



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015022706-0 A2

(22) Data do Depósito: 11/09/2015

(43) Data da Publicação: 21/03/2017



(54) **Título:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA MESMA

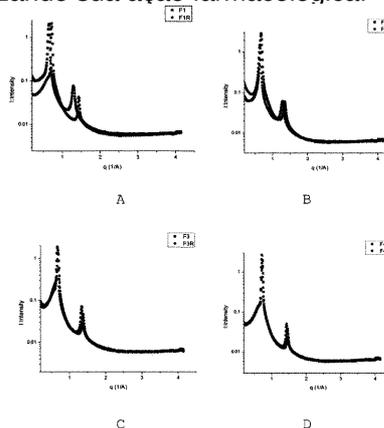
(51) **Int. Cl.:** A61K 31/05; A61K 47/34; A61K 8/34; A61P 17/00

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** ANDRESSA TERUMI FUJIMURA; RUBIA CASAGRANDE; RENATA MICHELI MARTINEZ; MARLUS CHORILLI

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA MESMA. A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um sistema líquido-cristalino (SLC) incorporando o trans-resveratrol (RES) e uso da mesma para tratamento de desordens cutâneas, preferencialmente, fotoenvelhecimento cutâneo. Uma vez que o RES apresenta baixa solubilidade em água, propõe-se um sistema de liberação líquido-cristalino para sua administração tópica, otimizando sua ação farmacológica.



COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA MESMACAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo de aplicação da Química, Farmácia, Medicina e, mais especificamente, nas áreas de nanotecnologia e preparações para finalidades médicas uma vez que se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um sistema líquido-cristalino incorporando o trans-resveratrol e uso da mesma para tratamento de desordens cutâneas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] 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 (200-280 nm), sendo que esta última é absorvida pela camada de ozônio da atmosfera da Terra e, portanto, o seu papel na patogênese humana é mínimo. 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.

[003] Os efeitos da energia solar sobre a pele são determinados pela dose e duração da exposição aos raios UV, e pela área exposta e pré-disposição genética do indivíduo. Os efeitos nocivos dessa radiação sobre a pele podem ser

imediatos, como queimaduras e prurido, ou crônicos, como foto envelhecimento, hiperpigmentação e câncer de pele.

[004] 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. 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.

[005] 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 foto envelhecimento. 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 vaso relaxante.

[006] 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.

[007] 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 aquosas, dificultam sua eficiência terapêutica tópica, uma vez que possui baixa penetração na pele.

[008] 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 reintrodução de outros princípios ativos anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novas substâncias antes que sejam efetivamente lançadas no mercado ou utilizadas na terapêutica.

[009] 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.

[010] 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.

[011] 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.

[012] 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. Foi demonstrado que NLS contendo RES podem atravessar a membrana celular dos queratinócitos, aumentando o tempo de exposição das células a esta

substância. Na literatura, 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. Encapsulou-se RES em lipossomas e observaram aumento da estabilidade e da atividade antioxidante, permitindo também uma liberação sustentada desta substância.

[013] 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.

ESTADO DA TÉCNICA

[014] A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um sistema líquido-cristalino incorporando o trans-resveratrol (RES) e uso da mesma para tratamento de desordens cutâneas.

[015] O documento CN102614127, "Resveratrol nanoscale dispersoid and preparation method thereof", descreve a utilização de composições nano encapsuladas baseadas no resveratrol, sendo que a concentração deste composto no sistema é de 1 a 20% - diferindo da composição da presente invenção, que é de 0,1%, além de tratar-se de trans-resveratrol.

[016] O documento RU2009123421, "Method of applying trans-resveratrole nano-form for treatment and prevention of hormone-dependent proliferative processes,

including tumours”, descreve o uso de trans-resveratrol nano encapsulado com propriedades antiproliferativas em desordens hormonais - diferindo, portanto no tipo de utilização, tendo em vista que a presente invenção tem aplicação cutânea.

[017] O documento RU2010102983, “Pharmaceutical composition for transdermal application for increase of drug activity and decrease of side effects”, refere-se ao processo de nano encapsulamento em emulsão fosfolipídica de diversos princípios ativos, incluindo o resveratrol, em utilização dérmica - mas há diferenças quanto aos componentes da emulsão nano encapsulada em relação à presente invenção.

[018] Tratam-se, portanto de tecnologias diversas da presente invenção, constituintes do estado da técnica, mas que não prejudicam os requisitos de novidade e atividade inventiva.

Objetivos e vantagens da invenção

[019] A presente invenção tem por objetivo desenvolver uma composição farmacêutica compreendendo um sistema de liberação nanoestruturado para o trans-resveratrol (RES) que otimize a utilização desta substância ativa na terapia tópica antioxidante e no tratamento de desordens cutâneas decorrentes do estresse oxidativo.

[020] Uma vez que o RES apresenta baixa solubilidade em água, propõe-se um sistema de liberação líquido-cristalino para sua administração tópica, otimizando sua ação farmacológica. A utilização de sistemas líquido-cristalinos pode ser interessante 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.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[021] A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um sistema líquido-cristalino (SLC) incorporando o trans-resveratrol (RES) e uso da mesma para tratamento de desordens cutâneas. Foram desenvolvidos SLCs para incorporação do RES e os mesmos foram caracterizados 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.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[022] A Figura 1 mostra fotomicrografias das formulações obtidas por microscopia de luz polarizada - A: F1; B: F2; C: F3; D: F4.

[023] A Figura 2 mostra 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.

[024] A Figura 3 representa graficamente as 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.

[025] A Figura 4 representa graficamente a tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F1.

[026] A Figura 5 representa graficamente a Tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento

para formulação F2.

[027] A Figura 6 representa graficamente tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F3.

[028] A Figura 7 representa graficamente a tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F1 e F1 acrescida RES (F1R).

[029] A Figura 8 representa graficamente a tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F2 e F2 acrescida de RES (F2R).

[030] A Figura 9 representa graficamente a tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para formulação F3 e F3 acrescida de RES (F3R).

[031] A Figura 10 representa graficamente a variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F1.

[032] A Figura 11 representa graficamente a variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F2.

[033] A Figura 12 representa graficamente a variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F3.

[034] A Figura 13 representa graficamente a variação do módulo de armazenagem G' , módulo de perda G'' e viscosidade em função da frequência para formulação F4.

[035] A Figura 14 representa graficamente a 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).

[036] A Figura 15 representa graficamente a

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).

[037] A Figura 16 representa graficamente a 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).

[038] A Figura 17 representa graficamente a 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).

[039] A Figura 18 representa graficamente a 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.

[040] A Figura 19 representa graficamente a 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.

[041] A Figura 20 representa graficamente a 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.

[042] A Figura 21 representa graficamente a 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.

[043] A Figura 22 representa graficamente o perfil de liberação *in vitro* do RES na formulação FlR durante 24 horas de análise.

[044] A Figura 23 representa graficamente o perfil de liberação *in vitro* do RES incorporado em propilenoglicol durante 24 horas de análise.

[045] A Figura 24 representa graficamente o 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.

[046] A Figura 25 representa graficamente o sistema líquido-cristalino contendo RES na inibição da 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.

[047] A Figura 26 representa graficamente o 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.

[048] A Figura 27 representa graficamente o 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.

[049] A Figura 28 representa graficamente o 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.

[050] A Figura 29 representa graficamente o 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.

[051] A Figura 30 representa graficamente o 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.

[052] A Figura 31 representa graficamente o 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.

[053] A Figura 32 representa graficamente o 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.

[054] A Figura 33 representa graficamente o 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.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[055] A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um sistema líquido-cristalino (SLC) incorporando o trans-resveratrol (RES), conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Formulação da composição farmacêutica

Componentes	(%)
Poliéter funcional siloxano (Silicone DC [®] 5329)	55 - 70
Silicone fluido de copolímero glicol (Silicone DC [®] 193)	5 - 20
Água	15
Dispersão de polímero do ácido acrílico (Carbopol [®] 974)	10
Trans-resveratrol	0,1%

[056] Em uma modalidade preferida da presente invenção a composição farmacêutica desenvolvida compreende:

55% de Silicone DC[®] 5329 e 20% de Silicone DC[®] 193.

[057] A presente invenção também se refere ao uso da composição farmacêutica desenvolvida para tratamento de desordens cutâneas, preferencialmente, fotoenvelhecimento cutâneo.

Exemplo de concretização da invenção

[058] Os sistemas foram preparados por mistura direta dos componentes à temperatura ambiente compreendendo: o silicone DC[®] 193 como fase oleosa, o silicone DC[®] 5329 como tensoativo e a dispersão polimérica de Carbopol[®] 974 como fase aquosa. A incorporação de RES foi feita na fase oleosa. Incorporou-se 0,1% do fármaco no sistema, uma vez que a incorporação de maiores quantidades de fármaco ocasionava a alteração estrutural do sistema.

[059] Do sistema obtido, foram selecionadas quatro formulações para posterior análise estrutural. Para a seleção dessas formulações, utilizou-se como critério o fato de que 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 variaram-se as proporções de fase oleosa e tensoativo (Tabela 2).

Tabela 2: 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

Trans-resveratrol	0,1	0,1	0,1	0,1
-------------------	-----	-----	-----	-----

Análise estrutural dos sistemas

Microscopia de luz polarizada

[060] As fotomicrografias das amostras F1, F2, F3, F4 apresentadas na Figura 1, e F1R, F2R, F3R e F4R apresentadas na Figura 2, 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.

Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

[061] 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. 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 3 mostra as curvas de SAXS das formulações selecionadas acrescidas ou não de *trans-resveratrol*.

[062] Os valores de picos obtidos correspondentes à Figura 3 revelaram a presença de estrutura lamelar. É possível observar que a adição do *trans-resveratrol* não alterou a estrutura das formulações. A Tabela 3 representa os valores obtidos da razão entre as distâncias dos picos.

Tabela 3: Valores da razão entre as distâncias interplanares das formulações F1, F2, F3, F4 e F1R, F2R, F3R, F4R acrescidas de RES

Formulação	q _{max1}	q _{max2}	d ₁ /d ₂	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

[063] De acordo com os valores obtidos foi possível identificar qual a mesofase das estruturas líquido-cristalinas presentes (mesofase lamelar).

[064] Dessa forma, os resultados das medidas de SAXS, presentes na Figura 3 e Tabela 3, 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.

Determinação do comportamento reológico

Análise reológica de fluxo contínuo

[065] 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. 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.

[066] As Figuras 4, 5 e 6 demonstram a variação da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para as formulações F1, F2 e F3. Analisando-as 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 a 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.

[067] 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; $n=1$ 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. Os valores de n e k estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: 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

[068] Os valores de n dispostos na Tabela 4 ($n < 1$) 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 à medida que se aumentou a concentração de tensoativo.

[069] 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 "afinamento" 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.

[070] De acordo com os reogramas apresentados nas Figuras 4, 5 e 6 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 micro estruturação das redes líquido-cristalinas. 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. Nota-se que a formulação F1 (Figura 5) apresentou maior grau de tixotropia, ou seja, maior facilidade de recuperação da sua estrutura após cessar a velocidade de cisalhamento.

[071] As Figuras 7, 8 e 9 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.

[072] As curvas de fluxo apresentadas para as formulações com adição de fármaco (Figuras 7, 8 e 9) demonstraram que a presença do RES não alterou o comportamento não newtoniano, pseudoplástico e tixotrópico das formulações estudadas.

[073] Os parâmetros calculados com o ajuste da lei das potências aos reogramas de fluxo das formulações com adição de RES estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5: 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

[074] Os valores de n dispostos na Tabela 5 ($n < 1$) 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.

[075] 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.

Análise reológica oscilatória de varredura de frequência

[076] 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.

[077] A Figura 10 demonstra o reograma obtido por meio da análise reológica oscilatória da formulação F1. Neste 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.

[078] A Figura 11 demonstra o reograma obtido por meio da análise reológica oscilatória da formulação F2. Este 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 (Figura 10) após a frequência de 10 rad/s nota-se também a dependência de G' pela frequência.

[079] As Figuras 12 e 13 demonstram o reograma obtido por meio da análise reológica oscilatória das formulações F3 e F4, respectivamente. De acordo com os mesmos, 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 13) são maiores (aproximadamente duas vezes) do que o G' (módulo de armazenamento) no reograma da formulação F3 (Figura 12), sugerindo que F4 possui um sistema mais estruturado que F3.

[080] 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.

[081] 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%).

[082] As Figuras 14, 15, 16 e 17 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.

[083] O reograma apresentado na Figura 14 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 acrescida de RES (F1R), 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.

[084] Pode-se observar que no reograma apresentado na Figura 15 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.

[085] 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 coincidirem. 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.

[086] No reograma apresentado na Figura 17 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.

[087] 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, 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.

[088] Além disso, devido ao fato do módulo de armazenamento (G') ter se mantido maior que o módulo de perda (G'') nos reogramas apresentados nas Figuras 14, 15, 16 e 17, sugere-se que a fase lamelar deste sistema líquido cristalino em estudo se comporta como um "gel fraco".

Ensaio de perfil de textura (TPA)

[089] A análise do perfil de textura mostra as propriedades mecânicas das formulações, tais como: dureza, compressibilidade, adesividade e coesão. Os resultados estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6: 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 ± 0,003	0,019 ± 0,002	0,032 ± 0,01	0,069 ± 0,03
Compressibilidade (N.s)	0,229 ± 0,016	0,278 ± 0,01	0,411 ± 0,13	0,883 ± 0,42
Adesão (N.s)	0,007 ± 0,04	0,034 ± 0,015	0,151 ± 0,10	0,499 ± 0,25
Coesão	0,798 ± 0,02	0,822 ± 0,05	0,828 ± 0,02	0,835 ± 0,09

[090] Os dados da Tabela 6 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 6 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.

[091] A partir da análise estatística e com base nos dados apresentados na Tabela 6, 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.

[092] 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.

Ensaio de bioadesão in vitro

[093] 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 7.

Tabela 7: 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	0,02 \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

[094] Os dados na Tabela 7 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.

[095] A bioadesão dos sistemas líquido-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. 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.

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

[096] 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. 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 18, 19, 20 e 21 mostram os resultados desta avaliação.

[097] De acordo com as Figura 18 e 19, 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 consequentemente 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 (50 ug/ml e 100 ug/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.

[098] Nas Figuras 20 e 21 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. 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 (50 ug/ml e 100 ug/ml) apresentou viabilidade celular de 80%.

[099] De maneira geral, conforme demonstrado nas Figuras 18, 19, 20 e 21, 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%.

[100] 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. 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%.

[101] 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 sistemas.

Avaliação da Liberação do RES *in vitro*

[102] 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. A Figura 22 apresenta o ensaio de liberação da formulação F1 R.

[103] O resultado demonstrado na Figura 22 indicou que a liberação do fármaco se inicia somente após 14 horas de experimento e continua em escala crescente até o intervalo de 24 h. A liberação observada na Figura 22 durante as 24 horas, corresponde a 0,54% da taxa de liberação do RES incorporado na formulação F1 R.

[104] 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. Os parâmetros calculados para os modelos matemáticos aplicados aos dados de liberação do RES são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. 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

[105] 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 1) deve ser aplicada aos dados dos primeiros 63,2% de

liberação do fármaco e expressa a quantidade acumulada de fármaco em função do tempo.

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

[106] 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.

[107] 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.

[108] 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 na literatura, 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 e podem 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. Uma possível causa para a pequena liberação do RES na formulação F1 R pode estar 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) (Figura 23).

[109] A partir da Figura 23, é interessante notar a elevada liberação do RES quando disperso ao propilenoglicol (80,2%). 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.

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

[110] O ensaio de permeação cutânea analisa 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.

[111] 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 9 demonstra os dados do ensaio de retenção cutânea.

Tabela 9: Quantidade de RES retido na pele após 24h de experimento na formulação F1 R.

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

[112] Realizou-se também um ensaio de permeação e retenção cutânea utilizando o RES incorporado em PG como controle. A Tabela 10 demonstra os resultados obtidos neste experimento.

Tabela 10: 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

[113] A Tabela 10 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 23, visto que os 80,02% liberado da matriz permeou e reteve na pele. Tal resultado está de acordo com a literatura, demonstrando que a estrutura do sistema pode interferir na liberação do fármaco e conseqüentemente na permeação do mesmo.

Avaliação da eficácia *in vivo* do RES

[114] 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.

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

Avaliação do edema cutâneo

[115] 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 24 demonstra os resultados obtidos nesta análise.

[116] 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.

[117] De acordo com a Figura 24 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.

[118] 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.

Avaliação da atividade de MPO

[119] Analisou-se a atividade de MPO à resposta inflamatória após irradiação UVB e os resultados obtidos são mostrados na Figura 25.

[120] 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 lipídeos formando oxidantes de longa duração que estão envolvidos em processos de carcinogênese, aterosclerose e insuficiência renal crônica.

[121] Na Figura 25 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.

Avaliação da inibição de secreção/atividade da MMP-9

[122] 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 os 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.

[123] 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 26).

[124] 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 relacionadas com a degradação do colágeno e componente da rede de fibras elásticas.

[125] De acordo com a Figura 26, 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.

Avaliação da produção de IL-10

[126] 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 27 demonstra os resultados obtidos neste ensaio.

[127] Dentre as citocinas avaliadas apenas a IL-10 demonstrou modificações após o tratamento dos animais com o sistema líquido cristalino contendo RES (Figura 27). 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.

[128] 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.

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

Dosagem do antioxidante glutathiona reduzida (GSH) e

catalase (CAT)

[129] Realizou-se a dosagem de GSH e CAT a fim de avaliar a capacidade antioxidante da pele tratada com RES após irradiação UVB (Figuras 28 e 29).

[130] Após análise estatística e observação das Figuras 28 e 29 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.

Ensaio FRAP e ABTS

[131] A capacidade antioxidante da pele após irradiação UVB foi medida por meio dos ensaios FRAP e ABTS. As Figuras 30 e 31 demonstram os resultados obtidos em ambos os ensaios.

[132] 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.

[133] A atividade antioxidante do RES está associada à sua capacidade de transferência de um átomo de hidrogênio ou um elétron e à possibilidade de suas interações com outro antioxidante. 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.

[134] Portanto, de acordo com os resultados demonstrados nas Figuras 30 e 31, a formulação tópica contendo o fármaco demonstrou claramente a sua capacidade antioxidante.

Determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

[135] 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 32). 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.

[136] Observando-se a Figura 32, 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.

[137] 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 $\text{NO}\cdot$.

Produção do ânion superóxido

[138] 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. A Figura 33 demonstra a capacidade sequestradora do radical ânion superóxido pelo método NBT após irradiação UVB.

[139] Observou-se que na Figura 33 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.

[140] 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.

[141] 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.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** por compreender um sistema líquido-cristalino (SLC) incorporando o trans-resveratrol (RES), contendo: 55-70% de poliéter funcional siloxano, 5-20% de silicone fluido de copolímero glicol, 15% de água, 10% de dispersão de polímero do ácido acrílico e 0,1% de trans-resveratrol.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** por compreender, preferencialmente, 55% de poliéter funcional siloxano e 20% de silicone fluido de copolímero glicol.

3. Uso da composição farmacêutica, conforme descrita nas reivindicações 1 e 2, **CARACTERIZADA** por ser para o tratamento de desordens cutâneas, preferencialmente, fotoenvelhecimento cutâneo.

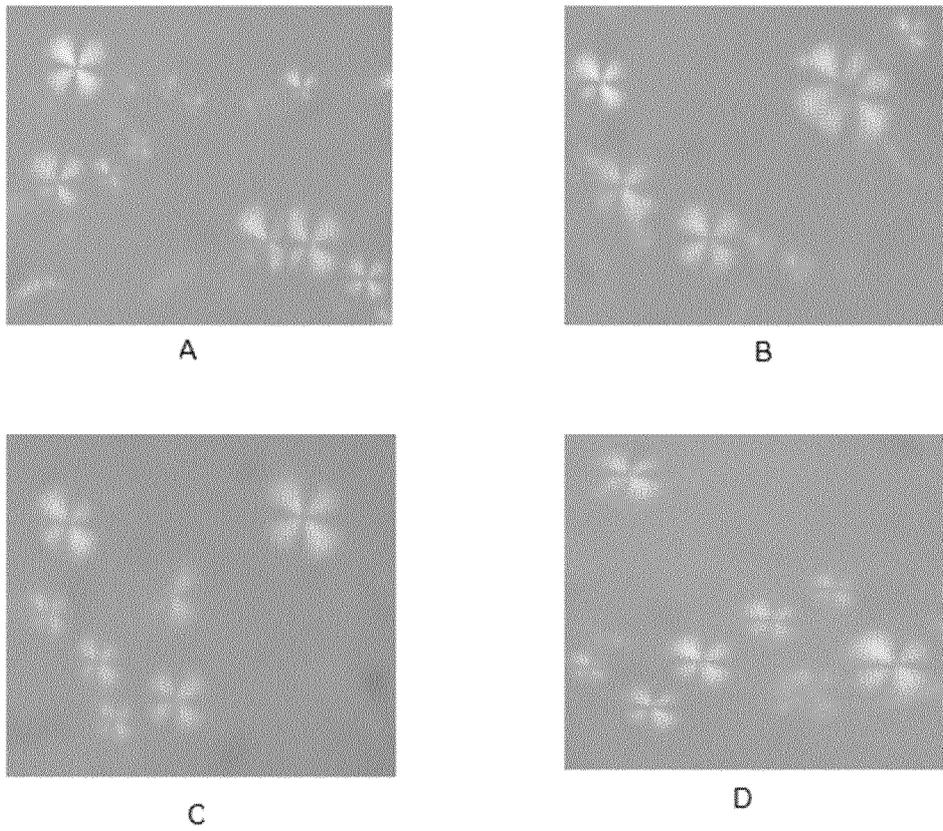
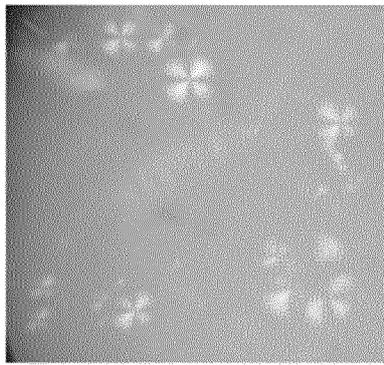
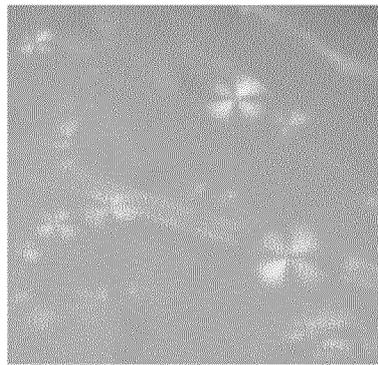


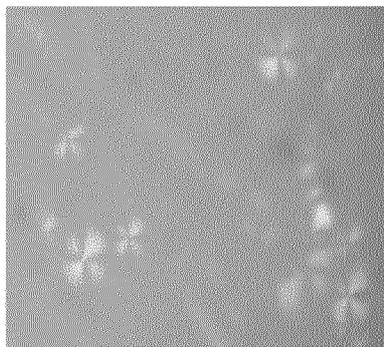
Figura 1



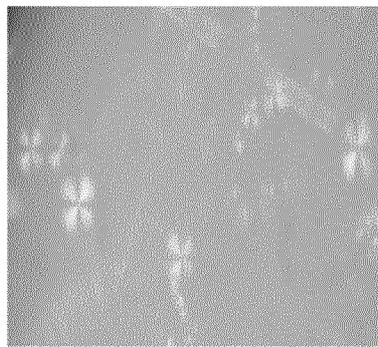
A



B



C



D

Figura 2

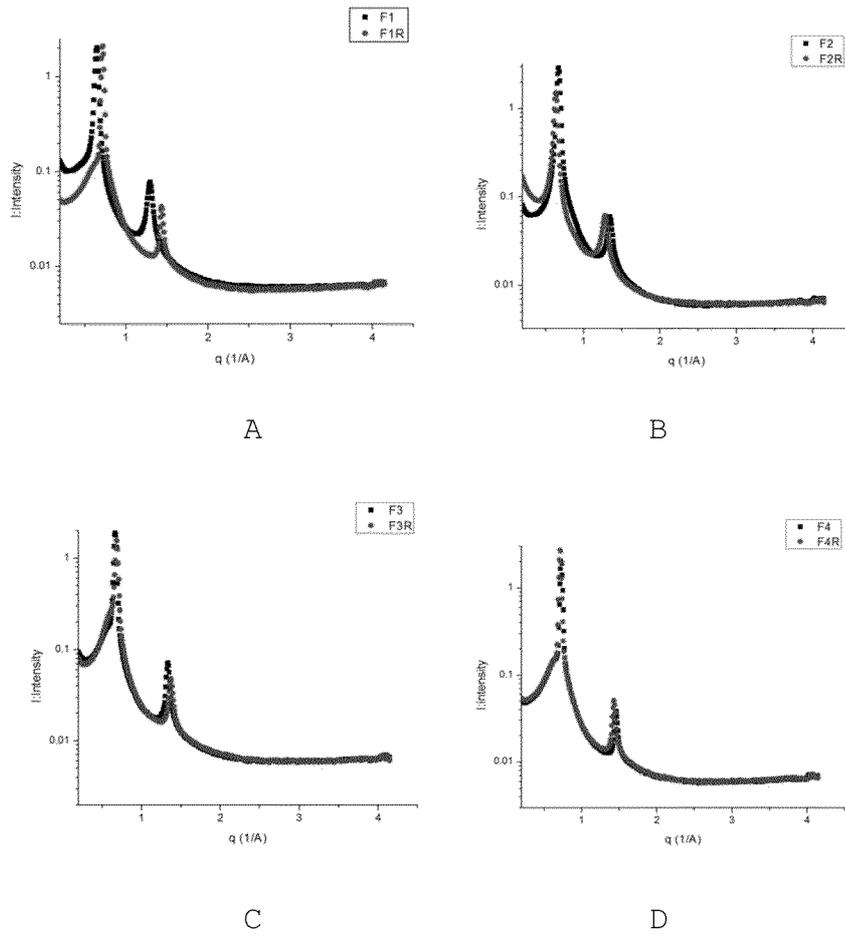


Figura 3

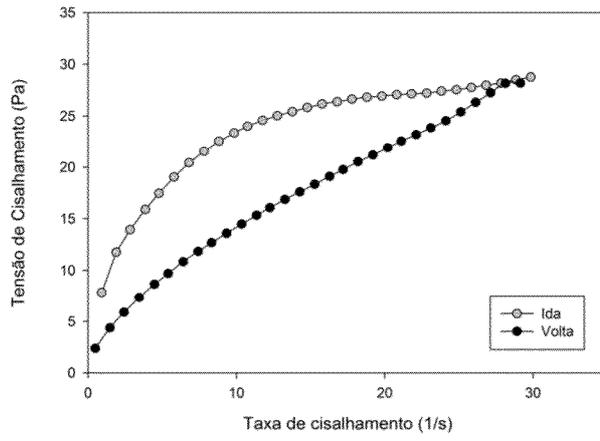


Figura 4

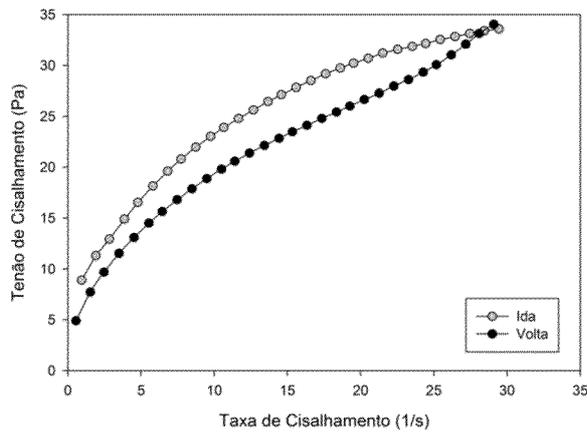


Figura 5

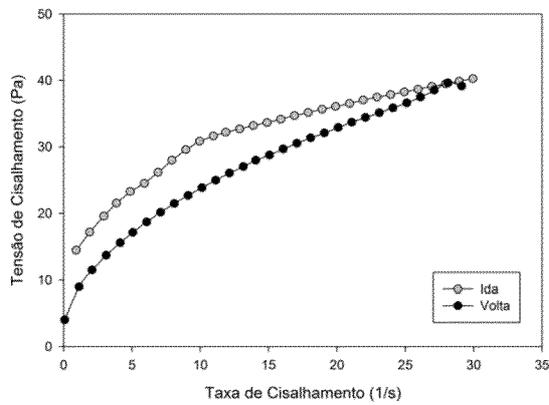


Figura 6

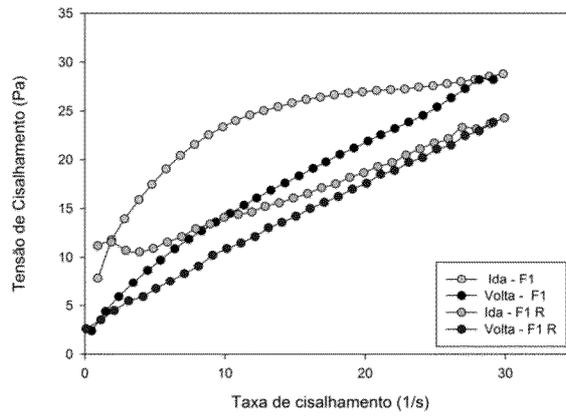


Figura 7

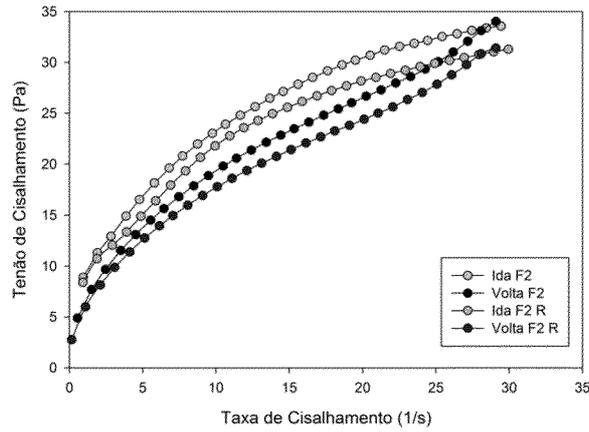


Figura 8

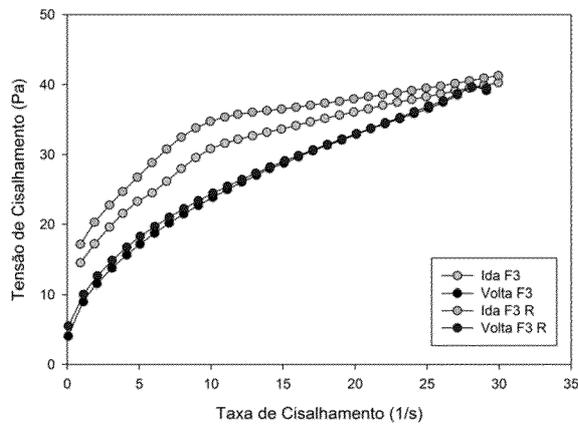


Figura 9

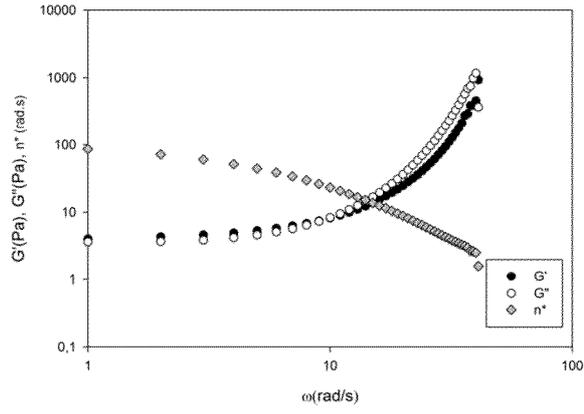


Figura 10

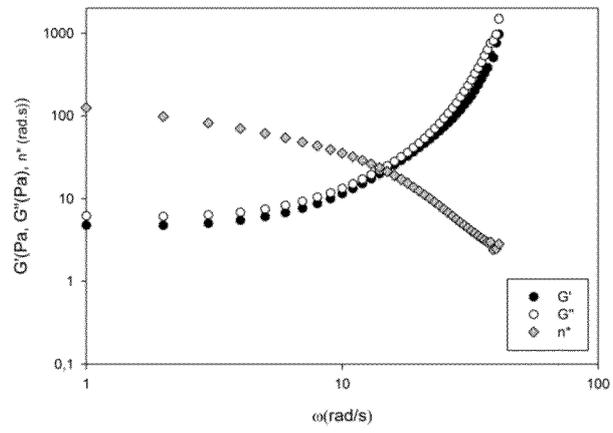


Figura 11

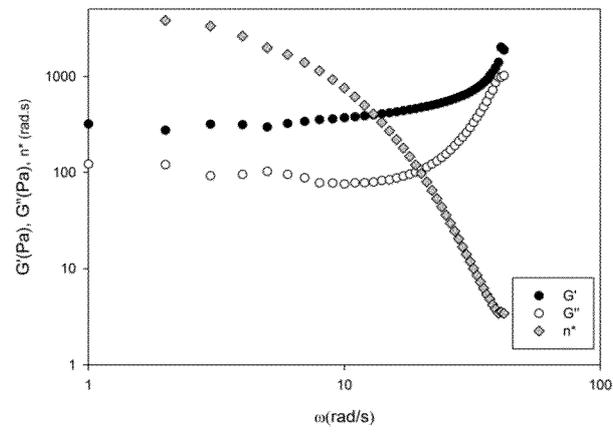


Figura 12

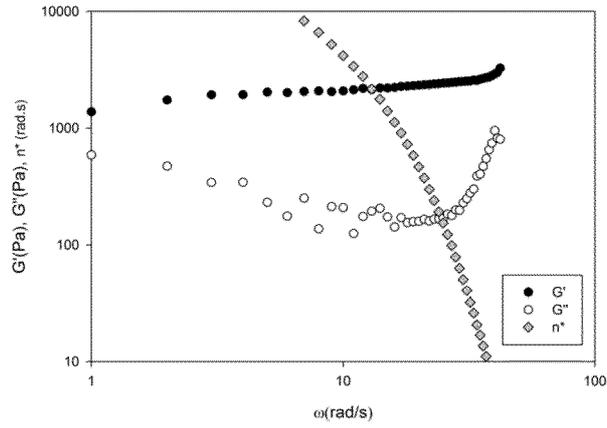


Figura 13

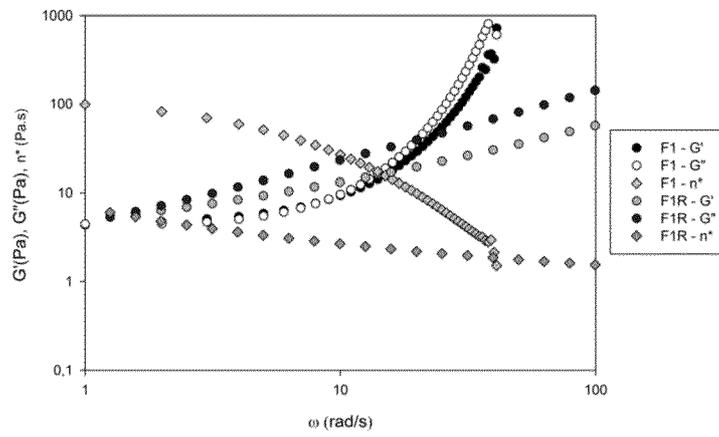


Figura 14

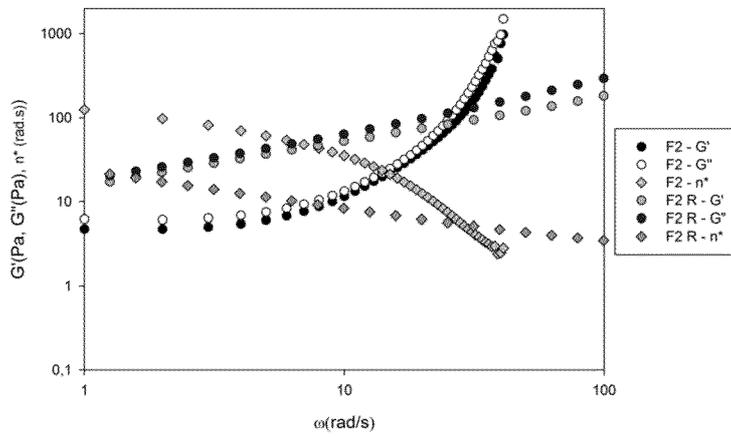


Figura 15

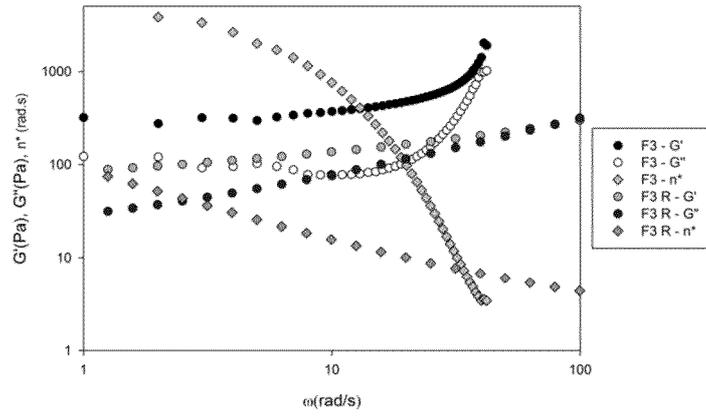


Figura 16

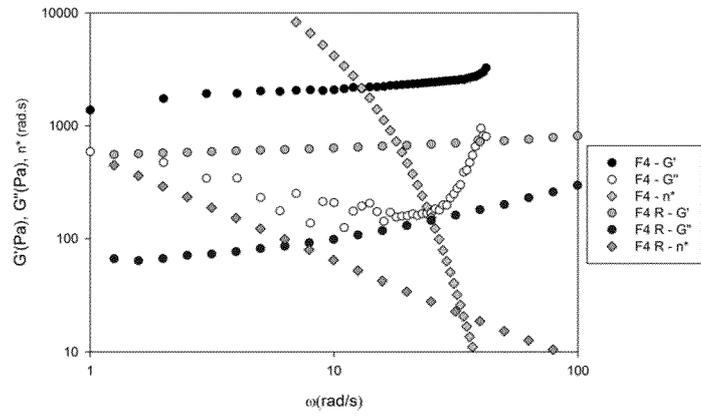


Figura 17

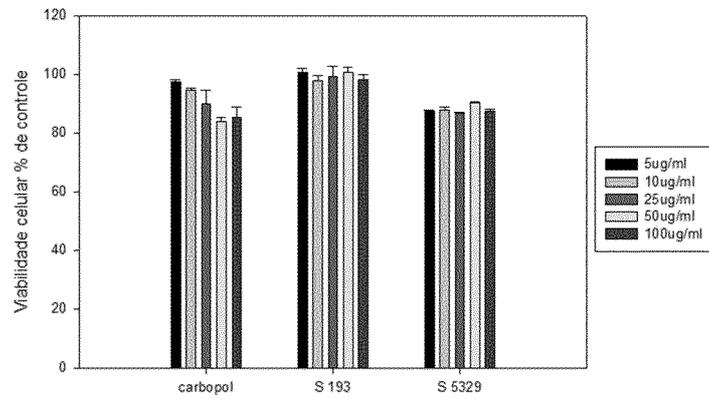


Figura 18

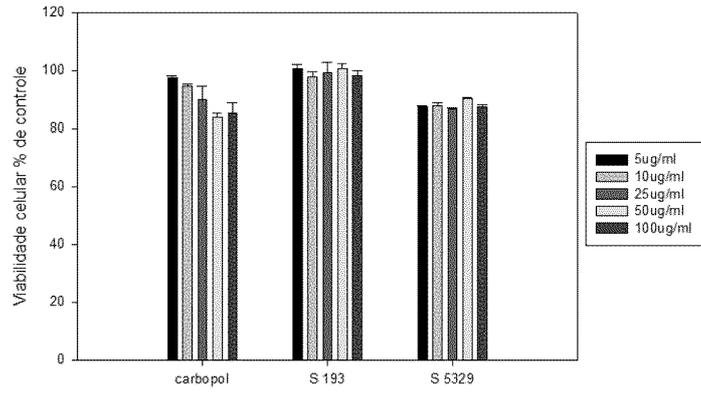


Figura 19

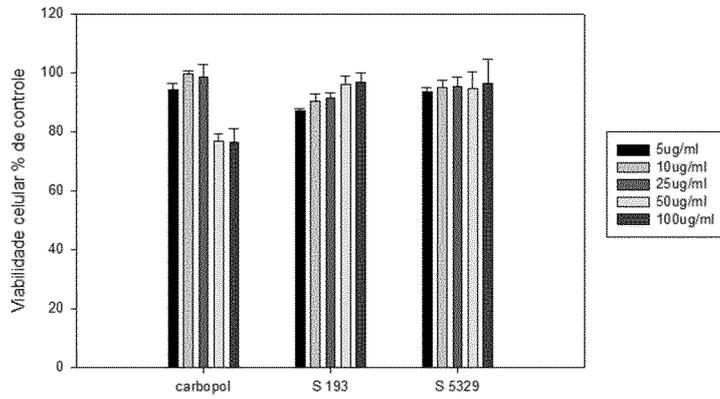


Figura 20

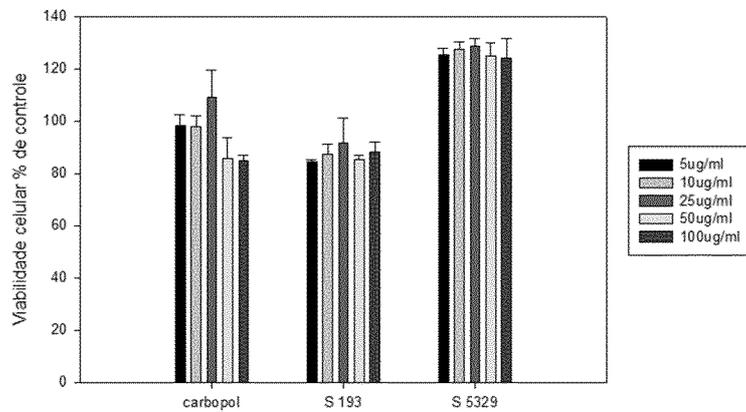


Figura 21

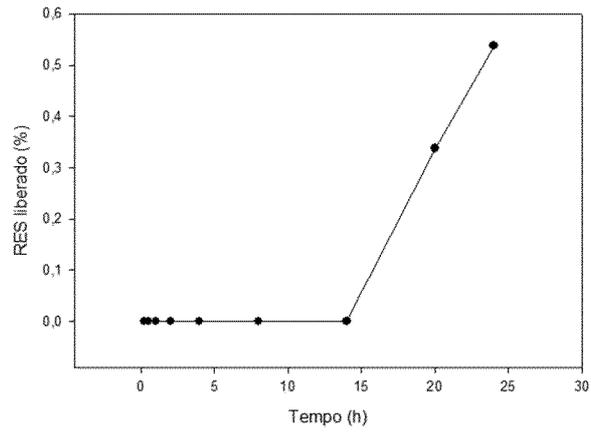


Figura 22

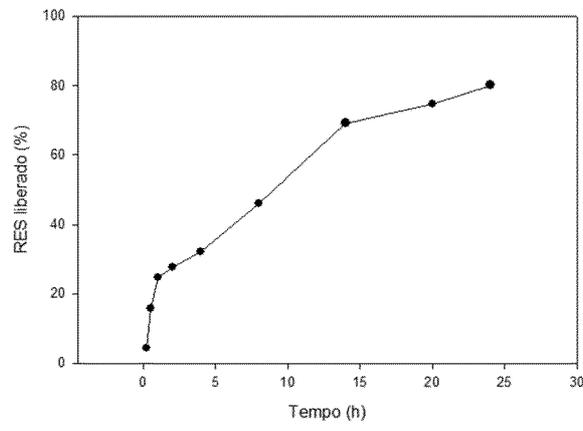


Figura 23

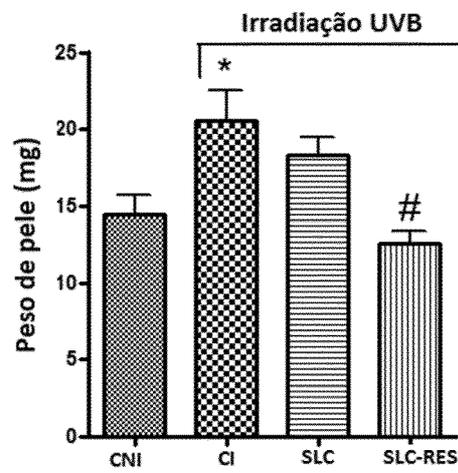


Figura 24

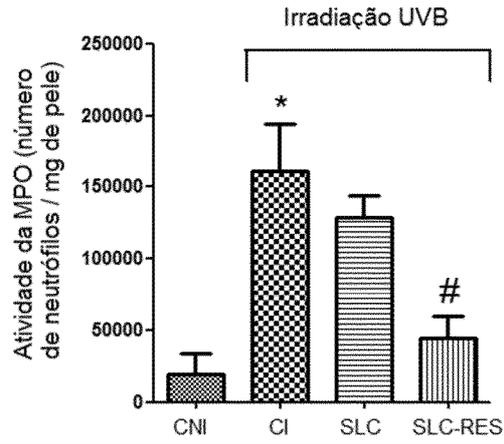


Figura 25

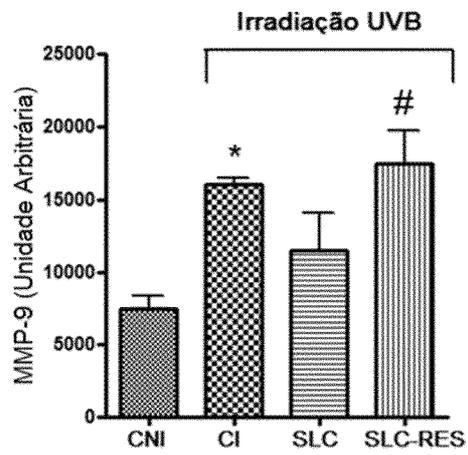


Figura 26

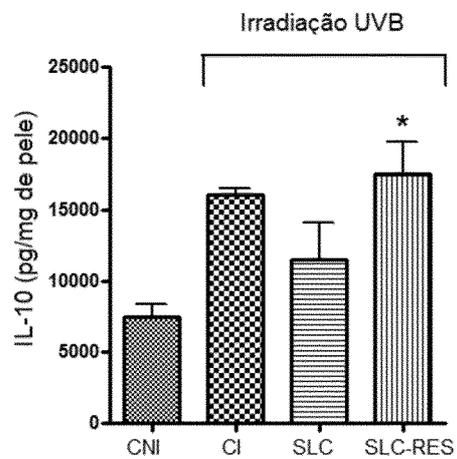


Figura 27

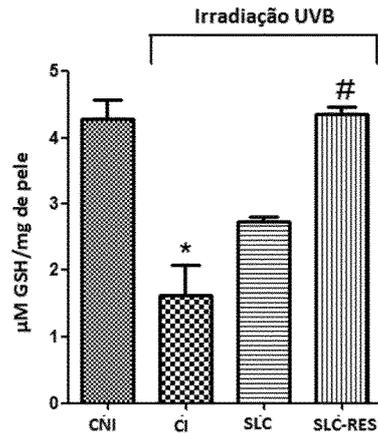


Figura 28

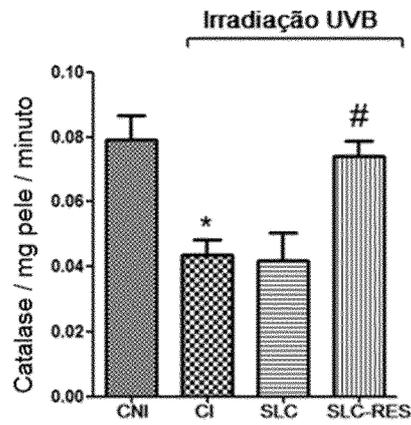


Figura 29

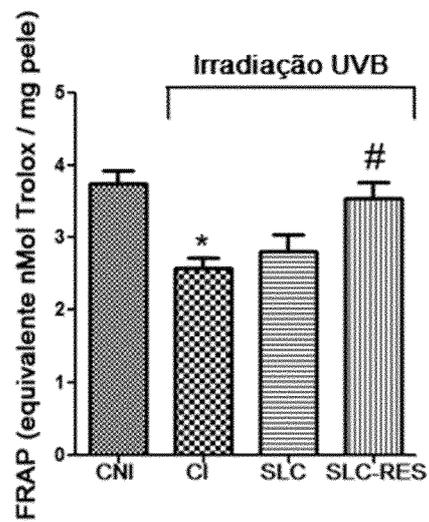


Figura 30

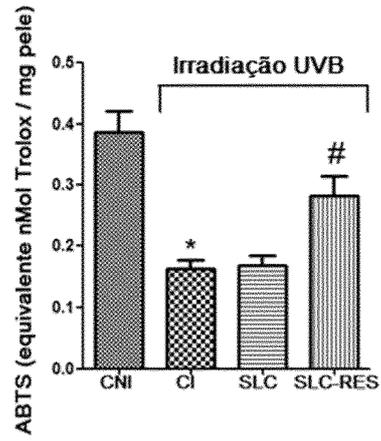


Figura 31

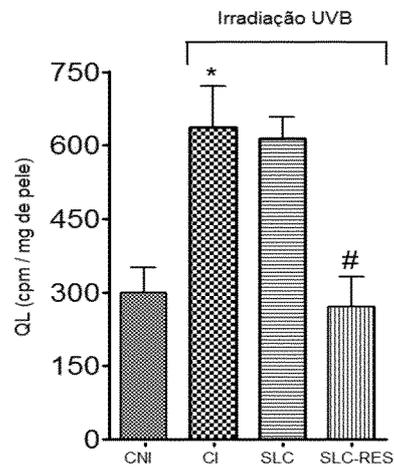


Figura 32

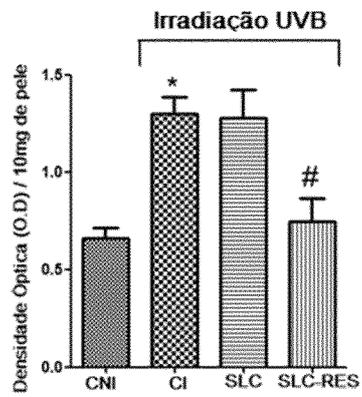


Figura 33

RESUMO**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA MESMA**

A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um sistema líquido-cristalino (SLC) incorporando o trans-resveratrol (RES) e uso da mesma para tratamento de desordens cutâneas, preferencialmente, fotoenvelhecimento cutâneo. Uma vez que o RES apresenta baixa solubilidade em água, propõe-se um sistema de liberação líquido-cristalino para sua administração tópica, otimizando sua ação farmacológica.