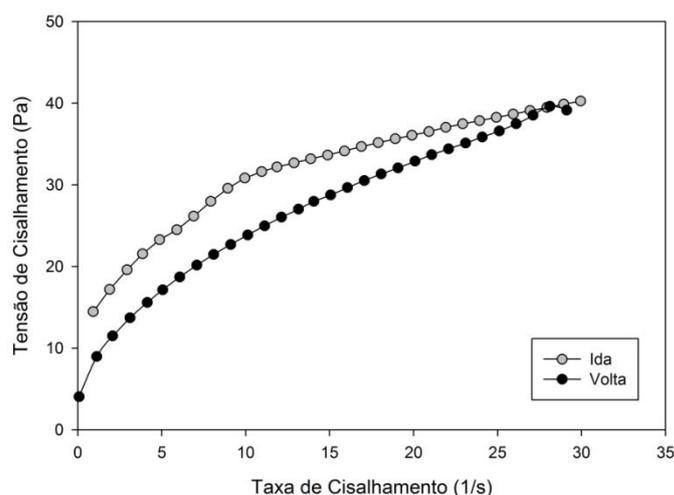


Figura 10: Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F3



Analisando-se os reogramas das Figuras 8, 9 e 10 é possível observar que as formulações F1, F2 e F3 comportam-se como um fluido não newtoniano, uma vez que a curva de fluxo ascendente não é constituída por uma reta, não passa pela origem e, ainda, seus valores de taxa de cisalhamento e tensão não são constantes. Devido à não linearidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento, as formulações comportam-se como um fluido pseudoplástico. Observa-se também que as formulações possuem um comportamento tixotrópico tempo-dependente, pois as curvas descendentes não se sobrepõem às curvas ascendentes. Dessa forma, nota-

se uma área de histerese, o que indica que o material necessita de um tempo maior para recuperar sua estrutura inicial. (CALIXTO, 2013).

A partir das curvas de fluxo obtidas, calculou-se o valor de n e k para caracterizar o comportamento de fluxo e caracterizar a viscosidade do material, respectivamente. Para isso, utilizou-se a equação 3:

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \text{ (equação 3)}$$

Onde: T é a taxa de cisalhamento, k é o índice de consistência, $\dot{\gamma}$ é a tensão de cisalhamento e n é o comportamento de fluxo.

Neste modelo matemático, $n=1$ representa que o fluido possui comportamento newtoniano, $n>1$ representa que o fluido possui comportamento dilatante, já o $n<1$ representa um fluido pseudoplástico. O índice de consistência (K) avalia a viscosidade dinâmica das formulações e seu valor varia de acordo com a viscosidade do material (CALIXTO, 2013).

Os valores de n e k estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) das formulações F1, F2, F3.

Formulações	n	k
F1	0,389	9,331
F2	0,285	11,399
F3	0,293	15,009

Os valores de n dispostos na Tabela 3 ($n<1$) confirmam que as formulações possuem fluxo pseudoplástico. Já o índice de consistência aumentou de acordo com o aumento da quantidade de tensoativo das formulações (F1: 55%, F2: 60%, F3: 65%), ou seja, a viscosidade das formulações foi aumentando junto com a concentração de tensoativo.

Conforme Carvalho (2009), o comportamento pseudoplástico observado nas formulações pode ser devido à formação da estrutura líquido-cristalina. É interessante notar que este comportamento pseudoplástico é favorável para uma

futura utilização das formulações desenvolvidas, uma vez que a aplicação da mesma sobre a pele envolve altas taxas de cisalhamento, o que causará um —aframento” nas formulações devido ao desentrelaçamento das cadeias poliméricas. No entanto, ao se retirar esta força externa, a viscosidade inicial será recuperada novamente, ocasionando um maior tempo de permanência da formulação sobre a pele.

De acordo com os reogramas apresentados nas Figuras 8, 9 e 10 é possível notar o comportamento tixotrópico das formulações observando as áreas de histerese presente nas curvas de fluxo. Esta área de histerese é fortemente influenciada pela presença de estrutura líquido-cristalina, ou seja, quanto maior a área de histerese, maior será a microestruturação das redes líquido-cristalinas (CHORILLI *et al.*, 2007). O comportamento tixotrópico observado relaciona-se com a força de interação entre todos os componentes presentes nas formulações nas regiões mais estruturadas. Dessa forma, essa estruturação pode ser destruída concomitantemente com a elevação da velocidade de cisalhamento. Em contrapartida, essa estruturação inicial pode ser facilmente recuperada à medida que a velocidade de cisalhamento diminui (CALIXTO, 2013). Nota-se que a formulação F1 (Figura 8) apresentou maior grau de tixotropia, ou seja, maior facilidade de recuperação da sua estrutura após cessar a velocidade de cisalhamento.

As Figuras 11, 12 e 13 demonstram a variação da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para as formulações F1, F2 e F3 acrescidas de RES comparando-se com os reogramas das mesmas não acrescidas de RES.

Figura 11: Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F1 e F1 acrescida RES (F1R).

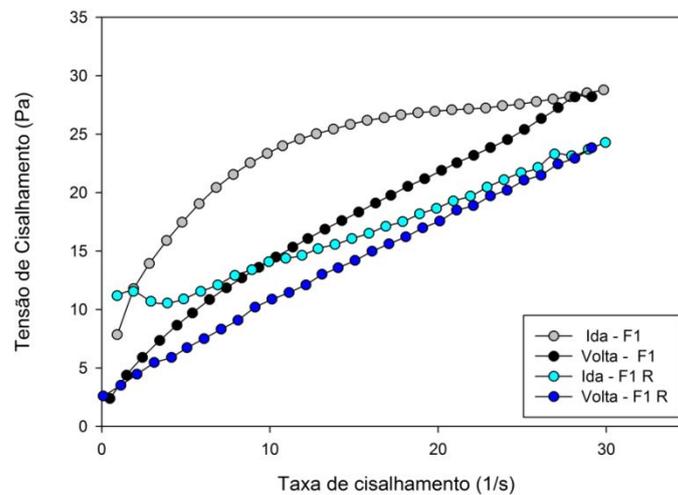


Figura 12: Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F2 e F2 acrescida de RES (F2R).

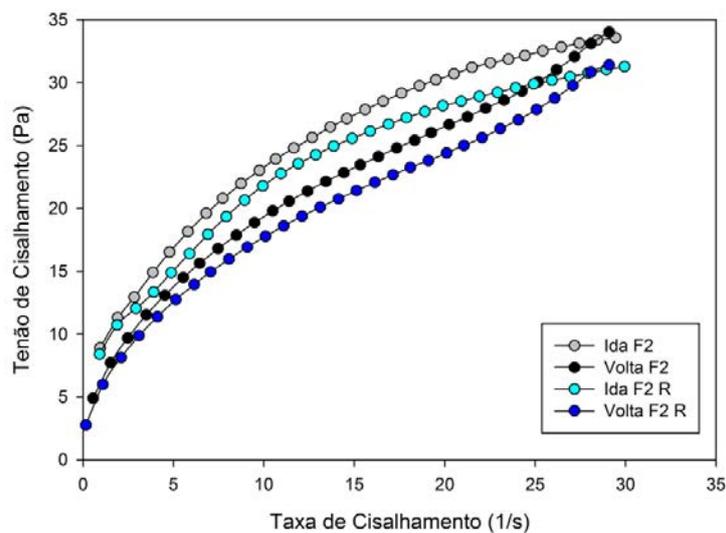
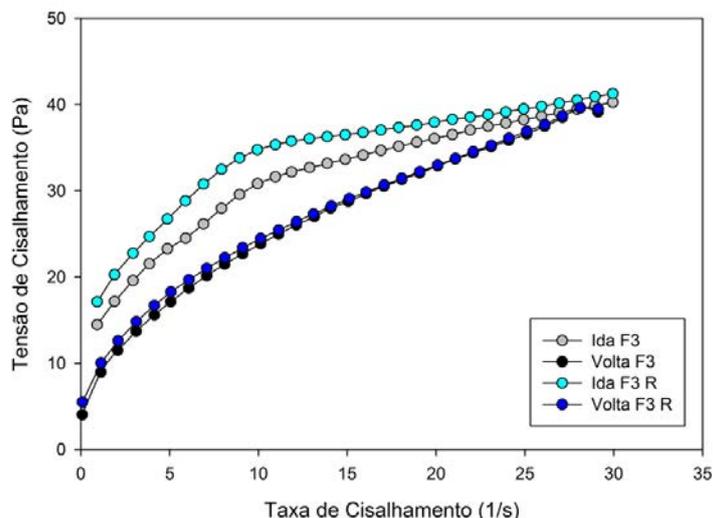


Figura 13: Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F3 e F3 acrescida de RES (F3R).



As curvas de fluxo apresentadas para as formulações com adição de fármaco (Figuras 11, 12 e 13) demonstraram que a presença do RES não alterou o comportamento não newtoniano, pseudoplástico e tixotrópico das formulações estudadas.

Os parâmetros calculados com o ajuste da lei das potências aos reogramas de fluxo das formulações com adição de RES estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4: Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) das formulações F1, F2, F3 e F1, F2, F3 acrescidas de RES (respectivamente, F1R, F2R e F3R).

Formulações	n	k
F1	0,389	9,331
F2	0,285	11,399
F3	0,293	15,009
F1R	0,367	6,424
F2R	0,388	8,652
F3R	0,231	13,122

Os valores de n dispostos na Tabela 4 ($n < 1$) confirmam que a presença do fármaco não alterou o comportamento pseudoplástico das formulações. Entretanto, observando o índice de consistência, nota-se que houve uma redução aparente

diminuição no valor de k com relação às formulações sem o RES. Sugere-se então que a presença do RES levou à diminuição da viscosidade das formulações independente da concentração de tensoativo.

Para a formulação 4 foram testados diversos parâmetros e geometrias no ensaio de fluxo contínuo, porém o equipamento não foi capaz de realizar a leitura. Sugere-se então que a alta viscosidade da formulação 4 impediu a leitura no equipamento. Tal hipótese pode ser confirmada com base nos ensaios de varredura de frequência, no qual foi constatado que, dentre todas as formulações estudadas, a F4 foi a que se apresentou mais estruturada devido ao alto valor de G' (módulo de armazenamento) sobre o valor de G'' (módulo de perda), indicando sistemas mais estruturados.

5.2.3.2. Análise reológica oscilatória de varredura de frequência

A análise reológica oscilatória de varredura de frequência tem por finalidade estudar as propriedades viscoelásticas das amostras, fornecendo assim informações sobre a natureza estrutural das formulações.

Portanto, a viscoelasticidade linear de um sistema deve ser avaliada no intervalo de frequência em que a tensão aplicada durante o ensaio não deforme a estrutura tridimensional dos sistemas. Já na região de viscosidade não-linear pode ocorrer a destruição das ligações internas ou agregados moleculares, uma vez que acontece a deformação dos sistemas (SCHRAMM, 2006; NEVES *et al.*, 2009).

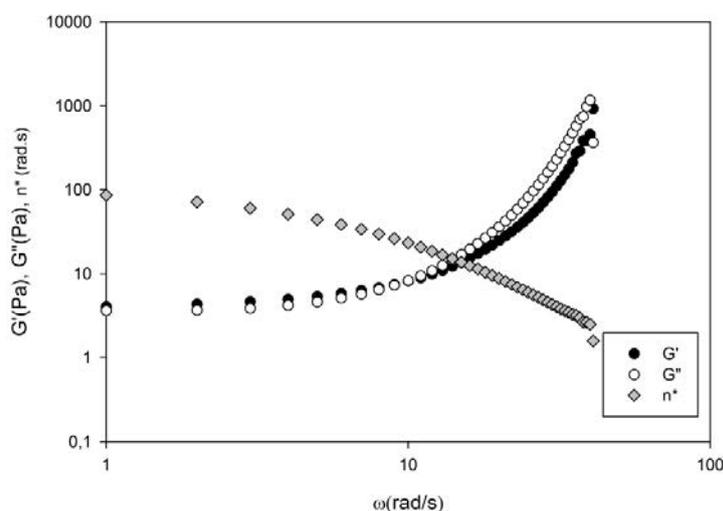
A viscoelasticidade linear dos sistemas correlaciona-se com a estrutura das formulações. Dessa forma, as propriedades viscoelásticas dos sistemas líquido-cristalinos tornam-se importantes para o estudo de liberação transdérmica no sentido de propor penetração e adesão a pele (BENDER, 2008; YARIV *et al.*, 2010; OYAFUSO, 2012).

Por meio do experimento sinoidal dinâmico é possível obter o módulo de armazenamento ou elástico (G') e módulo de perda ou viscoso (G''), em função da frequência. O módulo de armazenamento (G') indica a energia armazenada no material e depende dos rearranjos que acontecem durante o período de oscilação, podendo caracterizar um caráter elástico ou sólido. Já o módulo de perda indica a energia dissipada ou perdida durante o período de oscilação, podendo caracterizar

um comportamento viscoso ou líquido. Desta maneira, quando ocorre o predomínio do módulo elástico (G') sobre o módulo viscoso (G'') pode-se dizer que o sistema analisado é mais estruturado e possui fortes interações entre as moléculas (TENG *et al.*, 2011).

A Figura 14 demonstra o reograma obtido por meio da análise reológica oscilatória da formulação F1.

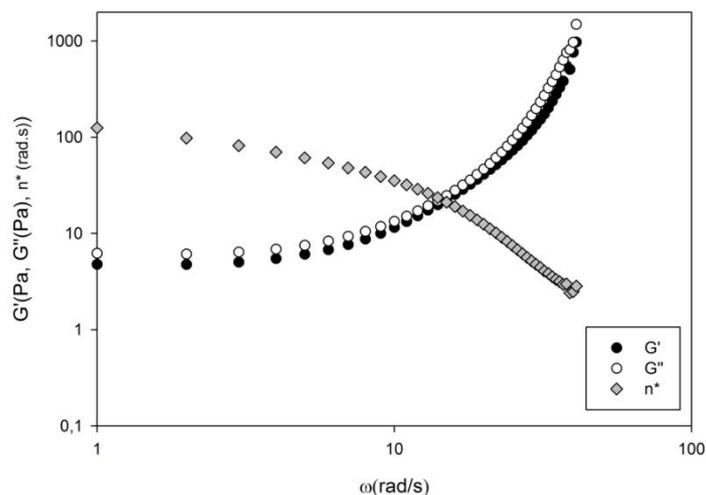
Figura 14: Variação do módulo de armazenamento G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F1.



No reograma da amostra F1 (Figura 14) nota-se que o módulo de perda (G'') e o módulo de armazenamento (G') praticamente coincidem até 10 rad/s. Este comportamento demonstra que até esta frequência há um equilíbrio entre os componentes elásticos e viscosos. Após a frequência de 10 rad/s ocorre o predomínio de G'' (módulo de perda) sobre o G' (módulo de armazenamento). Essa característica indica um comportamento mais viscoso, sugerindo sistemas pouco organizados. Além disso, pode-se observar a dependência de G' pela frequência, ou seja, à medida que se aumenta a frequência angular, ocorre também o aumento do módulo de armazenamento (KHONDKAR *et al.*, 2007).

A Figura 15 demonstra o reograma obtido por meio da análise reológica oscilatória da formulação F2.

Figura 15: Variação do módulo de armazenamento G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F2.



O reograma da amostra F2 (Figura 15) apresenta módulo de perda (G'') maior que o módulo de armazenamento (G'). Essa característica indica um comportamento predominantemente viscoso, presente em sistemas pouco organizados. Além disso, como pode observar no reograma da F1 (Figuras 14) após a frequência de 10 rad/s nota-se também a dependência de G' pela frequência (KHONDKAR *et al.*, 2007).

As Figuras 16 e 17 demonstram o reograma obtido por meio da análise reológica oscilatória das formulações F3 e F4, respectivamente.

Figura 16: Variação do módulo de armazenamento G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F3.

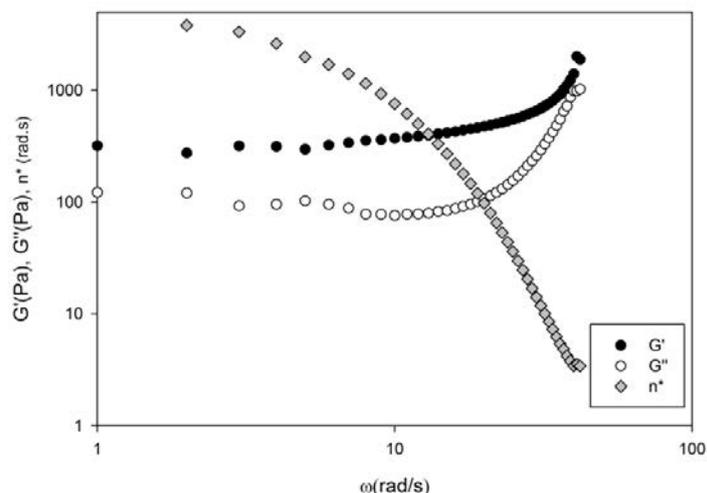
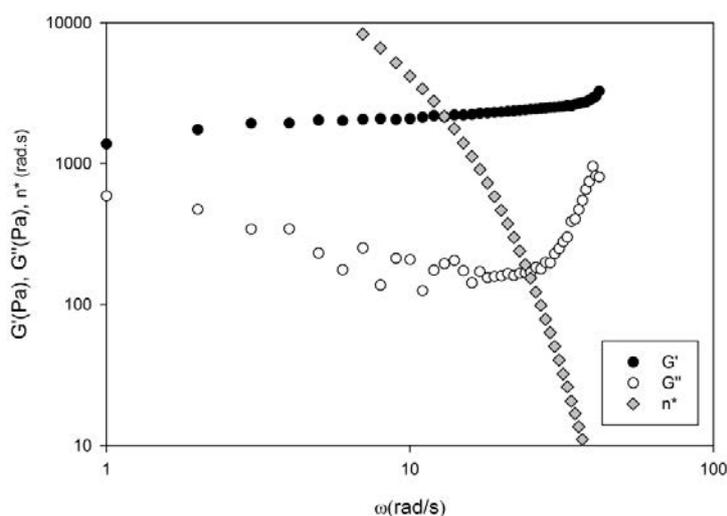


Figura 17: Variação do módulo de armazenamento G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F4.



De acordo com as Figuras 16 e 17, o módulo de armazenamento (G') foi maior que o módulo de perda (G''). Desta maneira, o espectro mecânico das formulações F3 e F4 indica características de um comportamento predominantemente elástico, demonstrando sistemas estruturados e com fortes interações entre as moléculas. Entretanto, nota-se que os valores de G' (módulo de armazenamento) no reograma da formulação F4 (Figura 17) são maiores (aproximadamente duas vezes) do que o G' (módulo de armazenamento) no

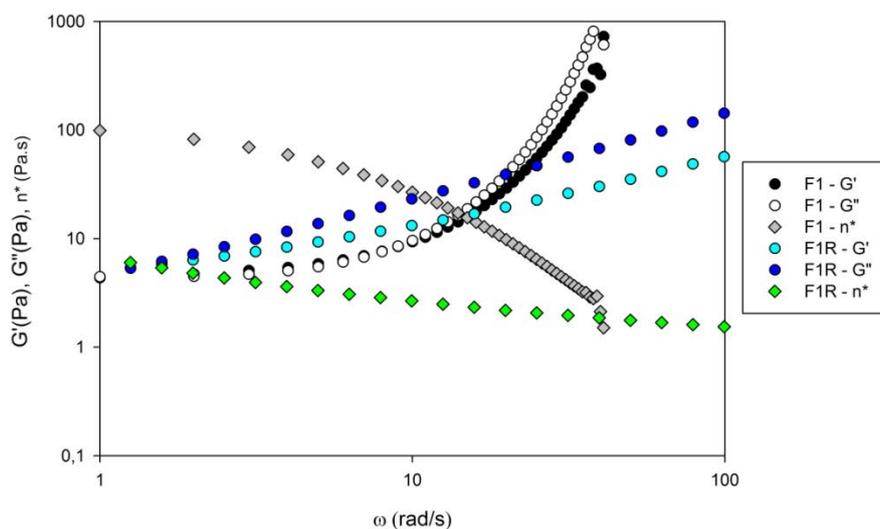
reograma da formulação F3 (Figura16), sugerindo que F4 possui um sistema mais estruturado que F3.

A partir da análise dos reogramas das quatro formulações, é interessante notar que à medida que se aumentou a concentração de tensoativo nas formulações (F1: 55%, F2: 60%, F3: 65%, F4: 70%) foi possível obter sistemas mais estruturados, ou seja, o módulo de armazenamento (G') foi maior para F4. O mesmo foi observado por Zhang e colaboradores (2008).

Além disso, observa-se nos quatro reogramas que a viscosidade da F4 é maior que das outras formulações, sugerindo então que a viscosidade da fase lamelar de sistemas líquido-cristalinos é dependente da concentração de agente tensoativo, uma vez que a formulação F4 possui maior teor de tensoativo (F4: 70%). Estes resultados estão de acordo com Zhang *et al.* (2008).

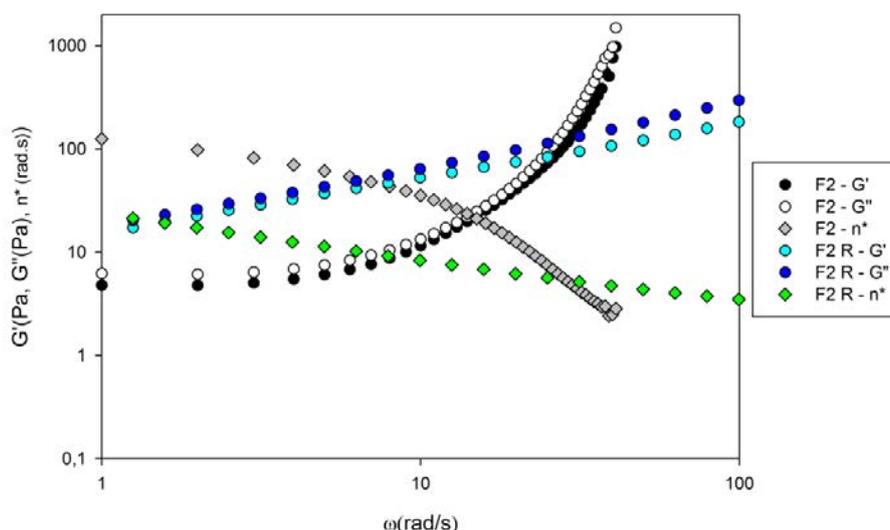
As Figuras 18, 19, 20 e 21 demonstram os reogramas obtidos das formulações F1, F2, F3 e F4 com a presença de 0,1% de *trans*-resveratrol e comparadas com as mesmas formulações quando estão sem a presença do fármaco.

Figura 18: Variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F1 e F1 acrescida de RES (F1R).



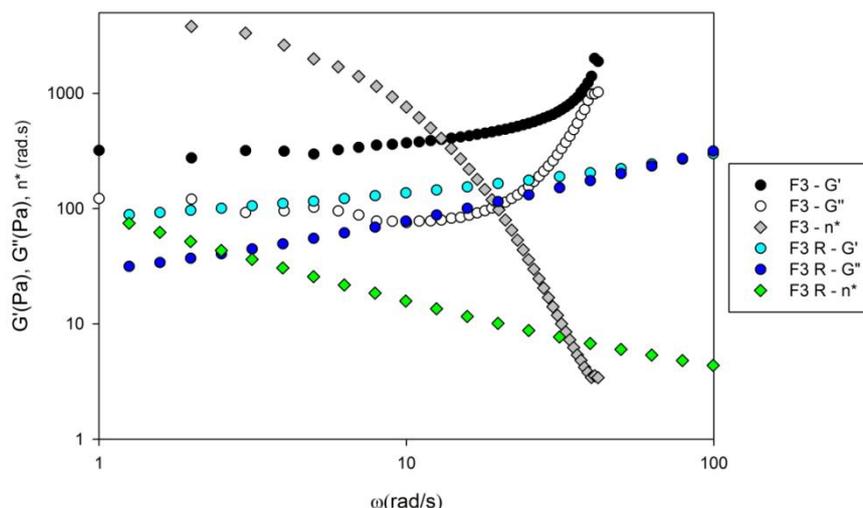
O reograma apresentado na Figura 18 demonstra que a adição de fármaco à formulação F1 alterou levemente a característica de comportamento do sistema, ou seja, nota-se que no reograma da F1 sem RES até 10 rad/s os módulos G' e G'' praticamente se coincidiram e depois desta frequência angular houve o predomínio de G'' , indicando comportamento mais viscoso. Já para F1 acrescida de RES (F1R), pode-se observar que houve apenas o predomínio de G'' (módulo de perda), ou seja, apenas característica de comportamento viscoso. Nota-se também que houve diminuição da viscosidade (aproximadamente 10 vezes) em relação ao reograma da F1 sem RES. Sugere-se então que houve uma pequena desestruturação ou desorganização do sistema com a presença de RES, uma vez que foi observado predomínio do módulo G'' e diminuição da viscosidade do sistema.

Figura 19: Variação do módulo de armazenamento G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F2 e F2 acrescida de RES (F2R).



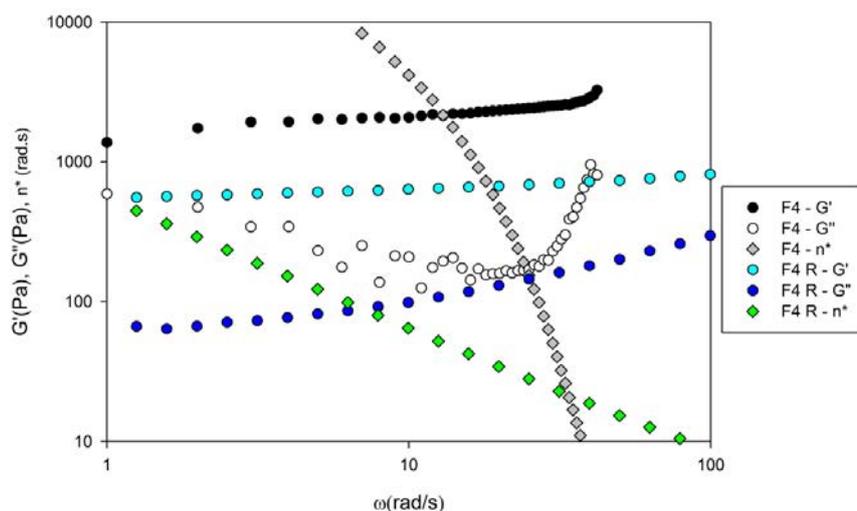
Pode-se observar que no reograma apresentado na Figura 9 a adição de fármaco não alterou bruscamente o comportamento do sistema, ou seja, G'' (módulo de perda) continua maior que G' (módulo de armazenamento). Dessa forma, F2R (acrescida de RES) apresenta característica de um comportamento viscoso, sugerindo sistema pouco organizado. Entretanto, nota-se diminuição da viscosidade da formulação com adição de RES. Dessa forma sugere-se que houve uma leve desestruturação do sistema com a adição de fármaco.

Figura 20: Variação do módulo de armazenamento G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F3 e F3 acrescida de RES (F3R).



O reograma da formulação F3 acrescida de RES apresenta algumas diferenças quando comparado com o reograma da mesma formulação, porém sem a presença de fármaco. Nota-se que no início, nos dois reogramas, houve o predomínio de G' (módulo de armazenamento), demonstrando um comportamento elástico, característica de sistemas mais estruturados. Entretanto, na F3R, próximo à frequência de 100 rad/s esse comportamento foi alterado, ou seja, observa-se que o módulo de perda (G'') e o módulo de armazenamento (G') praticamente passaram a se coincidir. Este comportamento demonstra que próximo à frequência de 100 rad/s há um equilíbrio entre os componentes elásticos e viscosos. É possível notar também que houve uma diminuição considerável (mais de 10 vezes) na viscosidade do sistema acrescido de fármaco. Dessa forma, observa-se novamente que a presença do RES causa desestruturação nos sistemas estudados.

Figura 21: Variação do módulo de armazenamento G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F4 e F4 acrescida de RES (F4R).



No reograma apresentado na Figura 21 observa-se que, assim como nas outras formulações, também houve diminuição na viscosidade do sistema. Entretanto, a formulação F4R continua com características de comportamento elástico e com o sistema mais estruturado em relação à F4 sem RES. Nota-se que esta formulação foi a que apresentou menor variação no valor de G' (módulo de armazenamento) com a adição do fármaco.

Dessa forma, foi possível observar por meio dos reogramas anteriores, que em todas as formulações acrescidas de RES houve uma desestruturação do sistema e diminuição da viscosidade devido à presença de fármaco. Além disso, de acordo com as discussões anteriores apresentadas neste trabalho, a formulação F4, dentre as demais, é a que possui sistema mais estruturado e maior quantidade de tensoativo. Portanto, sugere-se que a quantidade elevada de tensoativo além de causar maior estruturação no sistema, também impede que o fármaco cause grandes transformações estruturais da mesma. Uma hipótese para tal fenômeno é a elevada concentração de tensoativo, pois em grandes quantidades as moléculas deste componente se agregam mais densamente ocasionando um sistema mais estruturado (ZHANG et al.; 2008).

Além disso, de acordo com Shi e colaboradores (2012) devido ao fato do módulo de armazenamento (G') ter se mantido maior que o módulo de perda (G'')

nos reogramas apresentados nas Figuras 18, 19, 20 e 21, sugere-se que a fase lamelar deste sistema líquido cristalino em estudo se comporta como um “gel fraco”.

5.2.3.3. Ensaio de perfil de textura (TPA)

A análise do perfil de textura mostra as propriedades mecânicas das formulações, tais como: dureza, compressibilidade, adesividade e coesão.

Os testes de TPA nas formulações escolhidas possuem grande importância para a liberação de fármacos pela via tópica e ajudam a analisar os parâmetros necessários para se obter uma boa aplicação das formulações e, conseqüentemente, uma futura aceitação do paciente (SENYIGIT, 2011).

Desta maneira, neste ensaio foi possível avaliar a dureza, que é classificada como a resistência máxima à deformação compressional, e a compressibilidade, classificada como sendo o trabalho necessário para comprimir a formulação. Portanto, dureza e compressibilidade revelam características relacionadas à facilidade de aplicação da formulação, simulando sua ejeção da embalagem e a facilidade de espalhamento da mesma sobre a pele (JONES, 1997; SENYIGIT 2011, CARVALHO, 2012).

Já a adesividade é o trabalho necessário para vencer as ligações e as forças atrativas entre a formulação e a prova analítica. Entretanto, ao se testar a adesividade da amostra, pode ocorrer a quebra de ligações coesivas dentro da formulação. Portanto, este parâmetro pode estar relacionado diretamente com a coesão da amostra. Dessa forma, pode-se observar que quanto maior a adesividade da formulação, maior é a coesão. Assim, é possível determinar a adesão (bioadesão) da formulação na pele e a recuperação estrutural da formulação para a aplicação seguinte, sendo uma informação útil para a finalidade pretendida (TAN *et al.*, 2000; OYAFUSO, 2012).

Dessa forma realizou-se a análise do perfil de textura (TPA) nas formulações selecionadas. Os resultados estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5: Propriedades mecânicas das formulações determinadas por meio do teste de TPA. Cada valor representa a média do ensaio \pm desvio padrão.

	F1	F2	F3	F4
Dureza (N)	0,018 \pm 0,003	0,019 \pm 0,002	0,032 \pm 0,01	0,069 \pm 0,03
Compressibilidade (N.s)	0,229 \pm 0,016	0,278 \pm 0,01	0,411 \pm 0,13	0,883 \pm 0,42
Adesão (N.s)	0,007 \pm 0,04	0,034 \pm 0,015	0,151 \pm 0,10	0,499 \pm 0,25
Coesão	0,798 \pm 0,02	0,822 \pm 0,05	0,828 \pm 0,02	0,835 \pm 0,09

Os dados da Tabela 5 foram analisados estatisticamente pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância de 0,01 %. De acordo com os dados obtidos, verificou-se que nos parâmetros dureza e compressibilidade não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações F1 e F2 demonstrando que a alteração da concentração dos componentes (tensoativo e fase oleosa) não foi capaz de alterar esses dois parâmetros, ou seja, F1 e F2 possuem a mesma facilidade de aplicação da formulação sobre a pele. Já a adesão apresentou diferença significativa entre todas as formulações. Entretanto, na análise da coesão não houve diferença significativa entre as formulações, demonstrando que o aumento dos valores de coesão apresentados na Tabela 5 não foi significativo a ponto de diferenciar as formulações com relação a este parâmetro. Sugere-se então que o aumento da proporção de tensoativo no material não foi suficiente para alterar as propriedades de coesão das quatro formulações.

A partir da análise estatística e com base nos dados apresentados na Tabela 5, notou-se que a formulação F4 apresentou maiores valores nos parâmetros de dureza, compressibilidade e adesão quando comparados às outras formulações F1, F2 e F3. Logo, infere-se que a F4 possui melhor adesão e espalhabilidade na pele, além de maior facilidade de aplicação.

De modo geral, foi observado que houve aumento na dureza e compressibilidade das amostras concomitantemente com a elevação da concentração de tensoativo. Como observados nos ensaios de varredura de frequência, estes resultados reforçam a evidência da presença de sistemas mais

organizados, uma vez que dureza e compressibilidade são parâmetros reológicos que analisam a deformação do material sob compressão (CALIXTO, 2013).

5.2.3.4. Ensaio de bioadesão *in vitro*

De acordo com Smart (2005), a bioadesão pode ser definida como o estado em que dois materiais, sendo pelo menos um de natureza biológica, se mantenham juntos por um período prolongado de tempo devido à presença de forças interfaciais. O processo de bioadesão acontece por meio de duas etapas. A primeira etapa consiste em um contato íntimo entre a membrana biológica e o material bioadesivo. Já na segunda etapa ocorre a consolidação da junção adesiva pelas interações físico-químicas, conduzindo à adesão prolongada (LYRA et al., 2007).

Os sistemas bioadesivos podem ser formulados para aderir em substratos biológicos como pele, mucosa nasal, bucal, respiratória até a mucosa gastrointestinal. Dessa maneira, as principais vantagens destes sistemas bioadesivos estão na capacidade de melhorar a biodisponibilidade, absorção e transporte de fármacos e diminuir os efeitos sistêmicos indesejáveis. Além disso, possuem a capacidade de prolongar o tempo de permanência do fármaco no local de aplicação intensificando o contato da formulação com a barreira biológica. Dessa forma, evita aplicação repetida do produto, aumentando assim a adesão do paciente ao tratamento (SMART et al., 2003; CALIXTO, 2013).

Os dados de bioadesão das formulações F1, F2, F3, F4 e F1R, F2R, F3R e F4R foram avaliados sobre pele suína e estão representados na Tabela 6.

Tabela 6: Trabalho da força bioadesiva (mN.s) das formulações. Os valores representam a média \pm desvio padrão, à temperatura de 32°C.

Formulações	Trabalho da Força Bioadesiva (mN.s)
F1	0,019 \pm 0,0013
F2	0,020 \pm 0,012
F3	0,021 \pm 0,0019
F4	0,026 \pm 0,024
F1R	0,026 \pm 0,0039
F2R	0,029 \pm 0,0023
F3R	0,030 \pm 0,0025
F4R	0,032 \pm 0,014552

Os dados na Tabela 6 demonstram que a bioadesão das formulações estudadas apresentou um perfil crescente, ou seja, à medida que se aumentou a concentração de tensoativo nos sistemas houve também o aumento da bioadesão. Dessa maneira, as formulações F4 e F4R foram as que apresentaram maior bioadesão quando comparadas com as demais. É interessante notar que à medida que o sistema fica mais estruturado também se torna mais bioadesivo, sendo que a incorporação de RES nas formulações não contribuiu para o aumento da bioadesão do sistema.

A bioadesão dos sistemas liquido-cristalinos pode ser explicada pelas propriedades reológicas, pois devido ao aumento da viscosidade, das características elásticas e da estruturação do sistema, há o prolongamento do tempo de contato da formulação com o substrato biológico (OYAFUSO, 2012; CALIXTO, 2013; BRUSCHI et al., 2007). Dessa forma, os resultados encontrados no ensaio de bioadesão estão de acordo com os ensaios reológicos descritos anteriormente, uma vez que foi constatado que a formulação F4 possui maior grau de viscosidade e estruturação.

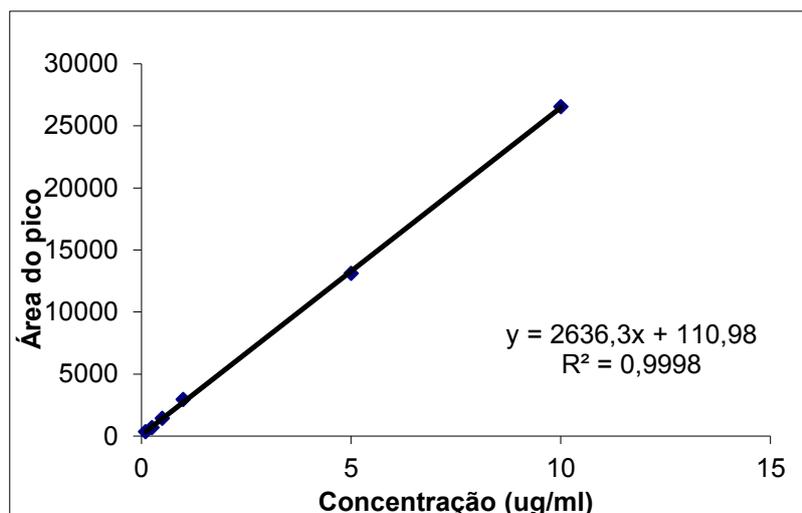
5.3. Metodologia Analítica

A metodologia analítica utilizada foi anteriormente validada pelo nosso grupo de pesquisa por Rigon (2013). Entretanto, foi construída uma curva analítica em meio receptor utilizando as mesmas condições da validação da metodologia analítica já descrita anteriormente com o intuito de avaliar a quantificação do RES nos ensaios de liberação, permeação e retenção *in vitro*. A Figura 22 e Equação 4 demonstra a curva analítica e a equação da reta obtida, respectivamente.

$$y = 2636,3x + 110,98 \text{ (Equação 4)}$$

onde y é a área do pico observada no cromatograma e x sua respectiva concentração.

Figura 22: Curva analítica do RES em solução receptora.



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. Na Figura 22 observou-se a curva analítica do *trans*-reveratrol.

A determinação da linearidade foi executada em triplicata, através da elaboração da curva analítica. De acordo com a RDC 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) da curva analítica é de 0,99 (BRASIL, 2003), sendo obtido na curva analítica em questão valor de 0,9998 no experimento.

5.3.2. Precisão

A Tabela 7 demonstra os resultados obtidos da precisão do método, a qual foi verificada pela análise de 3 concentrações (0,1; 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$), em triplicata ($n=3$) de cada concentração, em 2 dias diferentes.

Tabela 7: Resultados da avaliação da precisão.

Concentração teórica	1° Dia			2° Dia		
	0,1 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$
n=1	341,66	13105,33	26578,12	339,98	13145,11	26658,63
n=2	365,15	13051,91	26422,27	353,15	13104,98	26704,97
n=3	376,60	13194,45	26629,98	367,57	13157,23	26487,91
Média	361,15	13117,22	26543,46	353,56	13135,77	26617,17
Desvio Padrão	17,81	72,02	108,11	13,80	27,34	114,31
DPR	4,93	0,54	0,41	3,90	0,21	0,42

O desvio padrão relativo (DPR) obtido na avaliação da precisão do método analítico mostrou-se adequado (menor que 5,0%) e está de acordo com a RDC 899/3002, demonstrando concordância entre os resultados quando realizados sob as mesmas condições experimentadas neste estudo (BRASIL, 2003).

5.3.3. Exatidão

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos para a exatidão, a qual foi verificada através da análise de 3 concentrações (0,1; 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$), em triplicata ($n=3$), de cada concentração.

Tabela 8: Resultados da avaliação da exatidão.

CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL			
Concentração teórica	0,1 µg/mL	5 µg/mL	10µg/mL
n = 1	0,088	4,925	10,032
n = 2	0,096	4,901	9,981
n = 3	0,100	4,962	99,806
Média	0,095	50,576	10,058
Desvio Padrão	0,067	0,0272	0,0412
Exatidão	92,211	99,901	100,135

5.3.4. Especificidade / Seletividade

A especificidade / seletividade foi avaliada com o intuito de analisar a interferência ou não da formulação no tempo de retenção do RES durante a quantificação do mesmo. Para tal, foi utilizada uma solução de trabalho contendo 10 µg/ml de RES em meio receptor do ensaio de liberação, permeação e retenção cutânea em comparação com uma solução contendo a formulação e outra solução apenas contendo o meio receptor (Polissorbato 80 a 2%). As Figuras 23, 24, 25 demonstram os cromatogramas obtidos.

Figura 23: Cromatograma de 10ug/ml de RES em meio receptor.

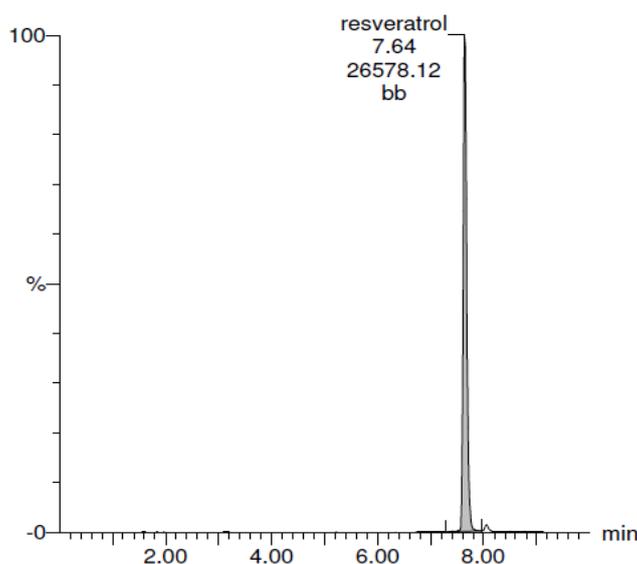


Figura 24: Cromatograma do meio receptor.

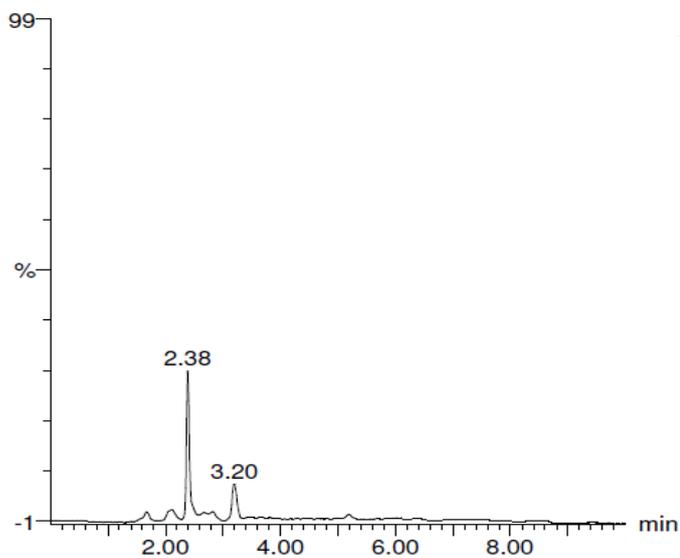
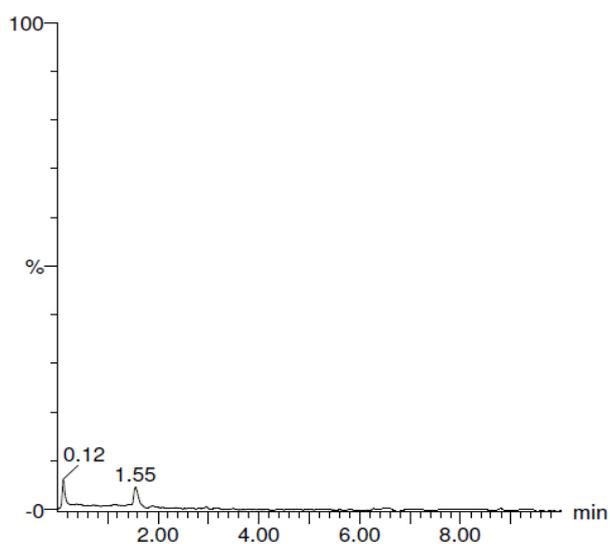


Figura 25: Cromatograma da solução contendo a formulação.



Os cromatogramas obtidos demonstram que o método foi seletivo / específico uma vez que não houve interferência nem do meio receptor nem da formulação no tempo de retenção do RES.

5.4. Avaliação da citotoxicidade em células Caco-2 e SV-80

Este ensaio teve a finalidade de avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos diferentes componentes da formulação (dispersão de carbopol 974[®], silicone DC[®] 193, silicone DC[®] 5329) através do modelo em células epiteliais Caco-2 e SV-80. Dessa forma, utilizou-se um indicador de viabilidade celular denominado como Alamar Blue[®] (AB). Esta substância é reduzida por células que estão metabolicamente ativas e é diretamente proporcional ao número destas (SILVA, 2011). Desta maneira, ao se determinar a porcentagem de redução de AB, é possível determinar a viabilidade celular e proliferação celular, o que está diretamente relacionado com a citotoxicidade dos diferentes compostos adicionados em placas de cultura de 96 poços. As Figuras 26, 27, 28 e 29 mostram os resultados desta avaliação.

Figura 26: Viabilidade celular em relação à porcentagem de controle de células Caco-2 tratadas com dispersão de carbopol 974[®], silicone DC[®]193, silicone DC[®] 5329 em diferentes concentrações durante 24 horas.

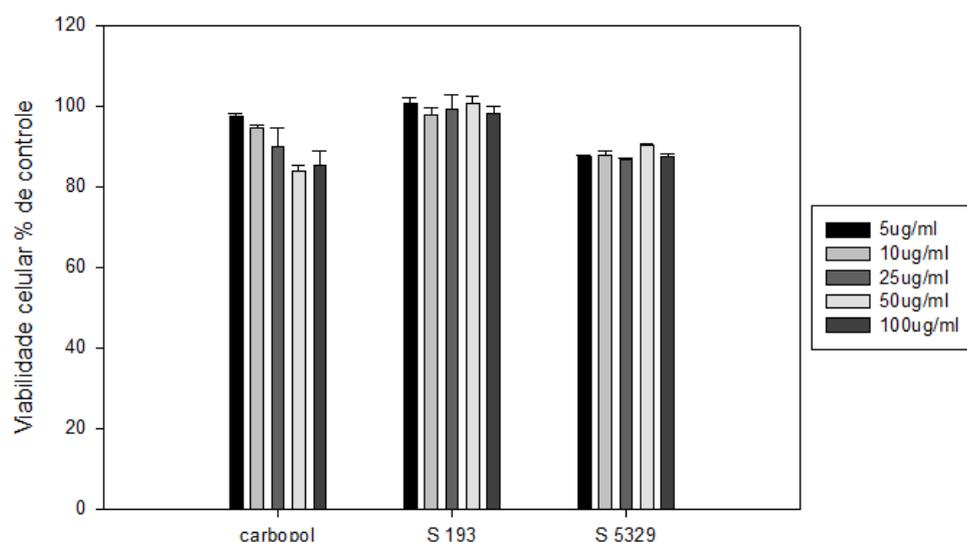
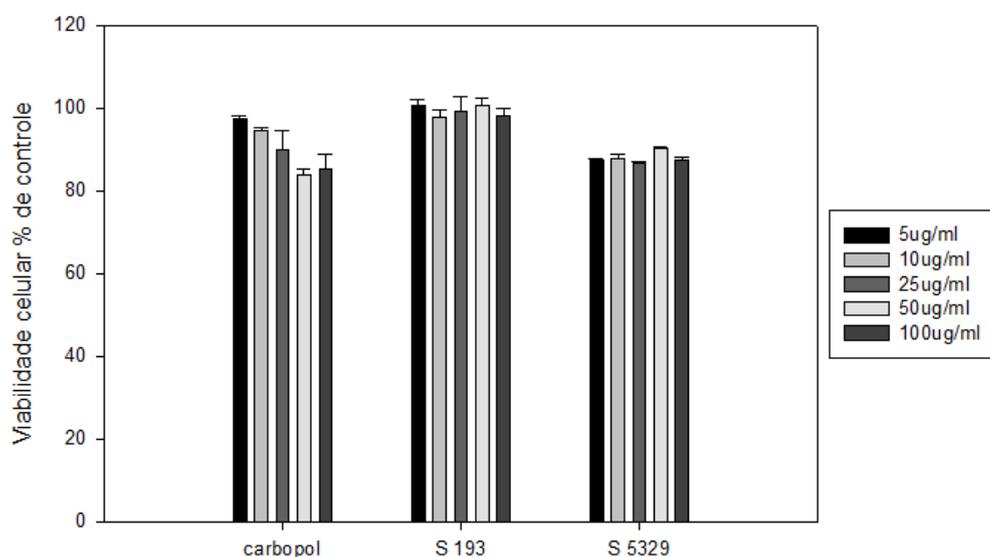


Figura 27: Viabilidade celular em relação à porcentagem de controle de células Caco-2 tratadas com dispersão de carbopol 974[®], silicone DC[®] 193, silicone DC[®] 5329 em diferentes concentrações durante 48 horas.



De acordo com as Figura 26 e 27, pode-se observar que nas primeiras 24 e 48 horas de exposição aos componentes da formulação para a linhagem Caco -2, o silicone DC[®] 193 praticamente não alterou a redução de AB e conseqüentemente não alterou a viabilidade celular, mostrando que para esta linhagem celular este componente não apresentou citotoxicidade. Já o silicone DC[®] 5329 apresentou uma pequena diminuição na viabilidade celular; entretanto, esta diminuição na redução do AB não se mostrou muito pronunciada, uma vez que a viabilidade celular ainda está próxima de 100% com relação ao controle. Já o Carbopol 974[®] nas concentrações mais elevadas (50ug/ml e 100ug/ml) diminuiu a viabilidade celular para aproximadamente 80% em relação ao controle. Dessa forma, como é possível observar nos gráficos anteriores, a leve citotoxicidade apresentada por este componente nesta linhagem celular demonstrou ser dependente da concentração utilizada.

Figura 28: Viabilidade celular em relação à porcentagem de controle de células SV-80 tratadas com dispersão de carbopol 974[®], silicone DC[®] 193, silicone DC[®] 5329 em diferentes concentrações durante 24 horas.

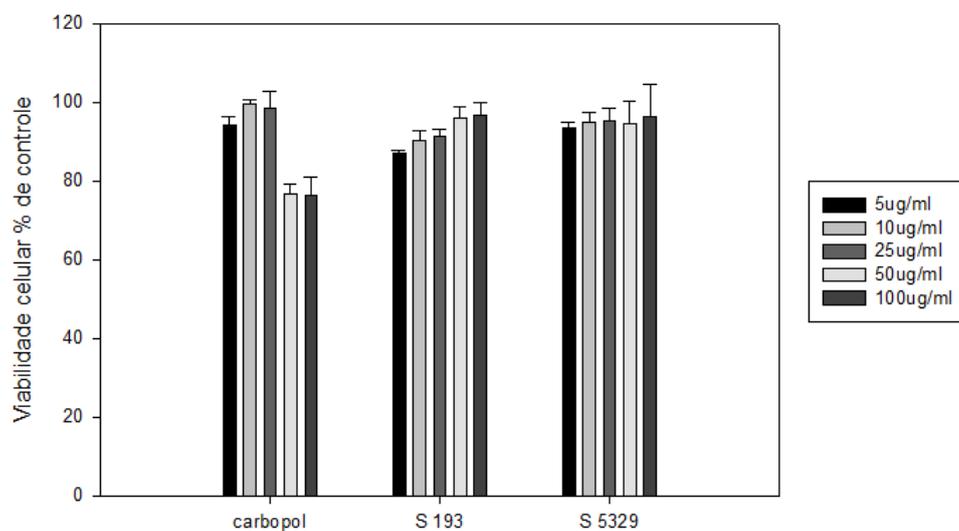
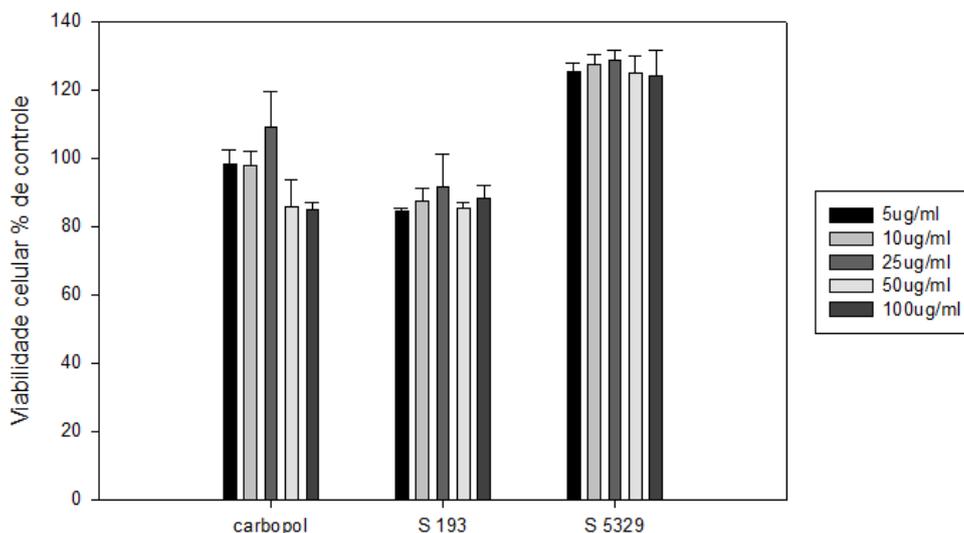


Figura 29: Viabilidade celular em relação à porcentagem de controle de células SV-80 tratadas com dispersão de carbopol 974[®], silicone DC[®] 193, silicone DC[®] 5329 em diferentes concentrações durante 48 horas.



Nas Figuras 28 e 29 estão representadas a viabilidade celular para as células SV-80 durante 24 e 48 horas. É interessante observar que o silicone DC[®] 5329 independente da concentração utilizada não apresentou citotoxicidade. Além disso,

a porcentagem de redução do AB apresentou-se ainda maior após 48 horas de exposição a este composto, sugerindo uma estimulação do crescimento celular ou uma atividade mitocondrial aumentada (SILVA, 2011). Por outro lado, houve uma leve diminuição na viabilidade celular quando esta linhagem ficou exposta ao silicone DC[®] 193 durante 48 horas. Porém, esta diminuição não foi muito pronunciada, visto que em 48 horas a redução do AB apresentou-se acima de 80%. O mesmo ocorreu para o Carbopol 974[®], que em concentrações mais elevadas (50ug/ml e 100ug/ml) apresentou viabilidade celular de 80%.

De maneira geral, conforme demonstrado nas Figuras 23, 24, 25 e 26, os três componentes da formulação estudada não apresentaram pronunciada citotoxicidade, uma vez que a porcentagem de redução do AB foi mantida em 80% ou acima de 80% (SILVA, 2011).

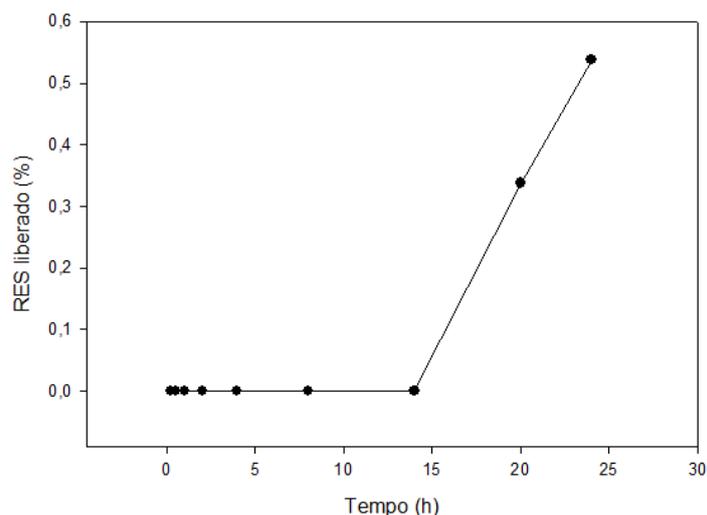
Conforme descrito anteriormente na literatura, os três componentes da formulação (silicone DC[®] 193, silicone DC[®] 5329 e Carbopol 974[®]) não apresentam caráter tóxico nem irritante à pele (CHORILLI *et al*; 2009; BONACUCINA *et al*; 2004). O mesmo foi observado no presente trabalho para as três substâncias, visto que não apresentaram perfil de citotoxicidade e a viabilidade celular se manteve acima de 80%.

Dessa maneira, os resultados deste estudo de avaliação da citotoxicidade em células Caco-2 e SV-80 indicam que as substâncias são seguras para a realização dos testes *in vivo* e uma possível utilização posterior destes sistema.

5.5. Avaliação da Liberação do RES *in vitro*

Realizou-se o ensaio de liberação *in vitro* para as quatro formulações selecionadas (F1 R, F2 R, F3 R, F4 R) contendo 0,1 % de RES. Este experimento permitiu avaliar o perfil de liberação do fármaco relacionando a saída do mesmo do sistema matricial (OYAFUSO, 2012). A Figura 30 apresenta o ensaio de liberação da formulação F1 R.

Figura 30: Perfil de liberação *in vitro* do RES na formulação F1 R durante 24 horas de análise.



O resultado demonstrado na Figura 30 indicou que a liberação do fármaco se inicia somente após 14 horas de experimento e continua em escala crescente até o intervalo de 24hs. A liberação observada na Figura 30 durante as 24 horas, corresponde a 0,54% da taxa de liberação do RES incorporado na formulação F1 R.

A partir deste ensaio, foi possível avaliar a forma de liberação do RES no sistema estudado. Na literatura constam vários modelos matemáticos para representar os perfis de liberação dos fármacos nos diversos sistemas. Neste contexto, foram aplicados os modelos matemáticos: Baker e Lonsdale, Korsmeyer - Peppas, Hixon e Crowell, Higushi, Primeira Ordem e Weibull (COSTA & LOBO, 2001). Os parâmetros calculados para os modelos matemáticos aplicados aos dados de liberação do RES são mostrados na tabela 9.

Tabela 9. Coeficiente de liberação in vitro do RES obtido, pelos de diferentes modelos matemáticos para a formulação F1R.

Modelos Matemáticos	Valor de r quadrado ajustado
Baker e Lonsdale	0,4644
Korsmeyer - Peppas	0,9673
Hixon e Crowell	0,6984
Higushi	0,4646
Primeira Ordem	0,6982
Weibull	1,000

A escolha do melhor modelo matemático de liberação pode ser baseada no valor do coeficiente de correlação ajustado. A formulação F1R segue o modelo matemático de Weibull. A equação de Weibull (Equação 5) deve ser aplicada aos dados dos primeiros 63,2% de liberação do fármaco e expressa a quantidade acumulada de fármaco em função do tempo (COSTA & LOBO, 2001; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

$$m = 1 - \exp\left[\frac{-(t - T_i)b}{a}\right]$$

(Equação 5)

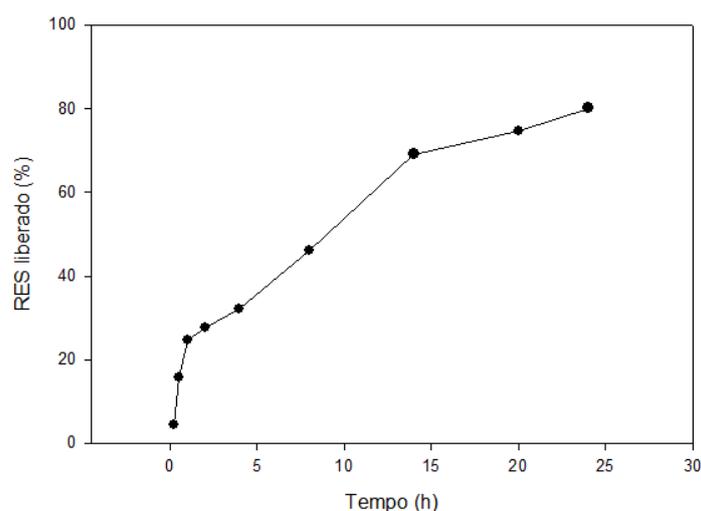
onde: m é fração acumulada de fármaco; t é o tempo final; T_i é o tempo de latência, até que o processo de dissolução ocorra; b é a curva como forma exponencial e a é o parâmetro de escala, relacionado com tempo decorrido de ensaio.

A liberação do RES, por seguir o modelo cinético de Weibull, indica que ocorre um mecanismo complexo de liberação, envolvendo, simultaneamente, o relaxamento das cadeias poliméricas e a erosão do polímero durante a liberação do fármaco.

As outras formulações em estudo (F2 R, F3 R, F4 R) não apresentaram indícios de fármaco liberado em nenhum dos intervalos de tempo. Nota-se que estas formulações possuem maiores quantidades de tensoativo - F2 R (60%), F3 R (65%), F4 R (70%) - em relação a F1 R (55%). De acordo com dados apresentados por Li e colaboradores (2011), é possível ocorrer interações eletrostáticas entre a

cabeça polar do tensoativo e a cadeia do polímero (carbopol[®]974) obstruindo assim o canal difusional do fármaco. Além disso, conforme Formariz *et al* (2005) pode ocorrer interações entre o fármaco e o sistema líquido-cristalino, modulando assim a liberação do mesmo. Dessa forma, sugere-se que estas interações eletrostáticas diminuem a liberação do RES nas formulações F2 R, F3 R, F4 R que apresentam maiores quantidades de tensoativo. Ainda de acordo com Formariz *et al* (2005) e Li e colaboradores (2011), uma possível causa para a pequena liberação do RES na formulação F1 R esteja nestas interações eletrostáticas entre o tensoativo e o polímero e as possíveis interações fármaco-sistema. A fim de confirmar tais hipóteses, realizou-se um ensaio de liberação do RES disperso em propilenoglicol (PG) (SILVA, H.R, 2011) (Figura 31).

Figura 31. Perfil de liberação *in vitro* do RES incorporado em propilenoglicol durante 24 horas de análise.



A partir da Figura 31, é interessante notar a elevada liberação do RES quando disperso ao propilenoglicol (80,2%). De acordo com Formariz e colaboradores (2005), as interações fármaco-sistema desempenham importante papel no controle da liberação. Dessa forma, estes resultados sugerem que a estrutura do sistema pode alterar e modular a liberação do fármaco.

5.6. Avaliação da permeação e retenção do RES in vitro em peles de modelo de animal

O ensaio de permeação cutânea é de grande importância no sentido de avaliar não somente a capacidade das diferentes substâncias ativas permearem através da pele, mas também as interações de uma formulação com a pele e a forma que ocorre a difusão do fármaco nas diferentes camadas da pele, retendo ou não no estrato córneo ou nas demais camadas da pele, como epiderme e derme.

Desta maneira, é possível analisar a penetração do fármaco e a retenção ou não no estrato córneo, epiderme e derme. Para este fim, utiliza-se como membrana modelo a pele da orelha de suínos ou pele humana proveniente de cirurgia plástica (HAWKINS & REIFENRATH, 1986; WAGNER *et al.*, 2001; OYAFUSO, 2012).

De acordo com Dick e Scott (1992), a pele suína apresenta maior melhor similaridade anatômica, histológica e fisiológica à pele humana, quando comparado com outros animais. Dessa forma, utilização da pele suína em ensaios para o lançamento de um novo medicamento torna-se extremamente viável.

No ensaio de permeação cutânea realizado com as formulações F1 R, F2 R, F3 R e F4 R contendo 0,1% de RES não apresentaram indícios de fármaco permeado em nenhum dos intervalos de tempo. Já no ensaio de retenção cutânea observou-se que a formulação F1 R não apresentou retenção de RES no estrato córneo (EC), entretanto, houve retenção na epiderme + derme. Tal resultado torna-se viável para a realização dos ensaios in vivo, uma vez que as enzimas sequestradoras de radicais livres estão presentes na epiderme viável, sendo assim uma formulação útil para a avaliação da eficácia in vivo do RES. Contudo, as formulações F2 R, F3 R e F4 R não demonstraram a presença do fármaco retido no EC e nem na epiderme + derme. Tal resultado está de acordo com o ensaio de liberação in vitro, visto que também não houve indícios de fármaco liberado da matriz nestas mesmas formulações. A Tabela 10 demonstra os dados do ensaio de retenção cutânea.

Tabela 10: Quantidade de RES retido na pele após 24h de experimento na formulação F1R.

Formulações	Retenção EC	Retenção Ep+Derm (ug/cm ²)	Retenção Ep+Derm (%)
F1 R	-	0,35	0,21 ± 11,19

Realizou-se também um ensaio de permeação e retenção cutânea utilizando o RES incorporado em PG como controle. A Tabela 11 demonstra os resultados obtidos neste experimento.

Tabela 11: Percentual permeado e retido no extrato córneo, epiderme + derme do RES incorporado em propilenoglicol após 24h de experimento.

	Retenção EC (%)	Retenção Ep+Derme (%)	Permeação (%)
RES em PG	1,71 ± 25,04	21,06 ± 23,83	68,37 ± 19,56

A Tabela 11 demonstra que houve permeação e retenção cutânea no ensaio realizado com o RES incorporado em PG. Esses resultados corroboram com os resultados apresentados na Figura 31, visto que os 80,02% liberado da matriz permeou e reteve na pele. Tal resultado está de acordo com Li e colaboradores (2011), demonstrando que a estrutura do sistema pode interferir na liberação do fármaco e conseqüentemente na permeação do mesmo.

5.7. Avaliação da eficácia *in vivo* do RES

Para a escolha da formulação a ser utilizada na avaliação da eficácia *in vivo* anti-inflamatória e antioxidante do RES baseou-se nos ensaios de liberação e permeação *in vitro* do RES. A formulação escolhida foi a F1 devido à retenção observada na epiderme e derme. Esta retenção é favorável para a realização dos ensaios *in vivo*, uma vez que o processo inflamatório e as enzimas antioxidantes estão presentes na epiderme viável.

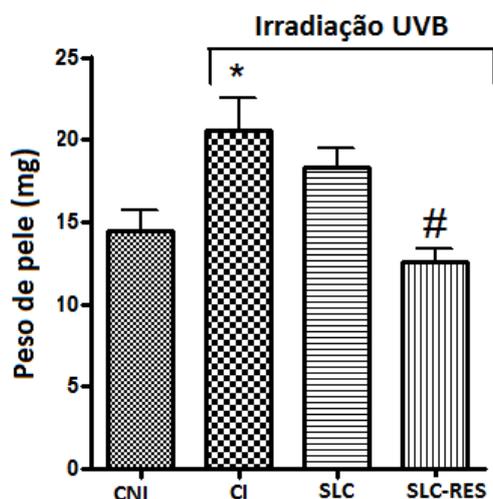
5.7.1. Avaliação da eficácia anti-inflamatória *in vivo* do RES

5.7.1.1. Avaliação do edema cutâneo

Os raios UV ocasionam diversos efeitos indesejáveis e prejudiciais na pele, quando a mesma é exposta de maneira excessiva. Câncer de pele, fotoenvelhecimento, ressecamento, descamação e manchas hiperpigmentadas são alguns exemplos. Além disso, fenômenos como alterações no fluxo sanguíneo e infiltração de células inflamatórias, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e extravasamento de proteínas e fluidos da corrente sanguínea para o interstício resultam em edema cutâneo. Tais eventos podem ser considerados marcadores de inflamação na pele (ATHAR et al., 2004). Dessa maneira, analisou-se a capacidade do sistema líquido cristalino contendo RES em inibir o edema induzido pela radiação UVB nos diferentes grupos de camundongos *hairless*. Os animais foram subdivididos em CNI (grupo controle não irradiado), CI (controle irradiado), SLC (grupo tratado apenas com formulação líquido-cristalina sem o RES) e SLC-RES (grupo tratado com formulação de cristal líquido contendo o fármaco *trans*-resveratrol incorporado). Cada grupo foi composto por 5 animais.

A Figura 32 demonstra os resultados obtidos nesta análise.

Figura 32. Sistema líquido-cristalino contendo RES no edema cutâneo induzido pela irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado, e #comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.



O espectro de luz UV que induz edema em camundongos *hairless* é o mesmo que induz eritema em seres humanos. Devido a esta semelhança, o edema causado nos camundongos após irradiação UVB é capaz de mensurar de forma confiável a mesma alteração em humanos (SAMS et al., 2002; CAMPANINI et al., 2013).

De acordo com a Figura 32 notou-se que o edema cutâneo aumentou após a irradiação UVB (CI), quando comparado com o grupo não irradiado (CNI). Entretanto, este aumento foi reduzido no grupo tratado com formulação de cristal líquido contendo o RES (SLC-RES). Observou-se também que houve diferença significativa entre o grupo tratado apenas com o sistema líquido cristalino e o grupo tratado com o sistema líquido cristalino com o RES incorporado.

Neste contexto, é possível inferir que o tratamento com RES foi eficaz na diminuição do edema cutâneo, colaborando assim com a redução do processo inflamatório ocasionado pela radiação UVB.

Estudo conduzido por Afaq e colaboradores (2003) utilizando camundongos *hairless* tratados topicamente com solução de acetona contendo RES, demonstrou que o fármaco foi capaz de diminuir o edema causado por uma dose de 180 mJ/cm² de irradiação UVB, confirmando assim, a capacidade anti-inflamatória do RES frente a irradiação UVB (AFAQ et al., 2003).

5.7.1.2. Avaliação da atividade de MPO

A inflamação é a primeira resposta do mecanismo de defesa do organismo. Tanto a inflamação aguda como a crônica envolve forte estimulação de neutrófilos que liberam espécies reativas de oxigênio (EROS) e MPO. A ativação de neutrófilos dá início a uma cascata de eventos intracelulares que culminam na liberação de enzimas através de degranulação (GONÇALVES, 2012; WEISS, 1989).

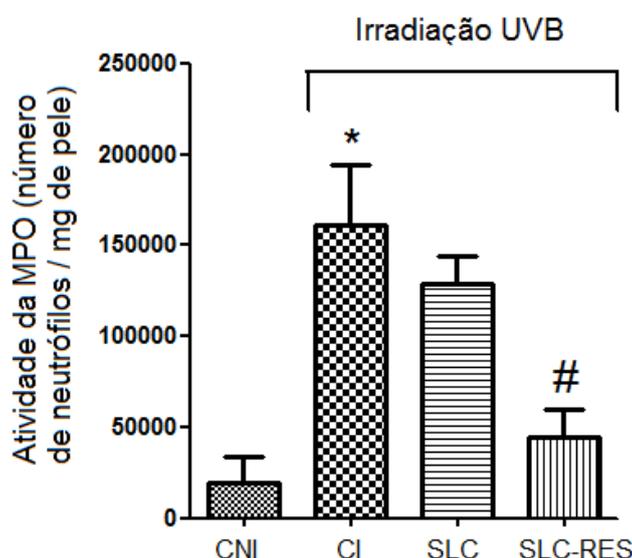
A MPO desempenha um papel importante no sistema imunológico humano e sua atividade tem sido utilizada como marcador quantitativo da infiltração neutrofílica no tecido inflamado, determinada por método colorimétrico e leitura final realizada pelo método ELISA (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982). Dessa forma, o aumento da enzima MPO demonstra a instalação de um processo inflamatório (CASTRO et al., 2008).

Há diversos relatos na literatura que demonstram a capacidade anti-inflamatória e antioxidante do RES (FILIP et al., 2013; CASTRO et al., 2008; GOD,

TATE, LARCOM, 2007; JUNG, WALLIG, SINGLETARY, 2006; VAYALIL, MITTAL, KATIYAR, 2004; MITTAL, ELMETS, KATIYAR, 2003; SHI et al., 2003).

Com o objetivo de analisar a atividade de MPO à resposta inflamatória após irradiação UVB, realizou-se o ensaio de MPO. A Figura 33 demonstra os resultados obtidos no ensaio de MPO.

Figura 33. Sistema líquido-cristalino contendo RES inibe a atividade da MPO induzida pela irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado, #comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.



Em geral, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o sítio inflamatório. Este recrutamento acontece devido à produção de EROS desencadeada por irradiação UVB. Posteriormente, a enzima MPO, armazenada em grandes quantidades em grânulos azurófilos dos neutrófilos, reage com proteínas, DNA e lípidos formando oxidantes de longa duração que estão envolvidos em processos de carcinogênese, aterosclerose e insuficiência renal crônica (JANTSCHKO et al., 2005; WITKO-SARSAT et al., 2000; BANERJEE & SAXENA, 2012).

Na Figura 33 observou-se que após a irradiação UVB houve o aumento da atividade da MPO, por consequência de migração de neutrófilos no grupo CI em

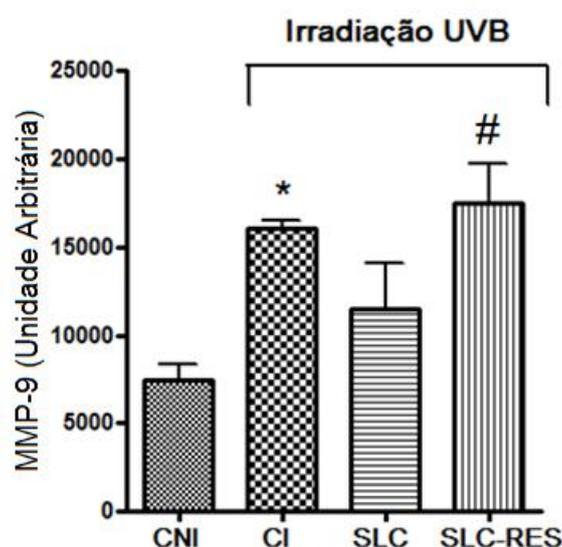
comparação ao CNI. Por outro lado, o grupo tratado com RES (SLC-RES) inibiu significativamente a atividade da MPO, ou seja, o recrutamento de neutrófilos. Tais resultados corroboram com a literatura e confirmam a potencial atividade anti-inflamatória do RES após irradiação UVB (MARTÍN et al., 2004).

5.7.1.3. Avaliação da inibição de secreção/atividade da MMP-9

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são um grupo de enzimas responsáveis pelo processo de remodelamento dos tecidos e degradação dos componentes da matriz extracelular e das membranas basais. São produzidas por fibroblastos, queratinócitos, mastócitos, células endoteliais e leucócitos, tais como o neutrófilos, e são liberadas de grânulos citoplasmáticos. Nos tecidos saudáveis, as MMPs atuam no processo de cicatrização. Entretanto, em processos inflamatórios, lesões neoplásicas e alterações fibróticas ocorre elevação dessas enzimas. A expressão da MMP-9, também conhecida como 92-kDa (CLG4B), varia de acordo com o tipo de célula estudado, sendo secretada por células inflamatórias, fibroblastos e queratinócitos (BAKOS, 2005; FUCHS et al., 2001).

Neste contexto, após tratamento e irradiação UVB em camundongos *hairless*, realizou-se o ensaio de zimografia a fim de avaliar se o tratamento com SLC-RES inibe a secreção e atividade da MMP-9 (Figura 34).

Figura 34. Sistema líquido-cristalino contendo RES na secreção/atividade da MMP-9 induzida pela irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado, #comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.



A irradiação UVB induz a ativação do fator de transcrição proteína-1 (AP-1) e, como consequência, ocorre a indução de MMPs, que degradam a estrutura da pele. A MMP-9 (gelatinase B) é uma das principais enzimas relacionados com a degradação do colagénio e componentes da rede de fibras elásticas (CAMPANINI et al., 2013; JENKINS, 2002).

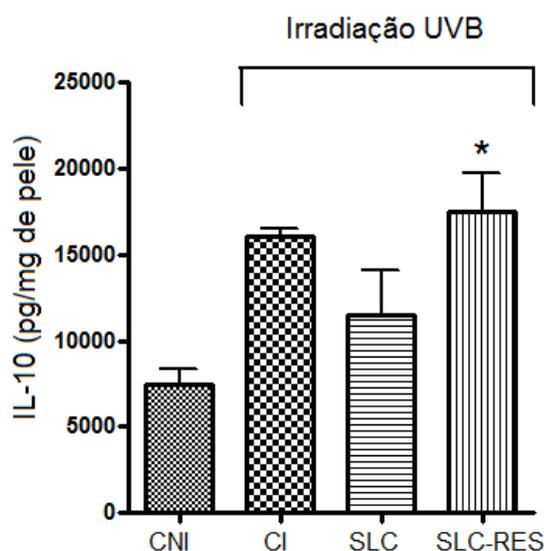
De acordo com Vicentini et al. (2008) e com a Figura 34, houve um aumento significativo na expressão/atividade da MMP-9 após irradiação UVB no grupo CI. É interessante notar que no grupo tratado com o SLC-RES também houve o mesmo aumento. Tal acontecimento pode ser favorável para síntese de pró-colágeno, regulação da resposta inflamatória e rearranjo da pele já danificada com a luz UVB. Isso é devido à necessidade das células inflamatórias atravessarem a matriz extracelular durante o reparo da pele danificada. Dessa forma, o aumento da MMP-9 pode ser favorável para a cicatrização da mesma (FONSECA et al., 2010). Entretanto, há a necessidade de estudos posteriores para abordagem deste assunto.

5.7.1.4. Avaliação da produção de IL-10

As EROS formadas pela radiação UV causam danos oxidativos em proteínas e lipídios que podem resultar em níveis aumentados de prostaglandinas, levando a um processo de inflamação na pele. Esta inflamação conduz ao aumento de citocinas, quimiocinas e células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, os quais também produzem grandes quantidades de EROS (HALLIDAY, 2005). Este ciclo vicioso ocasionado pela estreita relação entre estresse oxidativo e inflamação resulta em danos teciduais e em longo prazo pode conduzir a carcinogênese (IVAN, 2013; REUTER et al., 2010).

Após a radiação UV, as células da epiderme liberam várias citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e TNF- β), as quais atuam como mediadoras da resposta inflamatória da pele (IVAN, 2013; BATHIA et al., 2011). A fim de avaliar o efeito do RES incorporado sistema líquido cristalino na produção de citocinas induzidas pela irradiação UVB, realizou-se a dosagem da citocina anti-inflamatória IL-10. A Figura 35 demonstra os resultados obtidos neste ensaio.

Figura 35. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES na produção de citocinas induzidas pela irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.



Dentre as citocinas avaliadas apenas a IL-10 demonstrou modificações após o tratamento dos animais com o sistema líquido cristalino contendo RES (Figura 35).

Considerando a IL-10, a radiação UVB não influenciou nos níveis desta citocina nas condições experimentais testadas. No entanto, o sistema líquido cristalino contendo RES aumentou significativamente a produção de IL-10 comparada ao CNI. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que inibe o fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) e equilibra sinais de ativação e inibição do processo inflamatório por reduzir a transcrição e produção de citocinas pró-inflamatórias. Na inflamação induzida por EROS, o NF-kB desempenha um papel crucial. Ele liga-se ao promotor de genes distintos que codificam TNF, IL-6 e IL-1, e várias moléculas de adesão, permitindo, assim, a sua transcrição (CAMPANINI et al., 2013; WEISS et al, 2004; RIBBONS et al, 1997).

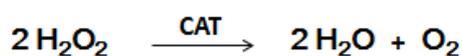
Neste contexto, o aumento de IL-10 ocasionado pelo tratamento dos animais com o cristal líquido contendo RES, mais uma vez demonstra a capacidade anti-inflamatória deste fármaco.

5.7.2. Avaliação da eficácia in vivo do RES na proteção da capacidade antioxidante da pele

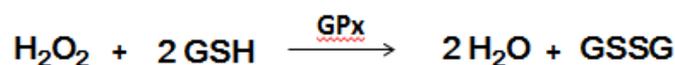
5.7.2.1. Dosagem do antioxidante GSH e CAT

A pele é constituída de uma série de enzimas e moléculas antioxidantes que são importantes para manter o equilíbrio natural, evitando assim a instalação do chamado estresse oxidativo. Dentre esses antioxidantes presentes na pele, a glutathiona reduzida (GSH), a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a catalase (CAT) desempenham um papel importante de defesa contra os danos causados pelos radicais livres. A exposição excessiva aos raios UV, além de desencadear processos inflamatórios, também leva ao desequilíbrio entre os antioxidantes presentes na pele e as EROS formadas (FUCHS, 1998).

A CAT e a GSH-Px catalisam a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (Equação 6). A GSH-Px catalisa a reação de doação de elétrons, utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como agente redutor e formando a glutathiona oxidada (GSSG). A GSH atua como um co-factor para a glutathiona peroxidase e glutathiona redutase, que reduzem o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos (Equação 7) (MALACHIAS, 2008; ROVER et al., 2001; FRIDOVISH, 1998).



(Equação 6)



(Equação 7)

A diminuição nos níveis de GSH pode prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres. Nas células íntegras a GSSG formada é reduzida novamente a GSH à custa de NADPH, pela ação da enzima glutathiona redutase (GR). Dessa forma, a razão GSH/GSSG se mantém alta (MALACHIAS, 2008).

Além disso, o grupo sulfidríla (SH) da GSH permite a remoção de radicais livres por transferência de hidrogênio (CAMPANINI et al, 2013).

Neste contexto, realizou-se a dosagem de GSH e CAT a fim de avaliar a capacidade antioxidante da pele tratada com RES após irradiação UVB (Figura 36 e 37).

Figura 36. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES nos níveis de GSH após irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado e # comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.

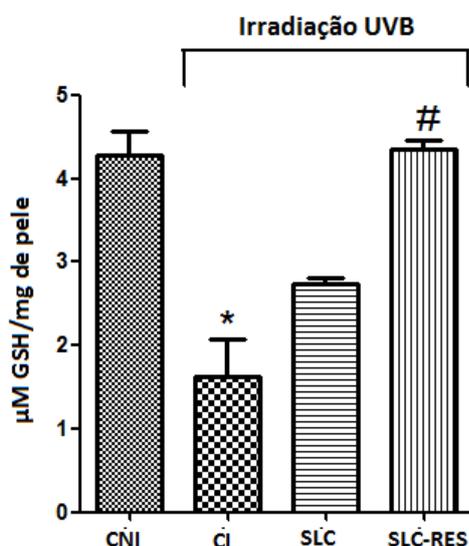
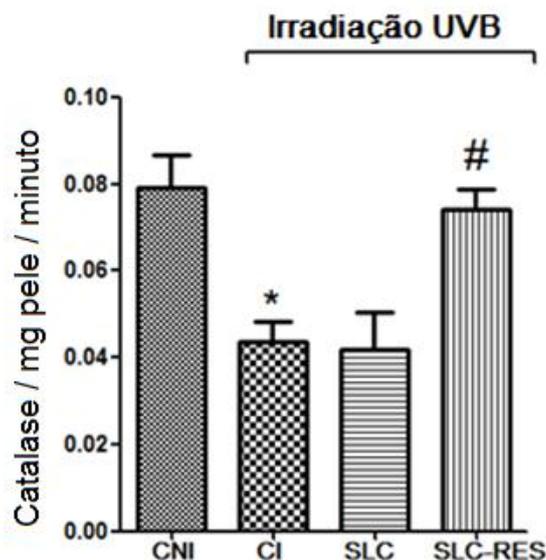


Figura 37. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES nos níveis do antioxidante catalase após irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado # comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.



Após análise estatística e observação das Figuras 36 e 37 é possível notar que a dose de radiação UVB utilizada neste experimento foi capaz de diminuir significativamente a quantidade dos antioxidantes GSH e CAT no controle irradiado (CI). Em contra partida, houve um aumento significativo desses antioxidantes na pele dos camundongos tratados (SLC-RES) quando comparado ao grupo CI, ou seja, o RES incorporado no sistema líquido-cristalino foi capaz de inibir a redução de GSH endógeno e CAT, mantendo os níveis de ambos similares ao do controle não irradiado (CNI). Tais resultados confirmam a capacidade antioxidante do RES mesmo em pequenas concentrações.

5.7.2.2. Ensaio FRAP e ABTS

A capacidade antioxidante da pele após irradiação UVB foi medida por meio dos ensaios FRAP e ABTS.

O estresse oxidativo pode ser caracterizado pela diminuição dos antioxidantes endógenos. Neste contexto, vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante em diversos órgãos. A dificuldade em medir cada componente antioxidante separadamente e as suas interações leva-nos a

utilizar ensaios rápidos, simples e eficientes, como ABTS e FRAP, que utilizam princípios diferentes para medir a capacidade antioxidante (CAMPANINI et al., 2014).

Inicialmente desenvolveu-se o método FRAP (Poder Antioxidante Redutor Férrico) para medir o poder redutor no plasma; entretanto, atualmente este teste tem sido adaptado e utilizado amplamente em estudos de substâncias antioxidantes. Baseia-se na transferência de elétrons, ou seja, na capacidade dos antioxidantes em reduzir o Fe^{+3} em Fe^{+2} (VIGNOLI, BASSOLI, BENASSI, 2012). Durante o ensaio, a reação ocorre por meio da formação de um complexo TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) com o Fe (III), de cor amarelada. Na presença de um antioxidante, o ferro presente é reduzido, dando origem ao $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{3+}$, de coloração azul escura (TIVERON, 2010).

O método ABTS foi inicialmente sugerido por Miller et al. (1993) em amostras biológicas. O ensaio baseia-se na habilidade dos antioxidantes em sequestrar o radical de longa vida ABTS^+ . Durante o ensaio, o ABTS é oxidado por outros oxidantes para seu radical cátion ABTS^+ que apresenta cor esverdeada. A ação antioxidante da amostra é medida pela habilidade da mesma em decrescer a cor, reagindo diretamente com o radical ABTS^+ (VIGNOLI, BASSOLI, BENASSI, 2012; TIVERON, 2010).

As Figuras 38 e 39 demonstram os resultados obtidos em ambos os ensaios.

Figura 38. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES no poder redutor férrico após irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado # comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.

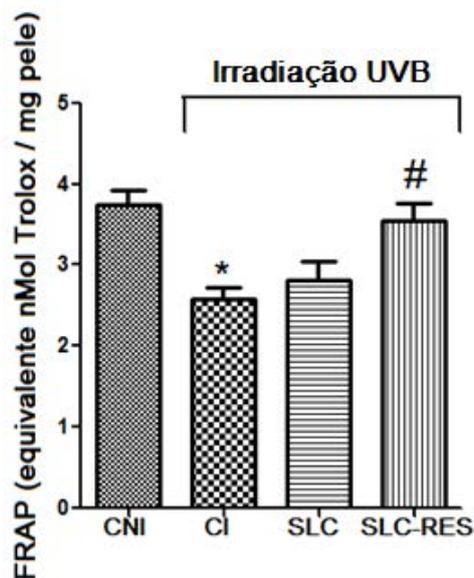
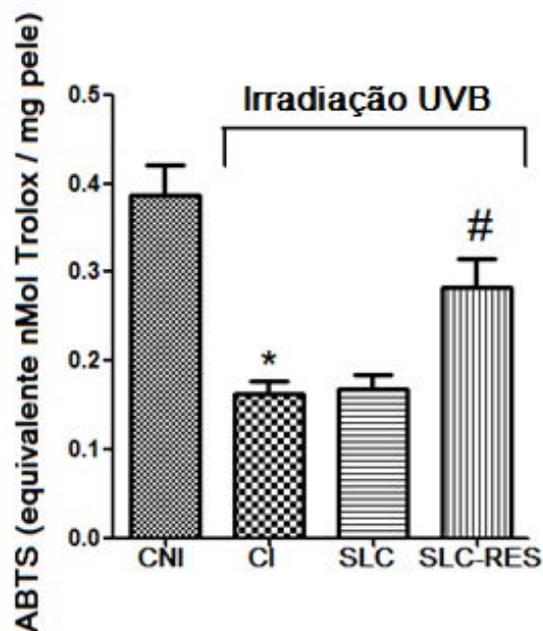


Figura 39. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES em sequestrar o radical $ABTS^+$ após irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado # comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.



Após análise dos dados, observou-se que a capacidade antioxidante da pele medida pelos ensaios de FRAP e ABTS reduziu significativamente após a irradiação UVB no grupo controle irradiado (CI) em relação ao controle não irradiado (CNI). Entretanto, notou-se em ambos os testes, que houve diferença significativa entre o grupo tratado com RES (SLC-RES) e o irradiado não tratado (CI), visto que o SLC-RES apresentou aumento da capacidade antioxidante da pele. Neste contexto, infere-se que o RES foi capaz de aumentar as defesas naturais da pele após a irradiação UVB.

A atividade antioxidante do RES está associada à sua capacidade de transferência de um átomo de hidrogénio ou um elétron e à possibilidade de suas interações com outro antioxidante. Além disso, a capacidade antioxidante de compostos extraídos de plantas tem sido indicado pelo poder redutor destes componentes (HUSSEIN et al., 2011).

Conforme Hussein e colaboradores (2011), uma propriedade significativa do RES é a sua capacidade para bloquear o processo oxidativo, ou seja, ele impede a transição de Fe^{2+} para Fe^{3+} , os quais desempenham um papel essencial na formação EROS.

Portanto, de acordo com os resultados demonstrados nas Figuras 38 e 39, a formulação tópica contendo o fármaco demonstrou claramente a sua capacidade antioxidante.

5.7.2.3. Determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

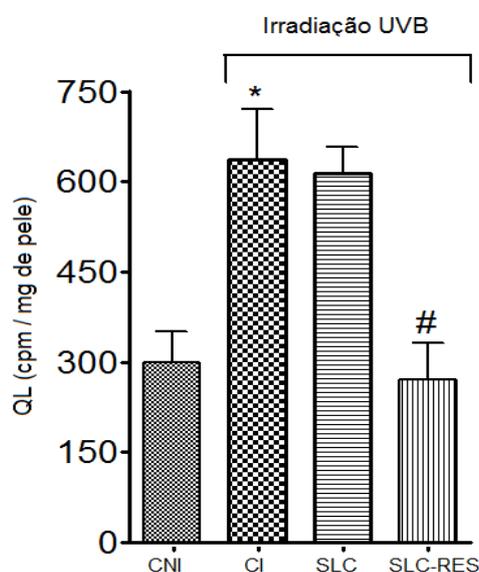
Os efeitos prejudiciais desencadeados pelos radicais livres sobre componentes biológicos já eram conhecidos desde o final de século XIX. Estes radicais livres ao reagirem com os ácidos poli-insaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, provocam um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que por sua vez é indicativo de estresse oxidativo celular (LIMA & ABDALLA, 2001).

A peroxidação lipídica é definida como sendo uma cascata de eventos bioquímicos que são provenientes da ação dos radicais livres sobre os lipídeos das membranas celulares levando a formação de principalmente L^{\cdot} , LO^{\cdot} e LOO^{\cdot} . Este pode ser considerado o evento citotóxico primário que ocasiona uma sequencia de lesões nas células (BENZIE, 1996; VACA, WILHEM, HARMS-RINGDAHL, 1988;

BABER, HARRIS, 1994). Durante a peroxidação lipídica, ocorre a incorporação de oxigênio molecular a um ácido poli-insaturado, dando origem ao hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial (LIMA & ABDALLA, 2001).

A fim de avaliar a peroxidação lipídica do tecido cutâneo após irradiação UVB, realizou-se o ensaio de determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) por quimiluminescência (Figura 40). Este teste baseia-se no consumo das defesas antioxidantes e a formação de hidroperóxidos resultando em aumento da emissão de fótons, ou seja, em um aumento de quimiluminescência que está relacionado com o estresse oxidativo.

Figura 40. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES na produção de hidroperóxidos lipídicos após irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado # comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.



Observando-se a Figura 40, é possível notar que a dose de radiação UVB utilizada neste experimento induziu significativamente a peroxidação lipídica no controle irradiado (CI). Este aumento foi praticamente reduzido ao nível do grupo controle não irradiado (CNI) por meio do tratamento com o sistema líquido cristalino contendo RES. Nenhum efeito foi observado no grupo contendo a formulação sem a adição do fármaco (SLC). Notou-se também que estatisticamente houve diferença

significativa entre o grupo tratado com o RES incorporado à formulação (SLC-RES) e o grupo CI, ou seja, o cristal líquido contendo RES foi capaz de reduzir os níveis de hidroperóxidos lipídicos e, conseqüentemente a peroxidação lipídica. Tal resultado confirma a sua capacidade antioxidante.

A propriedade antioxidante do RES está estritamente relacionada com a sua estrutura molecular. As duplas ligações conjugadas deixam os elétrons do anel aromático mais deslocalizados, o que resulta em uma eliminação eficiente de radicais livres, tais como: $\text{OH}\cdot$, $\text{LOO}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $\text{NO}\cdot$ (HUSSEIN et al., 2011).

Afaq et al (2003) conduziram um estudo utilizando camundongos *hairless* submetidos à irradiação para observar a diminuição da peroxidação lipídica mediante utilização de RES presente em solução de acetona. Os animais foram tratados topicamente com solução de acetona contendo RES e submetidos à irradiação. Eles observaram que o RES presente nas soluções foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica iniciada devido à exposição a uma dose de 180 mJ/cm^2 de irradiação UVB.

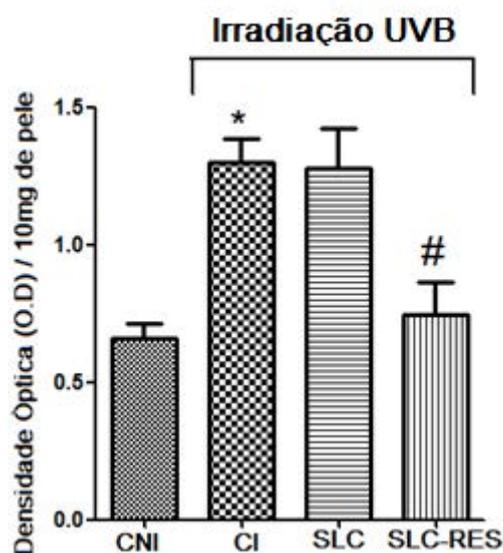
5.7.2.4. Produção do ânion superóxido

Em situações fisiológicas, a produção do ânion superóxido é essencial para a defesa de organismos vivos, atuando na transferência de sinais entre células. Entretanto, a produção exacerbada deste ânion leva a instalação do estresse oxidativo e está envolvida em diversas patologias (ALVES et al., 2010).

Para avaliar a produção do radical ânion superóxido realizou-se o método NBT. Este ensaio baseia-se na reação entre o ânion superóxido e o *nitroblue tetrazolium* (NBT), dando origem ao composto formazan, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração do radical. As moléculas que atuam como antioxidantes reagem com $\text{O}_2^{\cdot-}$ inibindo a produção do formazan (ANDRADE et al., 2005; KAKKAR; DAS; VISWANATHAN, 1984).

A Figura 41 demonstra a capacidade sequestradora do radical ânion superóxido pelo método NBT após irradiação UVB.

Figura 41. Efeito do sistema líquido cristalino contendo RES na produção do ânion superóxido induzido pela irradiação UVB. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 2 experimentos separados, com 5 animais por grupo. *comparado com grupo controle não irradiado e # comparado com grupo controle irradiado e SLC sem RES ($p < 0,05$). CNI: Controle não irradiado, CI: Controle irradiado, SLC: grupo tratado apenas com sistema líquido-cristalino sem RES e SLC-RES: grupo tratado com sistema líquido-cristalino contendo RES.



Consistente com Campanini e colaboradores (2013), observou-se que na Figura 41 a irradiação UVB induziu o aumento do ânion superóxido no grupo CI em comparação ao CNI. Por outro lado, o grupo tratado com RES (SLC-RES) inibiu significativamente a indução do ânion superóxido. Neste contexto infere-se que a formulação tópica contendo RES (SLC-RES) inibiu o estresse oxidativo que seria desencadeado pela estimulação da superprodução de ânion superóxido na pele dos camundongos *hairless* após irradiação UVB.

Sabe-se que o radical superóxido é extremamente prejudicial para os componentes celulares e age como um precursor de mais EROS. Além disso, ele desempenha um papel fundamental na peroxidação lipídica, contribuindo assim, com o dano tecidual e desenvolvimento de diversas doenças (SAKANAKA et al., 2005; CHUNG et al., 2005). Os resultados obtidos nos ensaios de determinação de hidroperóxidos lipídicos e produção do ânion superóxido corroboram entre si, uma vez que foi possível observar em ambos os testes a ação benéfica e antioxidante do sistema líquido-cristalino contendo RES após a irradiação UVB.

Hussein (2011) avaliou a possível capacidade *in vivo* do RES em atividades de eliminação de radicais livres e antioxidantes. Para isso, foram empregados diferentes testes antioxidantes, tais como FRAP, eliminação de radicais superóxido (NBT), peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil. Os resultados obtidos foram comparados com os antioxidantes naturais e sintéticos (RES, α -tocoferol, ácido ascórbico, butil-hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA) e trolox). O RES demonstrou bons resultados em todos os testes realizados confirmando a sua forte capacidade antioxidante (HUSSEIN, 2011).

Dessa forma, os resultados apresentados no decorrer deste trabalho demonstram a eficácia do sistema líquido-cristalino contendo RES no estresse oxidativo e na inflamação após irradiação UVB. Portanto, estes resultados, além de sugerirem a possível utilização do RES para evitar danos na pele causados pela exposição excessiva aos raios UV, também mostram a importância da realização posterior de ensaios pré-clínicos com este fármaco.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados experimentais, pode-se concluir que:

- Os sistemas constituídos por silicone DC[®] 5329, como tensoativo, silicone DC[®] 193 como fase oleosa e dispersão de Carbopol[®] 974 0,5% como fase aquosa apresentaram, de acordo com os resultados de MLP, SAXS e reologia, as estruturas lamelares e se comportaram como um fluido não newtoniano, pseudoplástico e tixotrópico.
- Estudos reológicos demonstraram ainda que as formulações possuem alto grau de estruturação devido à predominância do G' (módulo de armazenamento) sobre G'' (módulo de perda);
- Ensaios de perfil de textura evidenciaram que a formulação F4 apresentou melhor adesão e espalhabilidade na pele, além de maior facilidade de aplicação;
- Os estudos de citotoxicidade realizados com células Caco-2 e SV-80 evidenciaram que os componentes da formulação são não citotóxicos;
- O ensaio de liberação *in vitro* demonstrou que houve liberação do fármaco apenas na formulação F1. Ensaios realizados com RES disperso em propilenoglicol evidenciaram alta taxa de liberação após 24 horas (80%), o que evidencia a influência do sistema na liberação do fármaco;
- O ensaio de permeação cutânea revelou que não houve indícios de permeação durante 24 horas. Contudo, houve retenção na epiderme e derme da formulação F1 R sendo uma característica desejada para a realização da avaliação da eficácia *in vivo* do RES.
- A avaliação da eficácia *in vivo* do RES demonstraram que a formulação F1 contendo RES possui grande potencial antioxidante avaliado por meio dos ensaios de dosagem do antioxidante endógeno GSH, avaliação do poder antioxidante redutor férrico (FRAP), capacidade sequestradora de radical ABTS⁺, dosagem da atividade da catalase (CAT), avaliação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e produção do ânion superóxido.
- A avaliação da atividade anti-inflamatória da formulação 1 acrescida de RES mostrou grande potencial anti-inflamatório por meio dos ensaios de avaliação

do edema cutâneo, avaliação da atividade da MPO, avaliação da inibição/secreção da MMP-9 e avaliação de produção da IL-10.

- Os resultados obtidos sugerem que o sistema, em virtude das características estruturais, acitotóxicas, antioxidantes e anti-inflamatórias é promissor para utilização no tratamento das desordens cutâneas decorrentes do estresse oxidativo.

7. REFERÊNCIAS

- AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; AHMAD, N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 186, n.1, p. 28-37, 2003.
- 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, pag. 2783-840, 2004.
- AL-NASIRY, S; GEUSENS, N; HANSSSENS, M; LUYTEN, C; PIJNENBORG, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**. V. 22, N.5, p. 1304–1309. 2007.
- ALVES, C.Q; DAVID, J.M; DAVID, J.P; BAHIA, M.V; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim. Nova*, v. 33, n. 10, p. 2202-2210. 2010.
- 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, pag. 413–420, 1995.
- AMRI, A.; CHAUMEIL, J. C.; SFAR, S.; CHARRUEAU C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? **Journal of Controlled Release**. v.158. p.182-193. 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, SAMS Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
- ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 9-20, 2003.
- ASHCROFT, G.S.; GREENWELL-WILD, T.; HORAN, M.A.; WAHL, S.M.; FERGUSON, M.W. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. **Am. J. Pathol.**, v.155, n.4, p.1137-46, 1999.
- ATHAR, M.; AN, K. P.; TANG, X.; MOREL, K. D.; KIM, A. L.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R. Photoprotective effects of sulindac against ultraviolet B-induced phototoxicity in the skin of SKH-1 hairless mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 370-378, 2004.
- AZIZ, M.H.; REAGAN-SHAW, S.; WU, J.; LONGLEY BJ, AHMAD N. Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? **FASEB J**. v.19, n.9, p.1193-1195. Jul 2005.

AZULAY, M.M.; LACERDA, C.A.M.; PEREZ, M.A.; FILGUEIRA, A.L.; CUZZI, T. Vitamina C. **An. Bras. Dermatol.**, v.78, n.3, p.265-272, 2003.

BANERJEE, M.; SAXENA, M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 Diabetes. **Clin. Chim. Acta.** v.413, p.1163–1170. 2012.

BARBER, A.D., HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. *Amer. Pharm.* v.34, n.9, p.26-35, 1994.

BATHIA, N.; DEMMER, T. A.; SHARMA, A. K.; ELCHEVA, I.; SPIEGELMAN, V. S. Role of β -TrCP ubiquitin ligase receptor in UVB mediated responses in skin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, p. 178-184, 2011.

BATISTELA, M.A.; CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R. Abordagens no estudo do envelhecimento cutâneo em diferentes etnias. **Rev. Bras. Farm.**, v.88, n.2, p.59-62, 2007.

BAUR, J.A; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nat. Rev. Drug Discov.** V.5, p. 493–506. 2006.

BENDER, J.; SIMONSSON, C.; SMEDH, M.; ENGSTRÖM, S.; ERICSON, M. B. Lipid cubic phases in topical drug delivery: Visualization of skin distribution using two-photon microscopy. **J. Control. Release**, v. 129, p. 163-169, 2008.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, easurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.** v.47,n., p.233-261, 1996.

BERNI, M.G.; LAWRENCE, C.J.; MACHIN, D. A review of the rheology of the lamellar phase in surfactant systems. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v.98, n.2, p.217-243, 2002.

BISCHOFF, J.E.; ARRUDA, E.M.; GROSH, K. Finite element modeling of human skin using an isotropic, nonlinear elastic constitutive model. **J. Biomech.**, v.33, n.6, p.645-652, 2000.

BOLLER, S.; SOLDI, C.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, E.P.; CABRINI, D.A.; PIZZOLATTI, M.G.; ZAMPRONIO, A.R.; OTUKI, M.F. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, in press, 2009.

BONACUCINA, G; MARTELLI, S; PALMIERI, G.F. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents. **International Journal of Pharmaceutics.** V.282, p. 115–130. 2004.

BOOCK, K. P. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões contendo cristais líquidos e ativos hidratantes à base de manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) ou cacau (*Theobroma cacao*).** 2007. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

BOPP, S.K; LETTIERI, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. **BMC Pharmacology**. V. 8, n.8, p. 1-11. 2008.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D, ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.

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

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J. F.; COUARAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **J. Control. Release**, v. 60, n. 1, p. 67-76, 1999.

BRITTES, J; LÚCIO, M; NUNES, C; LIMA, J.L.F.C; REIS,S. Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. *Chemistry and Physics of Lipids*. v.163, p.747–754. 2010.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D.S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M.P.D.; FREITAS, O.; LARA, E.H.G. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: *In vitro* Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **J. Pharm. Sci.**, v. 96, p. 2074–2089, 2007.

CALIXTO, G.M.F. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo peptídeo análogo a adesina do *streptococcus mutans*. 2013.105p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.

CAMPANINI, M.Z; PINHO-RIBEIRO, F.A; IVAN, A.L.M; FERREIRA, V.S; VILELA, F.M.P; VICENTINI, F.T.M.C; MARTINEZ, R.M; ZARPELON, A.C; FONSECA, M.J.V; FARIA, T.J; BARACAT, M.M; VERRI JR., W.A; GEORGETTI, S.R; CASAGRANDE, R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.127, p.153–160. 2013.

CAMPANINI, M.Z;1 CUSTÓDIO, D.L.; IVAN, A.L.M; MARTINS,S.M.; PARANZINI, M.J.R.; MARTINEZ, R.M; 1 VERRI JR., W.A; 3 VICENTINI, F.T.M.C;ARAKAWA, N.S.; FARIA, T.J.; BARACAT, M.M; GEORGETTI, S.R; CASAGRANDE, R. Topical Formulations Containing *Pimenta pseudocaryophyllus* Extract: In Vitro Antioxidant Activity and In Vivo Efficacy Against UV-B-Induced Oxidative Stress. **AAPS PharmSciTech**. v. 15, n. 1, p. 86-94. 2014.

CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R.M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **II Farmaco**, Pavia, v.55, p. 526-534, 2000.

CARVALHO, F. C *et al.* Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant-containing systems designed as a potential platform for topical drug delivery. **Journal of biomedical nanotechnology.**, v. 8, n. 2, 2012.

CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina.** 2009. 143p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.

CARVALHO, F. C. **Sistemas nanoestruturados mucoadesivos para administração nasal de zidovudina.** 2012. 163p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A. Jr.; DORTA, D. J.; SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 21-27, 2006.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI-JR, W.A.; DORTA, D.J.; SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne v.84, p.21-27, 2006.

CASTRO, R.; LAMAS, J.; MORAIS, P.; SANMARTÍN, M.L.; ORALLO, F.; LEIRO, J. Resveratrol modulates innate and inflammatory responses in fish leucocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**.v.126, p. 9–19. 2008.

CHANG, N.; FENG, R.; GAO, Z.; GAO W. Skin cancer incidence is highly associated with ultraviolet-B radiation history. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. V. 213, p. 359-368. 2010.

CHORILLI, M. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo.** 2007. 171p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R; SALGADO, H.R; SCARPA, M.V.Evaluation of preservative effectiveness of liquid crystalline systems with retinyl palmitate by the challenge test and D-value. **J. AOAC Int.**, v. 94, p. 118-127, 2011.

CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI G.R.; CHIAVACCI L.A.; SARMENTO V.H.V.; OLIVEIRA A.G.; SCARPA M.V. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.85, n.2, p.182–188. 2011.

CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluído de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Quím. Nova**, v. 32, n. 4, p. 1036-1040, 2009.

CHUNG, Y.; CHEN, S.; HSU, C.; CHANG, C.; CHOU, S. Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. **Food Chem.** v.91, n.3, p.419-423. 2005.

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

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.

DONOLATO, C.A.; GOMES, A.L.; DIAS, T.C.S. Silicones em soluções inovadoras para os cuidados com a pele. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 15, 2001, São Paulo – SP. **Anais.** São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia. p.1-9. 2001.

FARRIS,P.K. Innovative Cosmeceuticals: Sirtuin Activators and Anti-Glycation Compounds. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery.* V.30, n.3, p.163-166. 2011.

FEIGENSON, G. W.; BUBOLTZ, J. Ternary Phase Diagram of Dipalmitoyl-PC/Dilauroyl-PC/Cholesterol: Nanoscopic Domain Formation Driven by Cholesterol. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 6, 2001.

FERNÁNDEZ-MAR, M.I.; MATEOS, R.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; PUERTAS, P.; CANTOS-VILLAR, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. **Food Chemistry.** V.130, n.4, p.797-813. 2012.

FERRARI, C.; SILVEIRA, F.R.X.; BELTRAMI-JUNIOR, L.M. **Uso de cristais líquidos em cosméticos.** 2004. 94p. Monografia (Especialização). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2004.

FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleo de andiroba e copaíba.** 1998. 147p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

FILIP, G.A.; POSTESCU, I.D.; BOLFA, P.; CATOI, C.; MURESAN, A; CLICHICI, S. Inhibition of UVB-induced skin phototoxicity by a grape seed extract as modulator of nitrosative stress, ERK/NF-kB signaling pathway and apoptosis, in SKH-1 mice. **Food and Chemical Toxicology.**V.57, p.296–306. 2013.

- FONTES, I.J.G. **Antioxidantes como substâncias cosmetologicamente ativas**. 2013. 42p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.
- FONSECA, Y.M; CATINIA, C.D; VICENTINIA, F.T.M.C; NOMIZO, A; GERLACH, R.F; FONSECA, M.J.V. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology*. v.127, n.3, p. 596–601. 2010.
- FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.
- FRANCO, R; SÁNCHEZ-OLEA, R; REYES-REYES, E.M; PANAYIOTIDIS M.I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutation Research**. v.674, p.3-22. 2009.
- FRESNO, M. J. C. *et al.* Systematic study of the flow behaviour and mechanical properties of Carbopol® (R) Ultrez (TM) 10 hydroalcoholic gels. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 54, p. 329–335, 2002.
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicit: A radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**.v.201, p. 1203-1209. 1998
- FUCHS, J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol-L-ascorbic L-ascorbic acid and b-carotene in cutaneous photoprotection.**Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 7, p. 848-873, 1998.
- FUCHS, J.; ZOLLNER, T.M.; KAUFMANN, R.; PODDA, M. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. **Free Radic. Biol. Med.** v.30, n. 4, p. 337–353. 2001.
- FULDA S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of câncer. **Drug Discov. Today**. v.15, p.757–765. 2010.
- GAO, Q.; ZHANG, L. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient vtc1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**. v.165, p.138-148. 2008.
- GIACOMONI, P.U. Advancement in skin aging: the future cosmeceuticals. **Clin Dermatol**. v.26, p.364–6. 2008.
- GOD, J.M., TATE, P., LARCOM, L.L. Anticancer effects of four varieties of muscadine grape. **J. Med. Food**.v.10, n.1, p.54–59. 2007.
- 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.** 2010; 25: 471–477.

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.

GUTTERIDGE, J.M; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 899, p. 136–47, 2000.

HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation Research**, v. 571, p. 107-120, 2005.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 46, p. 9 531–542, 2009.

HATFIELD, L.A.; HOFFBECK, R.W.; ALEXANDER, B.H.; CARLIN BP. Spatiotemporal and spatial threshold models for relating UV exposures and skin cancer in the central United States. **Computational Statistics and Data Analysis**. V.53, p.3001-3015. 2009.

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.

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

HOLMQVIST, P. *et al.* Modification of the Microstructure in Poloxamer Block Copolymer-Water-Oil Systems by Varying the Oil Type. **Macromolecules**. v. 30, p. 6788-6797, 1997.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, Revisão, 2008.

HUSSEIN, M.A. A Convenient Mechanism for the Free Radical Scavenging Activity of Resveratrol. **International Journal of Phytomedicine**. v.3, n.4, p. 459-469. 2011.

HYDE, S.T. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap. 16. p. 299-332.

ICHIHASHI, M.; ANDO, H.; YOSHIDA, M.; NIKI, Y.; MATSUI, M. Photoaging of the skin. **Anti-Aging Medicine**. V.6, n.6, p. 46-59. 2009.

INCA. 2012. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma>.

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

ISAAC, V. L. B. *et al.* Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.

IVAN, A. L. M. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e do efeito anti-inflamatório e antioxidante do ditiocarbamato de pirrolidina no estresse oxidativo induzido por radiação UVB em camundongos sem pelo. 2013. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

IVAN, A.L.; CAMPANINI, M.Z.; MARTINEZ, R.M.; FERREIRA, V.S.; STEFFEN, V. S.; VICENTINI, F.T.; VILELA, F.M.; MARTINS, F. S.; ZARPELON, A.C.; CUNHA, T. M.; FONSECA, M.J.; BARACAT, M.M.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A. JR.; CASAGRANDE, R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 124-133, 2014.

JANTSCHKO, W.; FORTMULLER, P.G.; ZEDERBAUER, M.; NEUGSCHWANDTER, K.; LEHNER, I.; JAKOPITSCH, C.; ARNHOLD, J.; OBINGER, C. Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design, **Biochem. Pharmacol.** V.69, n. 8, p.1149–1157. 2005.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mech. Age. Dev.** v.123, n. 7, p.801–810. 2002.

JENSEN, S.J.K. Oxidative stress and free radicals. **J. Mol. Struct.**, v. 666–667, p.387–92, 2003.

JONES, D. S. *et al.* Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and Carbopol® 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, p. 49-58, 2009.

JUNG, K., WALLIG, M., SINGLETARY, K. Purple grape juice inhibits 7,12-dimethylbenz-[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and *in vivo* DMBA-DNA adduct formation. **CancerLett.** v.233, n.2, p.279–288. 2006.

KAKKAR, P; DAS, B; VISWANATHAN, P.N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **Indian J Biochem Biophys.** v.2, n.2, p.130-132. 1984.

KALRA, N; ROY, P; PRASAD, S; SHUKLA, Y. Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis. **Life Sciences**. v.82, p.348–358. 2008.

KAMBAYASHI, H. ODAKE, Y. TAKADA, K. FUNASAKA, Y. ICHIHASHI, M. Involvement of changes in stratum corneum keratin in wrinkle formation by chronic ultraviolet irradiation in hairless mice. **Exp. Dermatol.**, v.12, n.2, p.22-27, 2003.

KAPILA, M.; AGRAWAL, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing Indu P. Kaur. **Ageing Research Reviews**. v.6, p. 271–288. 2007.

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. n 1.p 71-76. 2008.

KATIYAR, S.K; CHALLA, A; MCCORMICK, T.S; COOPER, K.D; MUKHTAR, H. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. **Carcinogenesis**. v.20, n.11, p.2117–2124. 1999;

KAUR, I.P; KAPILA, M; AGRAWAL, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. **Ageing Research Reviews**. V.6, n.4,p.271–288. 2007.

KHONDKAR, D.; TESTER, R. F.; HUDSON, N.; KARKALAS, J.; MORROW, J. Rheological behaviour of uncross-linked and cross-linked gelatinized waxy maize starch with pectin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1296–1301, 2007.

KING, R.E; KENT, K.D; BOMSER, J.A. Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. **Chem. Biol. Interact**. v.151, p.143–149. 2005.

KLIGMAN, L.H. The hairless mouse. Model for photoaging. **J Clin Dermatol**. V.14, p.183–95. 1996.

KOFFI, A.A.; AGNELY, F.; PONCHEL, G.; GROSSIORD, J.L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 27, p. 328-335, 2006.

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, pag. 253–259, 2009.

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

LAGOUGE, M; ARGMANN, C; GERHART-HINES, Z; MEZIANE, H; LERIN, C; DAUSSIN, F; MESSADEQ, N; MILNE, J; LAMBERT.,P; ELLIOTT, P; GENY, B; LAAKSO, M; PUIGSERVER; P; AUWERX, J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**. v.127, p.1109-1122. 2006.

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.

LAWRENCE, M.J.; REES, D.G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 45, p.89-121, 2000.

LI, C; LIU,C; LIU,J; FANG, L. Correlation Between Rheological Properties, In Vitro Release, and Percutaneous Permeation of Tetrahydropalmatine. **AAPS PharmSciTech**. V. 12, n.3, p. 1002-1009. 2011.

LI, T; FAN, G.X; WANG, W; LI, T; YUAN, Y.K. Resveratrol induces apoptosis, influences IL-6 and exerts immunomodulatory effect on mouse lymphocytic leukemia both in vitro and in vivo. **International Immunopharmacology**. v.7, p.1221–1231. 2007.

LIMA, E.S; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.37, n. 3, p. 293-303. 2001

LOWRY, O.H.; ROSE BROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, p. 265-275, 1951.

LU, Z.; CHENG, B.; HU, Y.; ZHANG, Y.; ZOU, G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: solubility and antioxidant activity. **Food Chem**. v.113, p.17–20. 2009.

LUCAS-ABELLÁN, C.; FORTEA, I.; LÓPEZ-NICOLÁS, J.M.; NUNEZ-DELICADO, E. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. **Food Chem**. v.104, p. 39–44. 2007.

LYRA, M. A. M *et al.* Sistemas Matriciais Hidrofilicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 26, n.5, p. 784-93, 2007.

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.

MAKAI, M.; CSÁNYI, E.; NÉMETH, Z.; PÁLINKÁS, J.; ERŐS, I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. **Int. J. Pharm.**, v. 256, p. 95–107, 2003.

- MALACHIAS, V.A.T. Estresse oxidativo induzido pela irradiação aguda por UVB na pele de camundongos swiss. 2008. 68p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.
- MARTÍN, A.R.; VILLEGAS, I.; LA CASA, C.; DE LA LASTRA, C.A. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. **Biochemical Pharmacology**. v.67, n. 7, p. 1399–1410. 2004.
- MARTINDALE, J.L.; HOLBROOK, N.J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **J. Cell. Physiol.**, v. 192, p. 1–15, 2002.
- MAZZARINO, L. Desenvolvimento e Caracterização Farmacotécnica de Formas Farmacêuticas Semi-Sólidas Contendo Nimesulida. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 415-419, 2007.
- MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C; DAVIES, M.J; GOPINATHAN, V; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*. v.84, p.407–412. 1993.
- MISHRA, R. N. Resveratrol -The New Rasayan (Anti-aging) Drug. **Current Research in Medicine and Medical Sciences**, v. 1, n. 1, pag. 5-18, 2011.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.5, n.1, p.561-573, 2006.
- MITTAL, A., ELMETS, C.A., KATIYAR, S.K. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation. **Carcinogenesis**.v.24, n.8, p.1379–1388. 2003.
- MONESTIER S, GAUDY C, GOVERNET J, RICHARD MA, GROB JJ : Multiple senile lentigos of the face, a skin ageing pattern resulting from a life excess of intermittent sun exposure in dark-skinned caucasians: a case-control study. **Br J Dermatol**. V.154, p.438-444. 2006.
- MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **An Bras Dermatol**. v.84, n.3, p.263-269. 2009.
- MORAGAS, A.; GARCIA-BONAFE, M.; SANS, M.; TORAN, N.; HUGUET, P.; MARTINPLATA, C. Image analysis of dermal collagen changes during skin aging. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v.20, n.6, p.493-499, 1998.
- MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 158p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- MORIWAKI, S.; TAKAHASHI, Y. Photoaging and DNA repair. *J Dermatol Sci*. v.50, n.3, p.169–76. 2008.

MORON, M. S.; DEPIERRE, J. W.; MANNERVIK, B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione s-transferase activities in rat lung and liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 582, p. 67-78, 1979.

MULLER-GOYMANN, C. C.; FRANK, S. G. Interaction of lidocaine and lidocaine-HCl with the liquid crystal structure of topical preparations. **Int. J. Pharm.**, v. 29, n. 2-3, p. 147-159, 1986.

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.164-170. 2011.

NEMEN D. **Sistemas Nanoestruturados Lipídicos contendo Resveratrol: Preparação, Caracterização e Avaliação da Penetração Cutânea**. 2010. 153p. Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

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, pag. 408-413, 2011.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 3, 408-413, 2011.

NEVES, J.; SILVA, M.V.; GONÇALVES, M.P.; AMARAL, M.H.; BAHIA, M.F. Rheological Properties of Vaginal Hydrophilic Polymer Gels. **Current Drug Delivery**, v. 6, p. 83-92, 2009.

NKENGNE, A; BERTIN, C. Aging and facial changes-documenting clinical signs, part 1: clinical changes of the aging face. **Skinmed**. V.10, n.5, p.284-289. 2012.

NOTAS, G; NIFLI, A.P; KAMPA, M; VERCAUTEREN, J; KOUROUMALIS, E; CASTANAS, E. Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells, by inducing cell cycle arrest, and NOS activation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1760, p.1657–1666. 2006.

ONOUE, S.; KOBAYASHI, T.; TAKEMOTO, Y.; SASAKI, I.; SHINKAI, H. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. **Journal of Dermatological Science**, Tokyo, v. 33, p. 105-111, 2003.

ORIÁ, R.B.; SANTANA, E.N.; FERNANDES, M.R.; FERREIRA, F.V.A.; BRITO, G.A. C. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histomorfometria e autofluorescência. **An. Bras. Dermatol.** v.78, n.4, p.425-434, 2003.

OTTO, A.; PLESSIS, J. D.; WIECHERS, J. W. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. **Int J Cosmet Sci**, v.31, p. 1–19, 2009.

OYAFUSO, M.H. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas micro e nanoestruturados para a administração cutânea de acetato de dexametasona**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista —“Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

PACE-ASCIAC, 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, pag. 207–219, 1995.

PESTANA, K. C. *et al.* Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, p. 253-259, 2008.

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PIOTROWSKA,H; KUCINSKA,M; MURIAS,M. Review: Biological activity of piceatannol: LEAVING THE SHADOW OF RESVERATROL. MUTATION RESEARCH. V.750, P.60–82. 2012.

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.

Promega. 2013.

Disponível em: <<http://www.promega.com.br/>>

Acesso em: junho 2013.

RAUT, S.; BHADORIYA, S.S.; UPLANCHIWAR, V.; MISHRA, V.; GAHANEY, A.; JAIN, S.K. Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v.2, n.1, p.8–15. 2012.

REAGAN-SHAW S, AFAQ F, AZIZ MH, AHMAD N. Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin. **ONCOGENE**. V.23, n.30, p.5151-5160. 2004.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

RIBBONS, K.A.; THOMPSON, J.H.; LIU, X.; PENNLINE, K.; CLARK, D.A.; MILLER, M.J.S. Anti-inflammatory properties of interleukin-10 administration in hapten-induced colitis, **Eur. J. Pharmacol.** v.323, p.245–254. 1997.

RIGON, R.B. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas para administração cutânea do Trans-resveratrol**. 2013. 156p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista —“Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.

RIUS, C.; ABU-TAHA, M.; HERMENEGILDO, C.; PIQUERAS, L.; CERDANICOLAS, J.M.; ISSEKUTZ, A.C.; ESTAÑ, L.; CORTIJO, J.; MORCILLO, E.J.; ORALLO, F.; SANZ, M.J. Trans- but not cis-resveratrol impairs angiotensin-II-mediated vascular inflammation through inhibition of NF-κB activation and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma upregulation. **J. Immunol.** v.185, n. 6, p. 3718–3727. 2010.

RIUS, C.; ABU-TAHA, M.; HERMENEGILDO, C.; PIQUERAS, L.; CERDANICOLAS, J.M.; ISSEKUTZ, A.C.; ESTAÑ, L.; CORTIJO, J.; MORCILLO, E.J.; ORALLO, F.; SANZ, M.J. Trans- but not cis-resveratrol impairs angiotensin-II-mediated vascular inflammation through inhibition of NF-κB activation and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma upregulation. **J. Immunol.** v.185, n. 6, p. 3718–3727. 2010.

ROCHA, K.K.R.; SOUZA, G.A.; EBAID, G.X.; SEIVA, F.R.F.; CATANEO, A.C.; NOVELLI, E.L.B. Resveratrol toxicity: Effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. **Food and Chemical Toxicology.** v.47, p.1362–1367. 2009.

ROCHA, L.A. **Materiais meso-estruturados luminescentes**. 2010. 161 p. em Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química (Araraquara - Brasil); Université Paul Sabatier (França), 2010.

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.

ROSSETTI, F. C. **Nanodispersões de cristal líquido como sistema de liberação de fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação *in vitro* e *in vivo* da permeação e retenção cutâneas**. 2010. 133p. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

ROVER, L. J.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova.**v. 24, n. 1, p. 112-119. 2001.

RUETZE, M.; DUNCKELMANN, K.; SCHADE, A; REUSCHLEIN, K.; MIELKE, H.; WEISE, J.M.; GALLINAT, S.; WENCK, H.; KNOTT, A. Damage at the root of cell renewal—UV sensitivity of human epidermal stem cells. **Journal of Dermatological Science.** v.64, n.1p.16-22. 2011.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chem.** v.89, n.4, p.569-574. 2005.

SAMS, R.L.; COUCH, L.H.; MILLER, B.J.; OKERBERG, C.V.; WARBRITTON, A.R.; WAMER, W.G.; BEER, J.Z.; HOWARD, P.C. Effects of a- and b-hydroxy acids on the edematous response induced in female SKH-1 mice by simulated solar light. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.184, n. 3, p.136–143. 2002.

SANTORO, M.I.R.M.; SILVA, F.C.F.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Stability analysis of emulsions containing UV and IR filters. **Cosmet. Toiletries**, v.115, n.12, p.55-60, 2000.

SARAF, S; KAUR, C.D. Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetic formulations. **Pharmacogn Rev.** v.4, n.7, p.1-11. 2010.

SAVIC, S. *et al.* An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: The influence of colloidal structure on emulsions skin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 358, p. 182-191, 2011.

SCHRAMM, G. Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos. 2 ed. São Paulo: Artliber, 2006.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 10, p. 308–13, 2004.

SENYIGIT, T.; TEKMEK, I.; SONMEZ, U.; SANTI, P.; OZER, O. Deoxycholate hydrogels of betamethasone-17-valerate intended for topical use: In vitro and in vivo evaluation. **Int. J. Pharm.**, v.403, p.123-129, 2011.

SHAH, H.; MAHAJAN, S.R. Photoaging: New insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. **Biomedicine & Aging Pathology.** V. 3, p.161–169. 2013.

SHI, G.; RAO, L.; YU, H.; XIANG, H.; YANG, H.; JI, R. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. **International Journal of Pharmaceutics.** v.349, p. 83–93. 2008.

SHI, J., YU, J., POHORLY, J., KAKUDA, Y. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. **J. Med. Food** 6, 291–299. 2003.

SHI, L; ZHAOB, M; ZHENG, L. Lyotropic liquid crystalline phases formed in ternary mixtures of N-alkyl-N-methylpyrrolidinium bromide/1-decanol/water. **RSC Advances.** V.2, p.11922–11929. 2012.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, 1993.

- SILVA, H.R. **Sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencial ativo contra dermatomicoses**. 2011. 188p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2011.
- SILVA, M.Z.C. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de *Pimenta Pseudocaryophyllus*: Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e da eficácia antiinflamatória e antioxidante *in vivo***. 2013. 133p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.
- SKOBOWIAT, C.; DOWDY, J. C.; SAYRE, R. M.; TUCKEY, R.C.; SLOMINSKI, A. Cutaneous hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis homologue - regulation by ultraviolet radiation. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.301, n.3, p.484-493. 2011
- SMART, J. D. *et al.* The retention of C-labelled poly(acrylic acids) on gastric and oesophageal mucosa: an *in vitro* study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 6, p. 83-90, 2003.
- SMART, J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv. Drug Del. Rev.**,v. 57, p. 1556-1568, 2005.
- SRINIVASAN, P.; SABITHA, K. E.; SHYAMALADEVI, C. S. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. **Life Sciences**, v. 80, p. 1080-1086, 2007.
- TAKTAK, Y.S.; LEE, M. A solid phase enzyme immunoassay for serum amyloid A (SAA) protein. Clinical Evaluation. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 136, p. 11-16, 1991.
- TAN, Y.T.F.; PEH, K.K.; AL-HANBALI, O. Effect of Carbopol and Polyvinylpyrrolidone on the Mechanical, Rheological, and Release Properties of Bioadhesive Polyethylene Glycol Gels. **AAPS.PHARMSC.**, v.1(3), p.69-78, 2000.
- TENG, L.Y.; CHIN, N.L.; YUSOF, Y.A. Rheological and textural studies of fresh and freeze-thawed native sago starch sugar gels. I. Optimization using response surface methodology. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1530-1537, 2011.
- TESKAC, K.; KRISTL, J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. **Int. J. Pharm.** v.390, p.61–69. 2010.
- TIVERON, A.P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 90p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- TRELLES, M.A.; RIGAU, J.; MELLOR, T.K.; GARCIA, L. A clinical and histological comparison of flashscanning versus pulsed technology in carbon dioxide laser facial skin resurfacing. **Dermatol. Surg.**, v.24, n.1, p.43-49, 1998.

- URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona.** 2004. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista —Juliano Mesquita Filho”, Araraquara, 2004.
- VACA, C.E., WILHEM, J., HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mut. Res.**,v.195, n.2, p.137-149.1988.
- 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, pag. e19881, 2011.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, p. 1323–38, 2007.
- VAYALIL, P.K., MITTAL, A., KATIYAR, S.K. Proanthocyanidins from grape seeds inhibit expression of matrix metalloproteinases in human prostate carcinoma cells, which is associated with the inhibition of activation of MAPK and NF-κB. **Carcinogenesis**.v.25, n.6, p. 987–995. 2004.
- VELASCO, M.V.R.; STEINER, D.; RIBEIRO, M.E.; OKUBO, F.R.; BEDIN, V. Rejuvenescimento da pele por peeling químico: enfoque no peeling de fenol. **An. Bras. Dermatol.**, v.79, n.1, p.91-99, 2004.
- VENDITTI, E.; BRUGE, F.; ASTOLFI, P.; KOCHEVAR, I.; DAMIANI, E. Nitroxides and a nitroxide-based UV filter have the potential to photoprotect UVA-irradiated human skin fibroblasts against oxidative damage Elisabetta. **Journal of Dermatological Science**. V.63, n.1, p.55-61. 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.
- VERRI, W.A.JR.; GUERRERO, A.T.; FUKADA, S.Y.; VALERIO, D.A. CUNHA, T.M.; XU, D.; FERREIRA, S.H.; LIEW, F.Y.; CUNHA, F.Q. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, Washington, v. 105, p. 2723-2728, 2008.
- VICENTINI, F.T; SIMI, T.R; DEL CIAMPO, J.O; WOLGA, N.O; PITOL, D.L; IYOMASA, M.M; BENTLEY, M.V; FONSECA, M.J. Quercetin in w/o microemulsion: in vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **Eur J Pharm Biopharm.** v.69, n.3, p.948-57. 2008.

VIGNOLI, J.A; ASSOLI, D.G; BENASSI, M.T. Atividade antioxidante de cafés torrado e solúvel: padronização e validação de métodos. **Coffee Science**. v. 7, n. 1, p. 68-75. 2012.

VOLKMER, B.; GREINERT, R. UV and Children's skin. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**. v.107, p.386-388. 2011.

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

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. 1377-1382. 2004.

WEISS, E.; MAMELAK, A.J.; LA MORGIA, S.; WANG, B.; FELICIANI, C.; TULLI, A.; SAUDER, D.N. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases, **J. Am. Acad. Dermatol**. v.50, p.657–675. 2004.

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, pag. 112–115, 2012.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab. Invest**. v.80, n.5, p. 617–653. 2000.

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, pag. 129-135, 2012.

YARIV, D.; EFRAT, R.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. *In vitro* permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, p. 185–192, 2010.

ZAMIN, L.L; DILLENBURG-PILLA, P; ARGENTA-COMIRAN, R; HORN, A.P; SIMÃO, F; NASSIF, M; GERHARDT, D; FROZZA, R.L; SALBEGO, C. Protective effect of resveratrol against oxygen–glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. **Neurobiology of Disease**. v.24, p.170–182. 2006.

ZHANG, J.; DONG, B.; ZHENG, L.; LI, N.; LI, X. Lyotropic liquid crystalline phases formed in ternary mixtures of 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide/*p*-xylene/water: A SAXS, POM, and rheology study. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.321, p.159–165. 2008.

Referências

ZHANG, J; MI, Q; SHEN, M. Resveratrol binding to collagen and its biological implication. **Food Chemistry** . v.131, p. 879–884. 2012.

ZUSSMAN, J.; AHDOUT, J.; KIM, J. Vitamins and photoaging: Do scientific data support their use? **J Am Acad Dermatol**. v.63, p.507-25. 2010.