

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Cínthia Yuka Satake

**Incorporação do *trans*-resveratrol em sistemas nanoestruturados: avaliação
das ações antioxidante e despigmentante *in vitro***

Araraquara – SP

2013

Cíntia Yuka Satake

Incorporação do *trans*-resveratrol em sistemas nanoestruturados: avaliação das ações antioxidante e despigmentante *in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, área de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli.

Araraquara – SP

2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Osvaldo e Alaide, que ajudaram na minha formação pessoal e profissional, com todo amor, dedicação e carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares por todos os conselhos, toda a atenção e apoio durante estes anos de graduação. Agradeço por estarem sempre ao meu lado me incentivando e me dando todo o suporte. Vocês são meu porto seguro.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli por acreditar em meu trabalho e por me dar esta chance de iniciar uma atividade no ramo científico. Agradeço toda a atenção, os ensinamentos, a ajuda, os conselhos e, principalmente, toda a sabedoria comigo compartilhada.

À Profa. Dra. Mara Pinto Cristina pela colaboração em me ceder o equipamento para que meu trabalho pudesse ter andamento.

Ao Prof. Dr. José Ricardo Soares de Oliveira pela disponibilidade de tempo, pelo apoio e pela paciência durante a realização de alguns dos ensaios presentes neste trabalho. Sua sabedoria foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

À doutoranda Giovana Calixto pelas horas de dedicação, sempre compartilhando comigo sua sabedoria e tendo paciência em me ensinar a utilizar os equipamentos. Além de ter uma pessoa extremamente inteligente e esforçada ao meu lado, fiz uma grande amizade. Seu apoio foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

À doutoranda Roberta Rigon por toda a ajuda em meus experimentos e disponibilidade de tempo para me ajudar mesmo quando ambas corríamos contra o tempo.

Às minhas companheiras de república pela amizade durante todos estes anos de graduação, pelo companheirismo e pelo carinho.

Às minhas queridas amigas que fiz nestes cinco anos em Araraquara, me proporcionando sempre muito conforto, segurança, alegrias, cumplicidade e momentos inesquecíveis para serem guardados com muito carinho.

À todos os funcionários e professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por todo o auxílio prestado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho, na forma de bolsa de iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, ao Prof. Dr. José Ricardo Soares de Oliveira e à doutoranda Roberta Rigon por aceitarem o convite para participar da banca da minha defesa.

RESUMO

Com a crescente demanda de consumidores no setor de dermocosméticos, pesquisas têm voltado a atenção para a associação de nanotecnologia e princípios ativos de origem vegetal, como o *trans*-resveratrol (RES), que possui ação antioxidante e despigmentante, sendo um aliado no tratamento e prevenção do envelhecimento e hiperpigmentação cutânea. Acredita-se que os sistemas nanoestruturados, quando aliados ao RES, podem potencializar sua ação antioxidante e despigmentante. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados contendo RES, avaliar a estabilidade físico-química e as atividades antioxidante e despigmentante *in vitro* das formulações. Foram desenvolvidos sistemas constituídos por água deionizada como fase aquosa, Eumulgin[®] HRE40 sendo o tensoativo e diferentes fases oleosas: óleo de copaíba (S1), silicone fluido DC[®] 193 (S2) e óleo de abacate (S3). A caracterização estrutural foi realizada por microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), comportamento reológico e perfil de textura dos sistemas. O estudo da estabilidade foi conduzido empregando ensaios de análise visual, centrifugação e pH. A atividade antioxidante foi determinada com base na ação sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e a ação despigmentante *in vitro* foi avaliada quanto à inibição da tirosinase, por método enzimático. Os diagramas de fases evidenciaram regiões transparentes viscosas e líquidas para os sistemas S1 e S2. Dessa forma, para os ensaios de caracterização dos sistemas, fixou-se a porcentagem de tensoativo em 40%, variando-se as proporções de água e óleo, obtendo-se as formulações CB-23, CB-24 e CB-25 do sistema S1 e DC-23, DC-24 e DC-25 do sistema S2, as quais apresentaram 20, 30 e 40% de óleo, respectivamente. Os resultados de MLP demonstraram regiões no sistema S1 de predomínio de mesofases líquido-cristalinas lamelares, enquanto para S2 observou-se regiões de campo escuro, indicativas de microemulsões, em virtude de que as amostras apresentaram-

se líquidas. Tais dados foram confirmados por análises de SAXS. Os dados das análises de comportamento reológico evidenciaram que as formulações de S1 comportaram-se como fluidos não Newtonianos, enquanto as formulações de S2 apresentaram características de fluido Newtoniano. Na análise de fluxo das formulações CB-23 e CB-24, observou-se que as mesmas apresentaram excelentes propriedades adesivas. Os ensaios de estabilidade mostraram que as formulações apresentam-se estáveis no período de 30 dias. Resultados do teste de DPPH evidenciaram que a adição do RES nas formulações não promoveu, de acordo com o esperado, sua ação antioxidante. Ensaio enzimático evidenciaram que as formulações DC-24-RES e DC-23-RES apresentaram melhor atividade despigmentante *in vitro*. Tais resultados sugerem que o sistema S2 demonstra ser promissor para a incorporação do RES no combate ao envelhecimento cutâneo.

Palavras-chave: sistemas nanoestruturados; silicones; *trans*-resveratrol; atividade antioxidante *in vitro*; ação despigmentante *in vitro*.

ABSTRACT

According to the growing demand of consumers in the cosmetic industry, researches have turned their attention to nanotechnology and to active ingredients from vegetable origin, such as *trans*-resveratrol (RES), which has antioxidant and depigmenting actions, forming an alliance in the treatment and prevention against skin aging and skin hyperpigmentation. It is believed that nanostructured systems when combined with *trans*-resveratrol may enhance antioxidant and depigmenting actions. The aim of this study was to develop and characterize nanostructured systems containing *trans*-resveratrol, evaluate the physicochemical stability, *in vitro* antioxidant and depigmenting activities of the formulations. There were developed systems consisted of deionized water by as the aqueous phase, Eumulgin[®] HRE40 as surfactant and different oil phases: copaiba oil (S1), fluid silicone DC[®] 193 (S2) and avocado oil (S3). The structural characterization will be performed by the ternary phase diagram, analysis of polarized light microscopy (MLP), small angle X-ray scattering (SAXS), rheology and texture profile systems. The stability study will be assessed by visual analysis, centrifugation and pH. The antioxidant activity will be determined based on the action of capturing the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the depigmenting action will be evaluated by tyrosinase inhibition, by enzymatic method. The phases diagrams showed viscous and liquids transparent regions for the systems S1 and S2. Thus, for the essays of characterization of the systems, the percentage of surfactant was fixed in 40%, varying the proportion of deionized water and oil, so that the formulations CB-23, CB-24 and CB-25 were obtained from system S1 and DC-23, DC-24 and DC-25 were obtained from system S2, which presented 20, 30 and 40% of oil, respectively. The MLP results showed predominance of liquid crystalline lamellar mesophases regions in the system S1, while it was observed darkfield regions for S2, an indicative of microemulsions, because of the fact that the samples were liquid. These results were confirmed by SAXS analyses. The results from the

rheological behavior analysis showed that the formulations from S1 behaved as non-Newtonian fluids, while the formulations from S2 presented Newtonian fluid characteristics. In the flow analysis of the formulations CB-23 and CB-24, it was observed that they had excellent adhesive properties. The stability tests showed that the formulations were stable in the period of 30 days. The DPPH results showed that the addition of RES in the formulations did not potentiate its antioxidant action. Enzymatic essays showed that the formulations DC-24-RES and DC-23-RES had the best *in vitro* depigmenting activities. These results suggest that the system S2 may be promising for the incorporation of RES in the combat against the skin aging.

Keywords: nanostructured systems; silicones; *trans*-resveratrol; *in vitro* antioxidant activity; *in vitro* depigmenting action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do <i>trans</i> - e <i>cis</i> - resveratrol.	16
Figura 2 - Cristais Líquidos Liotrópicos: (a) fase cúbica, (b) fase hexagonal e (c) fase lamelar.	19
Figura 3 .- Diagrama de Fases Ternário do sistema contendo óleo de Copaíba e Eumulgin® HRE40.	30
Figura 4 - Diagrama de Fases Ternário do sistema contendo óleo de copaíba e Eumulgin® HRE40. Desenvolvimento dos 52 pontos intermediários.	31
Figura 5 - Diagrama de Fases Ternário do sistema contendo óleo de abacate e Eumulgin® HRE40.	32
Figura 6 - Diagrama de Fases Ternário do sistema contendo DC® 193 fluído e Eumulgin® HRE40.	32
Figura 7 - Fotomicrografia da formulação CB-23.	33
Figura 8 - Fotomicrografia da formulação CB-24.	33
Figura 9 - Fotomicrografia da formulação CB-25.	33
Figura 10 - Fotomicrografia da formulação DC-23.	34
Figura 11 - Fotomicrografia da formulação DC-24.	34
Figura 12 - Fotomicrografia da formulação DC-25.	34
Figura 13 - Fotomicrografia da formulação CB-23-RES.	34
Figura 14 - Fotomicrografia da formulação CB-24-RES.	34
Figura 15 - Fotomicrografia da formulação CB-25-RES.	34
Figura 16 - Fotomicrografia da formulação DC-23-RES.	34
Figura 17 - Fotomicrografia da formulação DC-24-RES.	34
Figura 18 - Fotomicrografia da formulação DC-25-RES.	34
Figura 19 - Avaliação estrutural das amostras CB-23, CB-24 e CB-25 do sistema S1, por SAXS.	36
Figura 20 - Avaliação estrutural das amostras DC-23, DC-24 e DC-25 do sistema S2, por SAXS.	37
Figura 21 - Reograma da formulação CB-23.	39
Figura 22 - Reograma da formulação CB-23-RES.	39
Figura 23 - Reograma da formulação CB-24.	40
Figura 24 - Reograma da formulação CB-24-RES.	40

Figura 25 - Reograma da formulação CB-25.	40
Figura 26 - Reograma da formulação CB-25-RES.	40
Figura 27 - Reograma da formulação DC-23.	41
Figura 28 - Reograma da formulação DC-23-RES.	41
Figura 29 - Reograma da formulação DC-24.	41
Figura 30 - Reograma da formulação DC-24-RES.	41
Figura 31 - Reograma da formulação DC-25.	42
Figura 32 - Reograma da formulação DC-25-RES.	42
Figura 33 - Reograma de comparação das formulações S1 (óleo de Copaíba).	42
Figura 34 - Reograma de comparação das formulações S1-RES.	42
Figura 35 - Reograma de comparação das formulações S2 (DC [®] 193).	43
Figura 36 - Reograma de comparação das formulações S2-RES.	43
Figura 37 - Avaliação visual das formulações CB-23, CB-24, CB-25, DC-23, DC-24 e DC-25 após período de um mês (30 dias).	46
Figura 38 - Porcentagem de atividade inibitória do RES sobre o DPPH.	49
Figura 39 - Solução das formulações com após a adição da solução de DPPH 0,06mM, respectivamente, antes e após a incorporação do RES.	50
Figura 40 - Porcentagem de atividade inibitória do AK sobre a tirosinase 120U/mL.	54
Figura 41 - Porcentagem de atividade inibitória do AK sobre a tirosinase 480U/mL.	54
Figura 42 - Porcentagem de atividade inibitória do RES sobre a tirosinase 480U/mL.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual das fases aquosas, fases oleosas e de tensoativos das formulações.	24
Tabela 2. Valores de espalhamento $q_{\text{máx}}$ (Å) e razão entre as distâncias interplanares das formulações.	37
Tabela 3. Propriedades mecânicas das formulações determinadas através da análise de perfil de textura. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão, à temperatura de 32° C.	44
Tabela 4. Trabalho da força bioadesiva (N) das formulações. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão, à temperatura de 32° C.	45
Tabela 5. Valores referentes ao pH, respectivamente, das amostras controle e das amostras contendo RES, 24 horas após a preparação em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).	47
Tabela 6. Valor das densidades das formulações.	49
Tabela 7. Valores da absorbância (A) e a respectiva % de inibição de DPPH das formulações DC-23, DC-23-RES, DC-24, DC-24-RES, DC-25 e DC-25-RES. Os valores da absorbância representam a média da triplicata.	50
Tabela 8. Valores da absorbância (A) e a respectiva % de inibição de DPPH das formulações DC-24. Os valores da absorbância representam a média da triplicata.	51
Tabela 9. Valores da absorbância (A) e a respectiva % de inibição de DPPH das formulações DC-25. Os valores da absorbância representam a média da triplicata.	51
Tabela 10. Valores da atividade inibitória (AI), em porcentagem, das formulações DC-23, DC-23-RES, DC-24, DC-24-RES, DC-25 e DC-25-RES utilizando tirosinase 480U/mL.	55
Tabela 11. Equação da reta, R^2 e AI_{50} para as formulações DC-23, DC-23-RES, DC-24, DC-24-RES, DC-25 e DC-25-RES, utilizando tirosinase 480U/mL.	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A – Água

AI – Atividade inibitória

AK – Ácido kójico

BHT – Hidroxitolueno butilado

CB – Amostras que representam o sistema S1

CLs – Cristais líquidos

DC – Amostras que representam o sistema S2

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

MEs - Microemulsões

MLP – Microscopia de luz polarizada

O - Óleo

RES – *trans*-resveratrol

S1 – Sistema constituído de óleo de Copaíba, Eumulgin[®] HRE40 e água deionizada.

S2 – Sistema constituído de silicone fluido DC[®] 193, Eumulgin[®] HRE40 e água deionizada.

S3 – Sistema constituído de óleo de abacate, Eumulgin[®] HRE40 e água deionizada.

SAXS – Espalhamento de raios X a baixo ângulo

SF – Sistema de fases

SLO – Sistema líquido opaco

SLT – Sistema líquido transparente

SVO – Sistema viscoso opaco

SVT – Sistema viscoso transparente

[®] – Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	Materiais	22
3.1.1	Reagentes	22
3.1.2	Equipamentos	22
3.2	Métodos	23
3.2.1	Preparação dos sistemas	23
3.2.2	Construção do diagrama de fases ternário	23
3.2.3	Caracterização estrutural dos sistemas selecionados	24
3.2.3.1	Microscopia de luz polarizada	24
3.2.3.2	Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	25
3.2.3.3	Análise reológica	25
3.2.3.4	Análise do perfil de textura	25
3.2.3.5	Avaliação <i>in vitro</i> da força bioadesiva	26
3.2.4	Ensaio de estabilidade físico-química para as formulações obtidas	26
3.2.4.1	Avaliação visual	26
3.2.4.2	Teste de centrífuga	26
3.2.4.3	Determinação do pH	27
3.2.5	Avaliação da atividade antioxidante	27
3.2.6	Avaliação da atividade despigmentante	28
3.2.7	Análise estatística	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Construção do diagrama de fases ternário	30
4.2	Caracterização estrutural dos sistemas selecionados	33
4.2.1	Microscopia de luz polarizada	33
4.2.2	Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	35
4.2.3	Análise reológica	38
4.2.4	Análise do perfil de textura	43
4.2.5	Avaliação <i>in vitro</i> da força bioadesiva	45
4.3	Ensaio de estabilidade físico-química para as formulações obtidas	46

4.3.1	Avaliação visual	46
4.3.2	Teste de centrífuga	47
4.3.3	Determinação do pH	47
4.4	Avaliação da atividade antioxidante	48
4.5	Avaliação da atividade despigmentante	52
5	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	58

1. INTRODUÇÃO

A pele é o único órgão externo que pode ser observado em toda a sua extensão e também é o principal órgão relacionado com a estética do ser humano. Por estar em contato com o meio ambiente é a primeira linha de defesa do corpo contra danos físicos (rigores de temperatura, ressecamento, umidade, raios ultravioleta e traumas), químicos (álcalis, sabões ácidos) ou biológicos (microrganismos como vírus, fungos e bactérias) (PANDOLFO, 2011).

O processo de envelhecimento altera a estrutura e a função dos órgãos. No caso da pele, que é um órgão externo, também ocasiona modificação do seu aspecto. É muito importante estudar estas alterações na pele que ocorrem com o envelhecimento porque as mudanças no aspecto exterior revelam disfunções e traz consequência psíquica sobre o comportamento da pessoa, tanto diante de si mesma como diante das outras (LÉVÈQUE, 1997).

O envelhecimento é o declínio progressivo da capacidade metabólica celular acompanhada da perda potencial da capacidade de expressão gênica, acúmulo de mutações somáticas e diminuição da integridade estrutural da célula que inevitavelmente ocasionam a incompatibilidade com a vida (OENDER *et al.*, 2008).

O envelhecimento intrínseco da pele é similar ao que ocorre à maioria dos órgãos internos, envolvendo a lenta deterioração das funções dos tecidos. É geneticamente determinado e clinicamente associado ao aumento da fragilidade, perda de elasticidade e apresenta uma qualidade transparente. Contudo, grande parte do envelhecimento cutâneo é resultado da exposição cumulativa à luz solar. A exposição ao sol gera, tipicamente, linhas de expressão profundas, rugas e pigmentação irregular. Estas resultam no chamado envelhecimento extrínseco causado principalmente pela exposição à luz ultravioleta. (JENKINS, 2002).

O dano cumulativo oxidativo como fator causador do envelhecimento é suportado em diversos estudos. É particularmente relevante para a pele dada a sua exposição à radiação ultravioleta e ao ozônio. O organismo possui um conjunto de enzimas (entre eles o superóxido desmutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase) e compostos antioxidantes que mantêm as espécies reativas em concentrações subtóxicas. Tem sido proposto que ao ocorrer um desequilíbrio entre os processos, levando à redução de enzimas, induzido, por exemplo, pela

ação da radiação UV, este seja um fator para o envelhecimento (JENKINS, 2002; PYTEL *et al.*, 2005).

O processo de oxidação está relacionado com a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes são continuamente produzidos pelo organismo durante os eventos fisiológicos. A ação dos radicais livres sobre a pele pode acarretar em alterações pigmentares, conhecidas como discromias, as quais são utilizadas para designar alterações na cor da pele. Os antioxidantes protegem o organismo humano de radicais livres e dos efeitos do ROS, retardando o processo de muitas doenças crônicas, bem como a peroxidação lipídica. (BENECH, 2002; GÜLÇIN, 2010).

São utilizados hoje inúmeros princípios ativos nas formulações com o objetivo de obter rejuvenescimento da face, colo e dorso das mãos. O tratamento se baseia no uso de substâncias regeneradoras, que devolvam os nutrientes essenciais e reparam danos causados à pele, e agentes antirradicais livres, que combatem o estresse oxidativo (PYTEL *et al.*, 2005).

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno; MM. 228,25g.mol⁻¹) é um composto biologicamente ativo, pertence às fitoalexinas e é um metabólito secundário importante para a defesa da planta contra infecções e em condições de estresse induzido. Pode se apresentar na forma estereoisométrica *cis*- ou *trans*-. Nas plantas, embora haja uma mistura destes dois isômeros, a isoforma *trans* geralmente é predominante (FILIP *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2013). A Figura 1 apresenta a estrutura química do *trans* e *cis*-resveratrol.

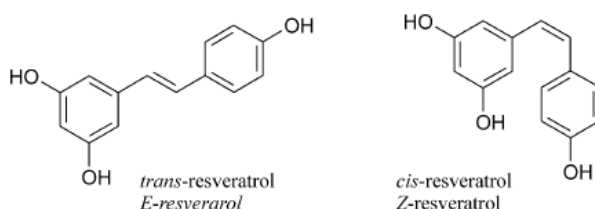


Figura 1. Estrutura química do *trans*- e *cis*- resveratrol. A forma *trans* é relativamente estável e está preferencialmente presente na natureza.

O resveratrol é produzido por diversas espécies de plantas, tais como, uvas, amendoim e seus derivados, e 'berries'. É estimado que a casca da uva fresca contenha aproximadamente 50-100µg de resveratrol por grama. No vinho tinto, a concentração de resveratrol, de acordo com alguns autores, pode chegar em 1-3mg.L⁻¹. As atividades farmacológicas do resveratrol

incluem efeito cardioprotetor, efeitos benéficos para a diabetes, atividade anticâncer, efeitos neuroprotetores, atividade antioxidante e atividade antienvelhecimento (FERNÁNDEZ-MAR *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013).

O isômero *trans* é biologicamente mais ativo que o isômero *cis*, provavelmente devido à conformação não planar. O *cis*-resveratrol tem se mostrado instável e, dessa forma, não disponível comercialmente. O resveratrol é um composto extremamente fotossensível e estudos indicam que o isômero *trans* pode se converter no isômero *cis* quando exposto à radiação ultravioleta. O resveratrol apresenta solubilidade em etanol ($50\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) e em DMSO ($16\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Contudo, é ‘praticamente insolúvel’ em água ($3\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}$) de acordo com a definição da Farmacopeia Europeia (AMRI *et al.*, 2012).

Estudos recentes têm demonstrado que o *trans*-resveratrol (RES), devido às suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, pode ser um importante aliado na prevenção e no tratamento do envelhecimento cutâneo, mediante ação antioxidante e despigmentante (NDIAYE *et al.*, 2011). Sua ação é baseada na facilidade com que o hidrogênio dos compostos fenólicos presentes na sua estrutura pode deslocar a carga eletrônica do radical que é produzido por processos oxidativos ou por eventos biologicamente mediados.

Na literatura, observam-se alguns trabalhos que mencionam a utilização de RES por via tópica, incorporado em soluções e hidrogéis (ZHANG, FLACH, MENDELSON, 2007; HUNG *et al.*, 2008). Todavia, os relatos da literatura acerca de estratégias tecnológicas que podem potencializar a sua ação tópica ainda são escassos. Assim, sistemas que apresentem a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente, diversos grupos de princípios ativos e de modificar suas propriedades e comportamento em meio biológico, são promissoras para carrear substâncias com tais propriedades (MAINARDES *et al.*, 2006).

Uma alternativa que pode ser empregada para contornar as limitações da aplicação tópica do RES é a sua incorporação em sistemas nanoestruturados, dentre eles os sistemas líquido-cristalinos, os quais apresentam vantagens relacionadas principalmente ao fato de promoverem liberação controlada de princípios ativos, além de protegê-los da degradação térmica ou fotodegradação (MOHANRAJ, CHEN, 2006).

Os cristais líquidos (CLs) são conhecidos desde 1889, quando Lehmann descreveu um estado intermediário na transformação térmica a partir do estado sólido para o líquido. Em 1922, G. Friedel usou o termo “estado mesomórfico” para definir este quarto estado da

matéria; com isso, os cristais líquidos passaram a serem denominados como fases mesomórficas ou mesomórficas cristalinas. Quando utilizados em cosméticos podem apresentar uma série de vantagens, pelo fato de promoverem liberação controlada de substâncias ativas, protegerem as substâncias ativas sensíveis à degradação térmica ou fotodegradação e promoverem aumento da retenção de água no estrato córneo proporcionando aumento na hidratação cutânea (FERRARI, 1998).

Os cristais líquidos (CLs) são denominados como fases mesomórficas, ou seja, apresentam um estado intermediário que combina as propriedades características dos estados líquidos e sólidos. O estado líquido é associado à habilidade de fluir, enquanto o estado sólido é caracterizado por uma estrutura ordenada e cristalina (MÜLLER-GOYMAN, 2004).

Podem ser divididos em duas principais classes: os termotrópicos e os liotrópicos. Os termotrópicos têm sua estabilidade dependente da temperatura; já os liotrópicos são formados quando o estado líquido-cristalino se forma em virtude da adição de um solvente. Como os solventes estão presentes em emulsões, a formação deste último é de importância para a área farmacêutica e cosmética. Dentre as mesofases liotrópicas, as mais comumente observadas são: a lamelar, a hexagonal e a fase cúbica (TYLE, 1989).

A fase lamelar (unidade lamelar), hexagonal (unidade cilíndrica) e a cúbica (unidade esférica) estão ilustrados na figura abaixo (Figura 2). Foi sugerido em alguns estudos que devido à lenta evaporação da água nos cristais líquidos, a emulsão contendo cristais líquidos poderia manter o princípio ativo hidrofílico por um maior período no veículo, o que poderia favorecer a penetração cutânea. Ainda, foi observado que com o aumento da concentração de moléculas anfifílicas, uma transição da fase cúbica para a fase hexagonal e para a fase lamelar ocorria. Dependendo da lipofilicidade do solvente e da EHL dos componentes anfifílicos podem ocorrer a fase hexagonal ou fase hexagonal reversa (OTTO; du PLESSIS; WIECHERS, 2009).

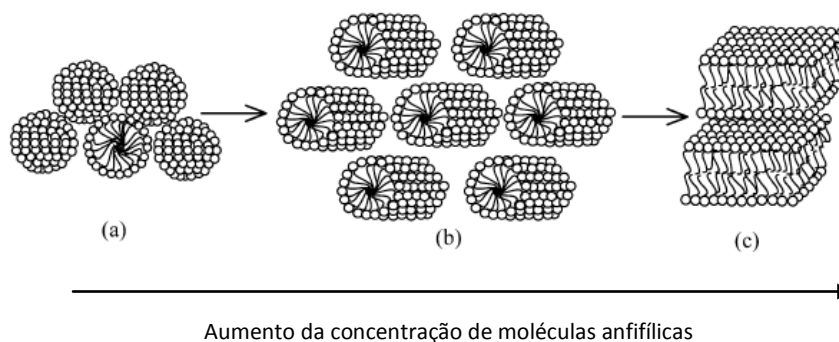


Figura 2. Cristais Líquidos Liotrópicos: (a) fase cúbica, (b) fase hexagonal e (c) fase lamelar.

Dentre os métodos utilizados para a caracterização de cristais líquidos estão a microscopia de luz polarizada, microscopia de transmissão de elétron, espalhamento de raios-X, calorimetria e reologia (PATEL, PATEL, 2010).

Os líquidos cristalinos liotrópicos, entre eles os de fase cúbica e hexagonal, são considerados atraentes como carreadores de fármacos na Tecnologia Farmacêutica. Por outro lado, os cristais líquidos lamelares são particularmente adequados para aplicação dérmica devido à grande similaridade com a membrana lipídica intercelular da pele, pelas propriedades hidratantes e pela consistência ideal. Os cristais líquidos lamelares são formados por moléculas anfifílicas hidratadas em forma de cilindros. Estes se organizam em camadas, gerando fase lamelar com a alternância de camadas polares e não polares (GOSENCA, BESTER-ROGAC, GASPERLIN, 2013).

Dentre as vantagens atribuídas à utilização dos cristais líquidos pode-se destacar aumento da estabilidade, hidratação prolongada, liberação controlada de fármaco (TADWEE *et al.*, 2012). Os cristais líquidos são utilizados como sistemas para incorporação e proteção de substâncias sensíveis, tais como, vitaminas, antioxidantes e óleos. Estudos indicam que os CLs podem aumentar a estabilidade de cremes enquanto criam uma barreira reológica resultando em aumento de viscosidade e a redução da coalescência pela modificação das forças de Van der Waals (NESSEEM, 2001).

Outra alternativa que pode ser empregada para a incorporação tópica do RES são as microemulsões, por apresentarem diversas vantagens quando comparadas às formulações tradicionais, entre elas, melhor solubilidade do fármaco, aumento da permeabilidade cutânea e estabilidade a longo prazo. Estes benefícios associados ao seu menor potencial de irritação

cutânea tornam as microemulsões veículos interessantes para a indústria farmacêutica e cosmética (SCHWARZ *et al.*, 2012).

As microemulsões (MEs) são definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizado por tensoativo. As características das MEs têm chamado a atenção, principalmente devido à habilidade em solubilizar uma grande quantidade de aditivos lipofílicos ou hidrofílicos, aumentar a eficiência das reações e por permitir reações químicas na preparação de partículas inorgânicas ou na polimerização de monômeros orgânicos (FANUN, 2012; FASOLIN, SANTANA, CUNHA, 2012).

São muito utilizadas para aumentar a solubilização e a absorção de substâncias lipofílicas. Microemulsão são sistemas opticamente transparentes ou translúcidos. Os tensoativos não-iônicos ou zwitteriônicos são mais aceitáveis para aplicação farmacêutica porque são menos afetados pelas mudanças de pH, força iônica e contornam problemas de toxicidade (FORMARIZ *et al.*, 2005).

A estrutura das MEs é influenciada pelas propriedades físico-químicas e pelas relações entre os componentes que integram o sistema. A temperatura exerce efeito sobre a formação e região de existência das microemulsões, por essa razão, a estabilidade da ME final deve ser sempre examinada na temperatura de estocagem e aplicação (KREILGAARD, 2002).

Do ponto de vista microestrutural, as ME podem ser do tipo água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou estruturas bicontínuas. Na primeira, o componente hidrofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente lipofílico; na segunda, o componente lipofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente hidrofílico (CRUZ, UCKUN, 2001).

As microemulsões do tipo A/O tem sido utilizadas para a solubilização e aumento da biodisponibilidade de moléculas bioativas. Comumente, estes estão sendo utilizados como carreadores de fármacos para liberação tópica ou transdérmica, mas poucos estudos fazem uso das microemulsões A/O para aplicação oral. Moléculas hidrofóbicas são em geral solubilizadas em microemulsões do tipo O/A. Neste tipo de ME, as moléculas hidrofóbicas ficam localizadas no núcleo ou na interface desses veículos. Além disso, são obtidas maior solubilidade e uma melhor proteção (SPERNATH, ASERIN, 2006).

Quando a ME é aplicada na forma tópica demonstrou-se que ocorre um aumento significativo na absorção cutânea, tanto de fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos, comparado

aos veículos convencionais, como por exemplo, soluções aquosas, soluções micelares, emulsões e lipossomas. A máxima liberação do fármaco pelas microemulsões é dependente da sua mobilidade no veículo, a qual é determinada pela composição e pela estrutura interna da microemulsão. A facilidade de preparação das MEs, associada à favorável liberação cutânea do fármaco e à estabilidade física destes sistemas, tornam as MEs veículos promissores para o desenvolvimento de formulações tópicas (KREILGAARD, 2002; FANUN, 2012).

Tem-se observado uma grande tendência no desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos e microemulsões empregando silicones nas formulações. Os silicones vêm conquistando cada vez mais o mercado mundial devido à sua grande variedade de aplicações, nos campos da Medicina, das diversas Engenharias, da Farmácia e neste contexto, em especial para a liberação de fármacos. Atualmente, são muito utilizados na produção de espumas plásticas e nos produtos de cuidados pessoais.

O DC[®] 193 é um copolímero de poliéster (glicol) de silicone com EHL calculado de 12 (INFORMATIVO, 2012). Copolímero é um polímero formado por diferentes monômeros. Os polímeros são substâncias de alto peso molecular, também chamada de macromolécula. São provenientes do encadeamento de moléculas menores. O tipo de polímero empregado para a formulação de um sistema pode influenciar o comportamento reológico, a estabilidade física do produto e seu comportamento sobre a pele, gerando diferentes níveis de aceitação pelo consumidor (CORRÊA *et al.*, 2005).

Os silicones apresentam uma combinação única de estabilidade a altas temperaturas e propriedades elásticas a baixas temperaturas. A estrutura principal dos silicones consiste no grande volume atômico dentre os átomos de silicone, bem como o tamanho e a posição dos grupos constituintes que culminam na possibilidade de rotação livre entre as bandas de Si-O-Si. Este volume livre e a alta compressibilidade do silicone são responsáveis por sua permeabilidade a certos gases e líquidos. Os silicones apresentam ainda um custo baixo aliado à facilidade de fabricação, são quimicamente inertes e não-tóxicos. Estes polímeros podem promover a liberação controlada de fármacos pelo fato de não os degradarem em razão da sua química inerte. No âmbito farmacêutico, a utilização de silicone garante um maior conforto do paciente devido à fácil administração (MASHAK, RAHIMI, 2009).

O DC[®] 193 tem propriedades de melhorar o deslizamento, reduzir a pegajosidade, melhorar a espalhabilidade, promover uma sensação macia e reduzir a irritação da pele e dos olhos (INFORMATIVO, 2012).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi incorporar o *trans*-resveratrol em um sistema nanoestruturado inovador estabilizado com silicone, avaliar a estabilidade físico-química e as atividades antioxidante e despigmentante *in vitro* das formulações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

- Água deionizada em sistema Milli Q com condutividade $18,2\mu\text{S.cm}^{-1}$;
- Óleo de Copaíba – Copaíba Balsam Oil, SAFC[®];
- Óleo de Abacate – Brasil.
- Silicone DC[®] 193 Fluído (PEG-12 Dimethicone) – Dow Corning[®], D'Altomare Química;
- Eumulgin[®] HRE 40 400E (Óleo de rícino hidrogenado PEG-40) – Pharma Special;
- RES (3,5,4'-tri-hidroxi-trans-estilbeno) – Extract 100% Galena[®] Brasil;
- Radical DPPH (2,2,-difênil-1-picril-hidrazil) – Fluka, Buchs, Suíça;
- Álcool metílico – PA –ACS Chemis[®];
- L-Tyrosina – Sigma-Aldrich[®];
- Tyrosinase from mushroom *Agricus biporus* 6,4 mg solid; 3960 U/mg solid – Sigma-Aldrich[®];
- Ácido Kójico – Galena[®], Brasil.

3.1.2 Equipamentos

- Sistema de purificação de água MILLIPORE[®], Milli - Q Plus;
- Microscópio de luz polarizada Leica[®] Microsystems, MZ APO;
- pHmetro – Digimed[®] DM-23;
- Centrífuga – Sorvall[®] TC6 – Du Pont;
- Banho termostatzado – Tecnall[®] TE 2005;
- Analisador de textura TA-XT Plus[®] – Stable Micro Systems;

- Balança analítica – AW220 Shimadzu[®];
- Balança analítica – Q-500L210C Chemis[®] Líquido;
- Balança semianalítica – Gehaka[®];
- Pipetas volumétricas;
- Reômetro, modelo AR 2000EX, DP Union, TA Instruments[®], United Kingdom Rheometers;
- Espectrofotômetro, modelo Spectrum SP2000, Quimis[®] Q798u, número de série 075;
- ELISA Plate Analyser, Robonik[®].

3.2 Métodos

3.2.1.Preparação dos sistemas

Inicialmente os sistemas foram preparados em 36 frascos de vidro pequenos, cada um correspondente a um ponto do diagrama de fases ternário, contendo óleo de copaíba como fase oleosa (S1) e o Eumulgin[®] HRE40 como tensoativo, nas proporções de 1:9 a 9:1(m/m). Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, titulou-se as formulações (com diferentes proporções de óleo e tensoativo) com água deionizada para se completar uma quantidade final de 2,0 gramas. A seguir, todos os frascos preparados sofreram, individualmente, aquecimento em banho-maria à 45°C com agitação vigorosa por meio de um bastão de vidro durante 5 minutos. Os frascos foram fechados em seguida e permaneceram em repouso, em local seco e protegido da luz solar, por um período de 24 horas. Após este período, os mesmos foram analisados visualmente, em local devidamente iluminado, para a classificação dos frascos com o intuito de delimitar as diferentes regiões no diagrama de fases ternário. O mesmo procedimento acima descrito foi realizado para obtenção dos sistemas S2 e S3, que apresentavam a mesma fase aquosa e tensoativo de S1, variando-se a fase oleosa, que foi DC[®] 193 (silicone) e óleo de abacate, respectivamente. O RES foi incorporado na concentração de 100µM na fase oleosa dos sistemas.

3.2.2 Construção do diagrama de fases ternário

As classificações utilizadas para a análise visual dos frascos foram: sistema de fases (SF), sistema viscoso opaco (SVO), sistema líquido opaco (SLO), sistema viscoso

transparente ou translúcido (SVT) ou sistema líquido transparente ou opaco (SLT). Os sistemas considerados viscosos consistem em sistemas com alta resistência ao movimento, ou seja, aqueles em que não foi observado o escoamento pelas paredes do frasco. Os sistemas classificados como opacos ou com separação de fases foram rapidamente descartados da pesquisa, enquanto os sistemas opticamente transparentes / translúcidos foram encaminhados para análise em microscopia de luz polarizada para a distinção entre isotrópicos (fase cúbica) ou anisotrópicos (fases lamelar e hexagonal). A partir dos dados obtidos, foram selecionadas as regiões dos diferentes sistemas para os ensaios de caracterização estrutural e estabilidade físico-química.

3.2.3 Caracterização estrutural dos sistemas selecionados

3.2.3.1 Microscopia de luz polarizada

O procedimento foi realizado da seguinte maneira: uma pequena quantidade de cada uma das formulações foi colocada sobre uma lâmina de vidro (devidamente identificada) e esta foi coberta por uma lamínula e analisada com o auxílio de microscópio de luz polarizada (MLP) para se avaliar a homogeneidade das dispersões e a presença de área de anisotropia. As formulações foram analisadas por MLP e após a análise simultânea do diagrama com as imagens obtidas por microscopia, foram selecionadas 6 formulações, sendo três delas do sistema S1 e as outras três do sistema S2, para dar continuidade aos estudos de caracterização estrutural e de estabilidade físico-química. Fixou-se a porcentagem de tensoativo em 40%, variando-se as proporções de água/óleo. A composição percentual das fases selecionadas está descrita na Tabela 1. A estes pontos houve a incorporação de 100µM de RES na fase oleosa dos sistemas.

Tabela 1. Composição percentual das fases aquosas, fases oleosas e de tensoativos das formulações.

Formulação	Fase Oleosa (%)	Eumulgin[®] HRE40 (%)	Fase Aquosa (%)
CB – 23	20	40	40
CB – 24	30	40	30
CB – 25	40	40	20
DC – 23	20	40	40
DC - 24	30	40	30
DC - 25	40	40	20

3.2.3.2 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Este ensaio foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS-Brasil), na linha SAXS1. Esta linha é equipada com um monocromador ($\lambda = 1.488 \text{ \AA}$), um detector vertical localizado a 1,5 m da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento $I(q)$, em função do vetor de espalhamento, q . O espalhamento das micas e do ar foi subtraído da intensidade total espalhada. Cada espectro foi coletado por 45 segundos.

3.2.3.3 Análise reológica

Os sistemas selecionados, antes e após a incorporação do RES (totalizando 12 amostras), foram preparados com 24 horas de antecedência. O comportamento reológico das amostras foi analisado por meio do ensaio contínuo em reômetro de tensão controlada com dispositivo placa-placa (diâmetro 40mm e Gap 200 μm) para amostras mais viscosas e dispositivo cone-placa (diâmetro 40mm e Gap 52 μm com ângulo de truncamento 1,59 (2°)) para amostras menos viscosas, a uma temperatura de 32 °C. Uma pequena alíquota da amostra foi inserida no centro da placa inferior do equipamento e esperava-se o tempo de 2 minutos para a ambientação da amostra (equilíbrio de temperatura) para então dar início à análise. A taxa de cisalhamento utilizado foi de 0 a 100s⁻¹ para a curva ascendente e de 100 a 0s⁻¹ para a curva descendente, com duração de 120 segundos cada.

3.2.3.4 Análise do perfil de textura

O perfil de textura das amostras foi determinado com base em parâmetros como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão das formulações. Este ensaio consistiu na pesagem de 15,0g de amostra, sua introdução em tubos de centrífuga cônicos de 50,0ml (Falcon) e centrifugação a 3000rpm por 4 minutos para promover a uniformidade da superfície e eliminar bolhas de ar que tenham ficados aprisionados no interior da amostra. Estes tubos foram então transferidos para o banho termostatizado (Tecnall® TE 2005) que se encontrava a uma temperatura de 32°C, mimetizando a temperatura da pele. Quando a temperatura de 32°C era indicada para as amostras contidas nos tubos de centrífuga, as mesmas foram colocadas sob a sonda do analisador de textura, programado para comprimir a amostra até uma profundidade pré-definida (10milímetros) e retornar à superfície com a mesma velocidade de

0,5mm/s. Decorridos 5 segundos de repouso, uma segunda compressão se iniciou. Apenas as formulações CB 23, CB23-RES, CB24 e CB24-RES puderam ser analisadas devido à viscosidade do material. O teste foi realizado em triplicata.

3.2.3.5 Avaliação *in vitro* da força bioadesiva

Inicialmente, a pele suína dermatomizada foi retirada da geladeira e mantida por aproximadamente 30 minutos em placa de Petri contendo soro fisiológico a 0,9%. Em seguida, a pele foi fixada com elásticos de borracha à sonda cilíndrica do equipamento. Previamente, as formulações foram acondicionadas em tubos de centrífuga (Falcon), levadas para ambientação a uma temperatura de 32°C em banho termostatzado (Tecnall® TE 2005). Neste ensaio, realizado *in vitro*, tem-se o propósito de se saber qual seria a força necessária para se remover a formulação da superfície da pele suína dermatomizada, de forma a mimetizar a pele humana. Para isto, utilizou-se o analisador de textura TA-XT Plus® (Stable Micro Systems) no modo *Adhesion Test*. O teste iniciou-se com o abaixamento da sonda e seu contato com a amostra. Ambos foram mantidos em contato durante 60 segundos e nenhuma interferência foi aplicada no equipamento, na bancada ou no interior da sala durante este período. Em seguida, a sonda se elevou, destacando a pele da amostra. A força necessária para destacar a pele suína da amostra foi calculada pela curva força *versus* tempo. O teste foi realizado para as 12 formulações e em triplicata.

3.2.4 Ensaios de estabilidade físico-química para as formulações obtidas

3.2.4.1 Avaliação visual

As amostras foram observadas visualmente quanto às alterações do tipo cor, separação de fases e homogeneidade durante o período de 30 dias em temperatura ambiente, em local fresco e arejado, protegido da luz direta do sol. Tais características organolépticas, tais como aspecto, cor, sabor e sensação ao tato determinam os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor (BRASIL, 2004). O teste foi realizado em triplicata.

3.2.4.2 Teste de centrífuga

Uma alíquota de 5,0g de cada amostra foi centrifugada a 3000rpm por 30 minutos em centrífuga para se verificar se a amostra se mantém estável, ou seja, sem que haja separação de fases, formação de *caking*, coalescência entre outras (BRASIL, 2004). O teste foi realizado em triplicata.

3.2.4.3 Determinação do pH

Pesou-se 1g de cada amostra e a massa completada para 19g com água deionizada. A leitura foi realizada por meio de um pHmetro e o teste realizado em triplicata.

3.2.5 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade do radical livre DPPH foi analisada de acordo com a metodologia adaptada de RUFINO *et al.* (2007). Inicialmente, preparou-se a solução de DPPH 0,06mM, dissolvendo-se 2,4mg de DPPH em álcool metílico (PA –ACS Chemis[®]), completando-se o volume com álcool metílico para 100mL em um balão. O balão volumétrico foi coberto com folha de alumínio e mantido em refrigeração durante todo o período do ensaio, sendo retirado apenas na necessidade de seu uso. As luzes do laboratório onde o experimento foi realizado se mantiveram apagadas durante todo o procedimento.

A partir de uma solução-mãe contendo 200µg de RES em 4ml de álcool metílico (PA –ACS Chemis[®]) foram obtidas as concentrações de 10µg/mL, 15µg/mL, 20µg/mL, 25µg/mL, 30µg/mL, 35µg/mL e 40µg/mL para a construção da curva padrão do *trans*-resveratrol. Transferiu-se uma alíquota de 0,1ml (100µL) de cada uma das diluições obtidas para frascos pequenos de vidro transparentes (devidamente identificados) e, em seguida, adicionou-se 3,9ml do radical DPPH previamente preparado. Os frascos foram cobertos com folhas de papel alumínio, individualmente. Utilizou-se o álcool metílico como branco. Uma alíquota de 0,1ml (100µL) de álcool metílico foi adicionada a 3,9ml de DPPH para obtenção da absorbância do DPPH. Decorridos aproximadamente 45 minutos de reação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 517nm.

Inicialmente as formulações seriam diluídas em álcool metílico em uma proporção 1:1, 1:5 ou ainda 1:10 dependendo da facilidade de solubilização dos sistemas no solvente. Contudo, durante o preparo dos sistemas, por se notar que as formulações apresentavam fácil

solubilização em álcool metílico, foi sugerida a determinação das densidades de cada uma das amostras para que a massa fosse diretamente pesada, colocada em frascos pequenos de vidro transparentes para receber a solução de DPPH 0,06mM.

Foram obtidas ainda as absorvâncias das formulações: sem o acréscimo de RES, após o acréscimo de 60µg de RES, com acréscimo de 100µg de RES, com adição de BHT a 0,1%, com adição de 60µg de RES + BHT a 0,1%. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.2.6 Avaliação da atividade despigmentante

O ensaio da reação enzimática da tirosinase foi realizado de acordo com metodologia adaptada de MACRINI *et al.* (2009). O AK foi utilizado como controle positivo neste ensaio. Em microplacas de 96 poços foram adicionadas solução tampão pH 6,8, substrato tirosina, enzima tirosinase e as diferentes soluções (água como branco, ácido kójico nas diferentes concentrações como controle positivo, soluções de RES, formulações sem adição de RES, as formulações contendo RES). As concentrações das soluções de RES e das formulações antes e após a incorporação do RES foram 80.0, 40.0, 20.0, 10.0 e 5.0µg.ml⁻¹.

O primeiro ensaio foi realizado com tirosinase a 120U.mL⁻¹ e tempo de incubação das microplacas em estufa foi de 120 minutos para análise da sensibilidade das amostras. Num segundo momento, as amostras que demonstraram sensibilidade no primeiro ensaio foram colocadas para reagir com tirosinase a 480U.mL⁻¹ e tempo de incubação das microplacas por 60 minutos. A determinação da atividade inibitória do AK a 50%, ou seja, seu AI₅₀ ocorreu em dois pilares:

- A primeira, realizada com tirosinase a 120U.mL⁻¹ e com as seguintes concentrações de AK 5.0, 4.0, 3.0, 2.5, 1.25, 0.625 e 0.3125µg.ml⁻¹.
- A segunda, realizada com tirosinase a 480U.mL⁻¹ e com as seguintes concentrações de AK 10.0, 5.0, 2.5, 1.25 e 0.625µg.ml⁻¹.

A absorvância foi medida a 490nm em ELISA no início da reação (tempo zero) e ao fim de 60 minutos e 120 minutos, incubadas em estufa a 30 ± 1 °C. A atividade inibitória foi obtida e os valores comparados aos obtidos para o ácido kójico.

3.2.7 Análise estatística

A análise dos dados obtidos nos diferentes ensaios mencionados anteriormente foi realizada pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Turkey com nível de significância de $p < 0,05$. Foi utilizado o software Graph Pad Prisma, versão 5.01, 2007.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção do diagrama de fases ternário

A construção do diagrama de fases ternário se torna uma ferramenta para caracterizar em que condições experimentais os sistemas nanoestruturados existem e em que proporções os componentes presentes nas formulações geram separação de fases, microemulsões O/A ou A/O, fases líquido-cristalinas e emulsões (FORMARIZ *et al.*, 2005).

O diagrama de fases ternário dos sistemas S1 (óleo de Copaíba), S2 (DC[®] 193) e S3 (óleo de Abacate) foram construídos utilizando-se o programa SigmaPlot[®] 10.0. Os pontos do diagrama variaram de 1 a 36, iniciando sua contagem na base da pirâmide, da esquerda para a direita. As Figuras 3, 5 e 6 apresentam os diagramas de fases ternário dos sistemas S1, S3 e S2.

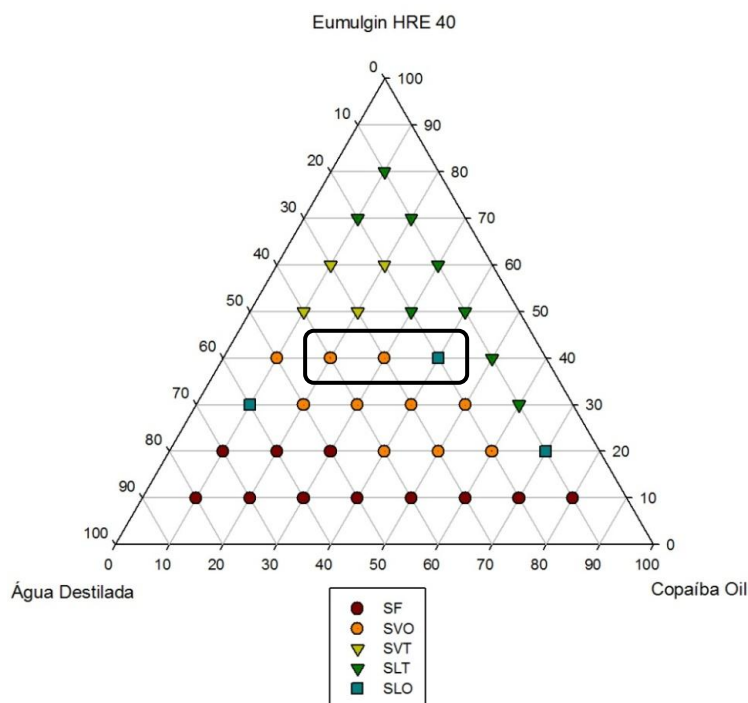


Figura 3. Diagrama de Fases Ternário do sistema contendo óleo de Copaíba e Eumulgin[®] HRE40. SF – sistema de fases; SVO – sistema viscoso opaco; SVT – sistema viscoso transparente/translúcido; SLT – sistema líquido transparente/translúcido; SLO – sistema líquido opaco.

Ao se observar as classificações acima obtidas, foram sugeridas a preparação e a análise dos pontos intermediários compreendidos ente o ponto 20 e o ponto 36 do sistema contendo óleo de Copaíba e Eumulgin[®] HRE40, totalizando 52 sistemas intermediários. O diagrama está representado na Figura 4.

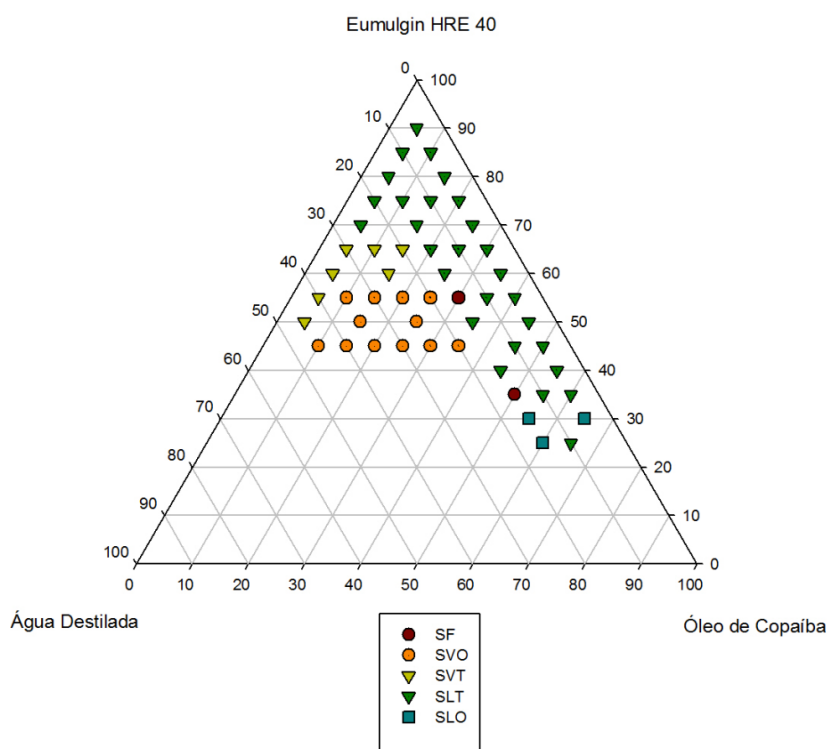


Figura 4. Diagrama de Fases Ternário do sistema contendo óleo de copaíba e Eumulgin[®] HRE40. Desenvolvimento dos 52 pontos intermediários. SF – sistema de fases; SVO – sistema viscoso opaco; SVT – sistema viscoso transparente/translúcido; SLT – sistema líquido transparente/translúcido; SLO – sistema líquido opaco.

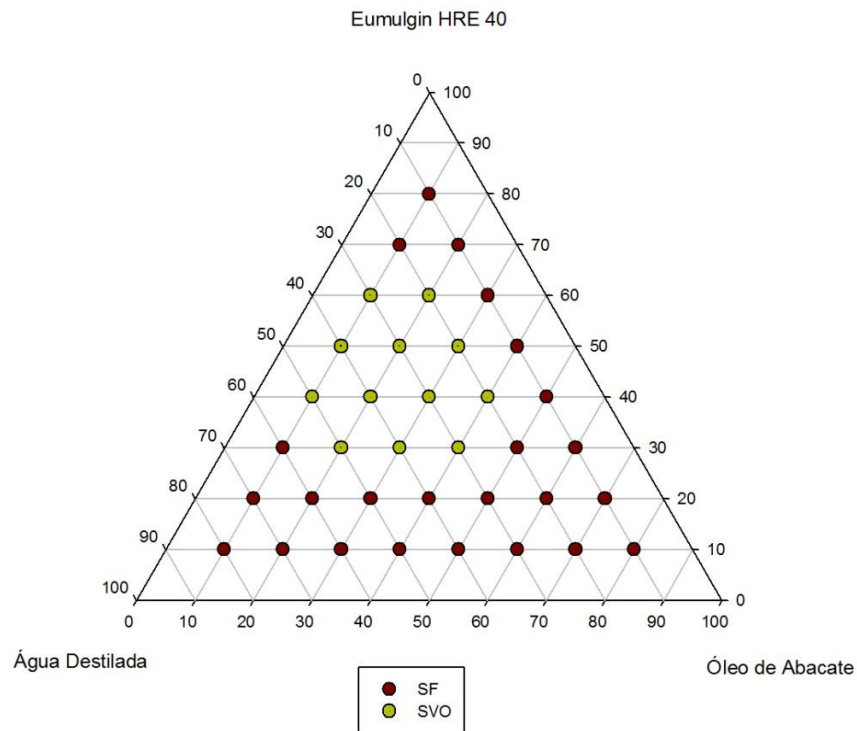


Figura 5. Diagrama de Fases Ternário do sistema contendo óleo de abacate e Eumulgin® HRE40. SF – sistema de fases; SVO – sistema viscoso opaco; SVT – sistema viscoso transparente/translúcido; SLT – sistema líquido transparente/translúcido; SLO – sistema líquido opaco.

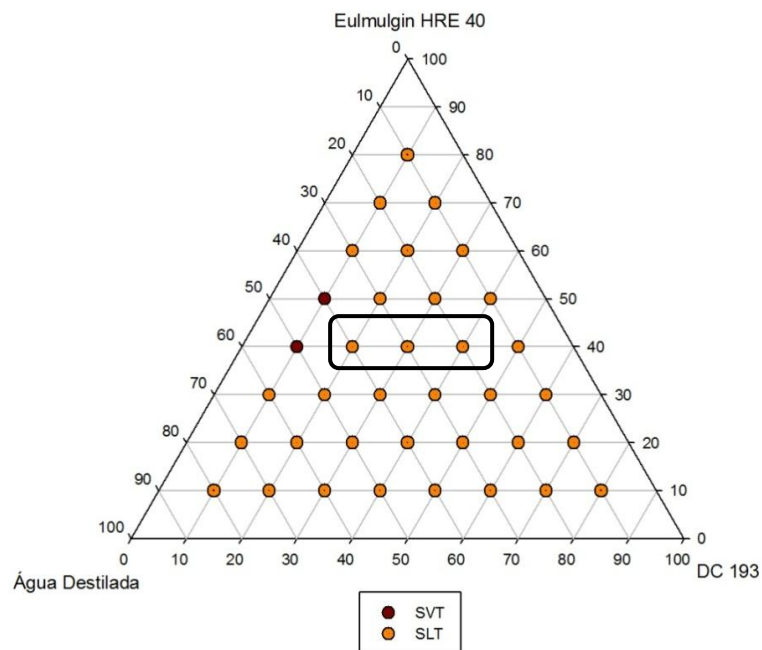


Figura 6. Diagrama de Fases Ternário do sistema contendo DC® 193 fluido e Eumulgin® HRE40. SF – sistema de fases; SVO – sistema viscoso opaco; SVT – sistema viscoso transparente/translúcido; SLT – sistema líquido transparente/translúcido; SLO – sistema líquido opaco.

Com base nos resultados obtidos, o sistema S3 contendo óleo de abacate foi descartado por ter formado apenas regiões opacas ou com separação de fases. Para o sistema S1, obtiveram-se regiões transparentes/translúcidas com concentrações de tensoativo acima de 40%. Para o sistema S2, observaram-se regiões transparentes/translúcidas para todos os pontos.

Assim sendo, como forma de comparação dos sistemas contendo óleo de copaíba e silicone, foram escolhidos os pontos 23, 24 e 25 (selecionados nas Figuras 3 e 6) de cada um dos sistemas S1 e S2 (totalizando seis formulações) do diagrama de fases ternário para dar continuidade às análises de caracterização estrutural e estabilidade físico-química.

4.2 Caracterização estrutural dos sistemas selecionados

4.2.1 Microscopia de luz polarizada

As formulações visualmente transparentes/ translúcidas dos sistemas S1 e S2 foram analisadas em microscópio de luz polarizada. As amostras que representam o sistema S1 foram denominadas de CB (copaíba) e as amostras que representam o sistema S2 foram denominadas de DC (DC[®] 193). Os resultados das micrografias obtidas com aumento de 20X estão representados nas Figuras de 7 a 18.

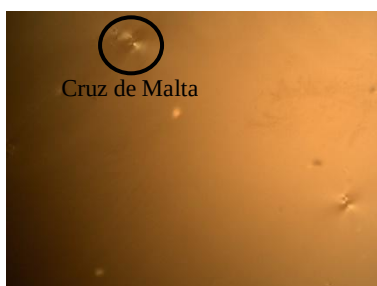


Figura 7. Fotomicrografia da formulação CB- 23.



Figura 8. Fotomicrografia da formulação CB- 24.

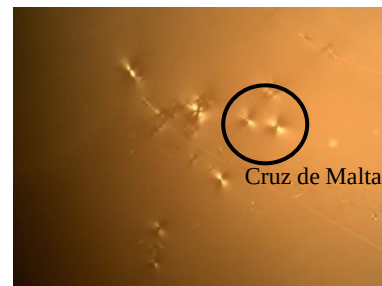


Figura 9. Fotomicrografia da formulação CB- 25.



Figura 10. Fotomicrografia da formulação DC- 23.

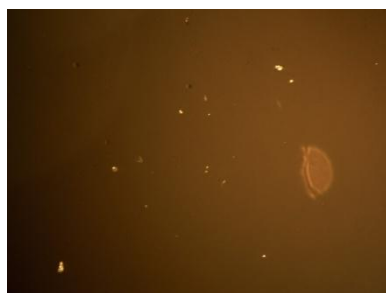


Figura 11. Fotomicrografia da formulação DC- 24.



Figura 12. Fotomicrografia da formulação DC- 25.



Figura 13. Fotomicrografia da formulação CB-23-RES.



Figura 14. Fotomicrografia da formulação CB-24-RES.



Figura 15. Fotomicrografia da formulação CB-25-RES.

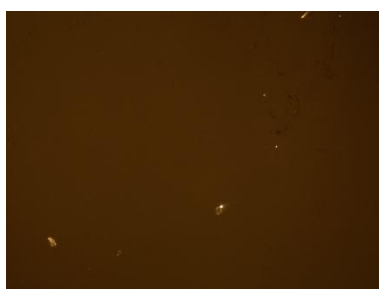


Figura 16. Fotomicrografia da formulação DC-23-RES.



Figura 17. Fotomicrografia da formulação DC-24-RES.



Figura 18. Fotomicrografia da formulação DC-25-RES.

Sabe-se que o microscópio de luz polarizada propaga um feixe de luz em uma única direção pelo fato de haver um sistema polarizador de luz. Uma maneira de se classificar as fases líquido-cristalinas é determinar sua isotropia óptica, através da microscopia de luz polarizada (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Quando uma formulação for capaz de alterar a direção da luz polarizada, diz-se que esta é anisotrópica, e quando a formulação não for capaz de desviar o plano de luz, esta é

classificada como isotrópica. As mesofases lamelares e hexagonais (caracterizadas, respectivamente, por ‘cruz de malta’ e estrias) são anisotrópicas, enquanto as cúbicas (identificadas por campo escuro) são isotrópicas.

Verificou-se que os pontos CB-23, CB-24 e CB-25 representados, respectivamente pelas Figuras 7, 8 e 9 apresentaram fases líquido-cristalinas lamelares em sua estrutura, evidenciado pela presença de estruturas semelhantes a ‘cruz de malta’, sendo estas características da fase lamelar.

Ao se verificar as micrografias das amostras DC-23, DC-24, DC-25, DC-23-RES, DC-24-RES e DC-25-RES, identificados pelas Figuras 10, 11, 12, 16, 17 e 18, constata-se que são isotrópicas, ou seja, não desviaram o plano de luz. Esse fato sugere que houve formação de sistemas microemulsionados, uma vez que houve adição de baixa concentração de tensoativo e apresentação de baixa tensão superficial (SCHICK, SHIK, 1987). No entanto, respostas mais conclusivas podem ser obtidas pela associação da microscopia de luz polarizada com o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).

Embora não tenha sido constatada nenhuma alteração na viscosidade, observou-se a presença de campo escuro para as amostras CB-23-RES, CB-24-RES e CB-25-RES (Figuras 13 a 15). Segundo KLEIN (2002), a estabilidade está relacionada com a temperatura à qual o produto é exposto, podendo haver a destruição de estruturas lamelares quando as formulações são expostas a temperaturas elevadas. Deduz-se que esta alteração pode ter ocorrido pela exposição à alta temperatura durante o preparo das formulações.

4.2.2 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

No espalhamento de raios-X, é possível obter informações como, por exemplo, de que modo os átomos se agrupam, a distância inter-atômica e ângulo, por meio da medida da variação na intensidade do espalhamento dos raios-X em função do ângulo de espalhamento θ . O SAXS é utilizado para detectar espalhamento em ângulos $\theta < 10^\circ$, que corresponde à distância interplanar com dimensões nanométricas. Esta faixa de tamanho contém informações sobre a forma, o tamanho e a estrutura interna de macromoléculas e estruturas maiores, tais como as encontradas em cristais-líquidos liotrópicos (DONG, BOYD, 2011).

Sabe-se que de acordo com a razão entre as distâncias dos picos das curvas de SAXS dos sistemas líquido cristalinos, é possível determinar qual o tipo de mesofase liotrópica (estrutura cúbica, hexagonal ou lamelar) da formulação. No entanto, para sua identificação são necessários, no mínimo, três picos definidos.

Para a estrutura lamelar, a posição relativa dos picos, em relação ao primeiro pico mais intenso, obedece a relação 1:2:3, respectivamente, enquanto que, a relação 1:1,73:2,65 é característica da periodicidade hexagonal, indicando cristal líquido de estrutura hexagonal (LI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2008). Já para a estrutura cúbica, a relação esperada é 1,41:1,73:2,83:3 (YARIV *et al.*, 2010). Para as microemulsões, as curvas de SAXS são um único pico amplo e alongado (FANUN *et al.*, 2001).

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos na MLP, as medidas de SAXS foram realizadas, fornecendo assim resultados mais precisos quanto à estrutura das formulações CB-23, CB-24, CB-25, DC-23, DC-24 e DC-25 sem a incorporação de RES.

As Figuras 19 e 20 mostram as curvas das intensidades de espalhamento em função do vetor (q) de espalhamento. A Tabela 2 descreve os valores de espalhamento $q_{\text{máx}}$ (Å⁻¹), a razão entre as distâncias interplanares e a estrutura das formulações.

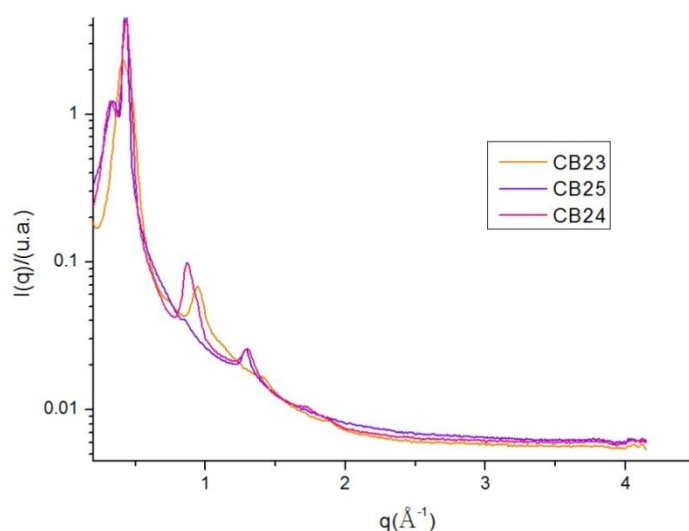


Figura 19. Avaliação estrutural das amostras CB-23, CB-24 e CB-25 do sistema S1, por SAXS.

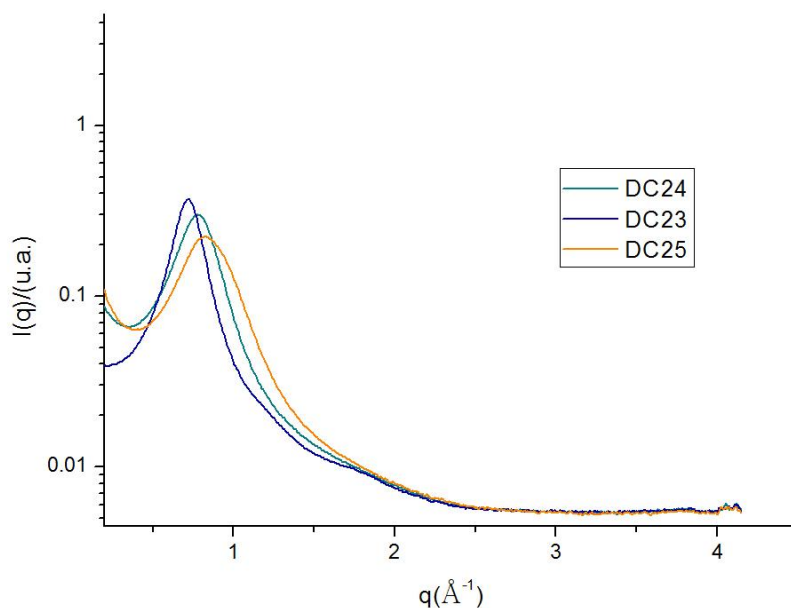


Figura 20. Avaliação estrutural das amostras DC-23, DC-24 e DC-25 do sistema S2, por SAXS.

Tabela 2. Valores de espalhamento $q_{\text{máx}}$ (Å⁻¹) e razão entre as distâncias interplanares das formulações.

Formulação	$q_{\text{máx1}}$	$q_{\text{máx2}}$	$q_{\text{máx3}}$	d_2/d_1	d_3/d_1	Estrutura
CB-23	0,425	0,940	---	2,21	---	Lamelar
CB-24	0,427	0,867	1,293	2,03	3,03	Lamelar
CB-25	0,425	0,850	1,292	2,00	3,04	Lamelar
DC-23	0,718	---	---	---	---	Microemulsão
DC-24	0,776	---	---	---	---	Microemulsão
DC-25	0,821	---	---	---	---	Microemulsão

Com base nas Figuras 19 e 20 e nos valores obtidos na Tabela 2, foram identificadas as mesofases líquido-cristalinas presentes nas formulações CB-23, CB-24 e CB-25. Pelo fato de haver apenas dois picos para a formulação CB-23, é difícil se determinar com segurança qual a estrutura da mesofase líquido-cristalina. No entanto, a formulação foi considerada lamelar, devido ao resultado associado à MLP. Ainda, por meio desta técnica, foi possível a confirmação dos resultados obtidos na MLP das formulações DC-23, DC-24 e DC-25, as quais foram confirmadas como microemulsões.

4.2.3 Análise reológica

Com a crescente demanda do mercado cosmético, estudos de estabilidade são cada vez mais exigidos para produtos de uso tópico. As características reológicas devem ser consideradas na fabricação, armazenamento e aplicação de produtos de uso tópico, bem como para avaliar a natureza físico-química de veículos e determinar a estabilidade do material ou produto auxiliando na determinação do prazo de validade. O comportamento reológico utiliza um gráfico de tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, por um determinado período de tempo para a curva ascendente e o mesmo tempo para a curva decrescente, sob temperatura controlada (ISAAC *et al.*, 2008).

Define-se a reologia como sendo o estudo do escoamento ou deformação do material quando submetido a uma tensão. O método é aplicável na caracterização de sistemas, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema (WOOD, 1986; SCOTT, 2000).

Com base na curva ascendente, o comportamento de fluxo pode ser newtoniano ou não newtoniano. Caso não seja newtoniano, pode ser classificado ainda em pseudoplástico, dilatante ou plástico. Com base na curva descendente, o material pode ser classificado como tixotrópico ou reopético (SCHRAMM, 2006).

Os newtonianos são aqueles em que a viscosidade não é afetada por mudanças da taxa de cisalhamento. Apresentam apenas efeitos de atrito mecânico e o nível energético dessas interações está próxima do nível energético para ruptura e formação de pontes de hidrogênio em um líquido. O fluido newtoniano ideal é uma função linear da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento (SCHRAMM, 2006).

Sabe-se que um dos pontos relevantes para a aderência do consumidor ao produto cosmético é a aparência, o primeiro contato com a pele, espalhabilidade e a oleosidade residual após a aplicação (MAZZARINO, KNORST, 2007). Alguns estudos (MILAN *et al.*, 2007; CORRÊA *et al.*, 2005) indicam que o comportamento pseudoplástico é apropriado para produtos de aplicação tópica, pois ocorre uma facilidade de aplicação em decorrência da diminuição gradual da viscosidade aparente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento.

No comportamento tixotrópico, há uma melhor espalhabilidade da formulação na região aplicado, pois há fluidez do veículo quando este é submetido a uma pressão externa e este recupera a viscosidade inicial assim que cessado a aplicação, impedindo que o produto

escorra. O produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira, pois durante seu armazenamento, este apresenta viscosidade constante, dificultando a separação dos constituintes. Ainda, é interessante um valor de tixotropia não muito alto para que o produto não escorra sobre a pele após a aplicação, mas também não muito baixo, pois pode levar a uma baixa espalhabilidade do produto não permitindo uma distribuição uniforme sobre a pele (CORRÊA *et al.*, 2005).

No comportamento reopético, os materiais apresentam aumento da viscosidade durante o cisalhamento, e recuperação da forma original quando o cisalhamento for diminuído. Na curva de fluxo de um sistema com reopexia, a curva descendente volta acima da curva ascendente, no sentido anti-horário da curva (SCHRAMM, 2006).

No comportamento plástico, o escoamento só ocorre após uma determinada tensão mínima, também chamada de ponto de fluidez, não tecnicamente alcançável. O fluxo dilatante é aquele em que a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento (MAZZARINO, KNORST, 2007).

Segundo alguns estudos, FASOLIN (2012), ROSSI (2007) as microemulsões se comportam como fluídos newtonianos como consequência de seu pequeno diâmetro de partícula e, portanto, não podem ser desestruturadas pela tensão de cisalhamento.

As Figuras de 21 a 32 indicam o comportamento das formulações estudadas CB-23, CB-24, CB-25, DC-23, DC-24 e DC-25, antes e após a incorporação de RES. As Figuras de 33 a 36 mostram a comparação dos sistemas S1 e S2, antes e após a incorporação do RES.

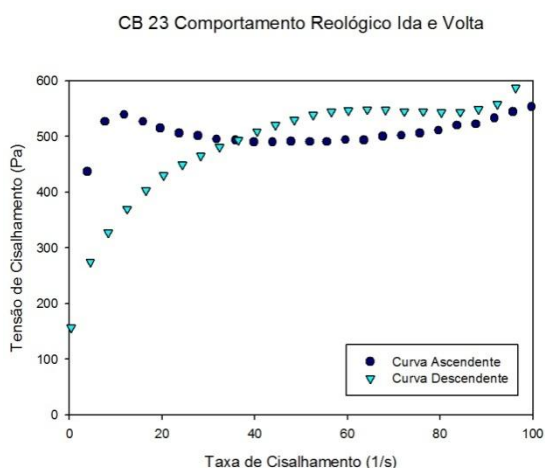


Figura 21. Reograma da formulação CB-23.

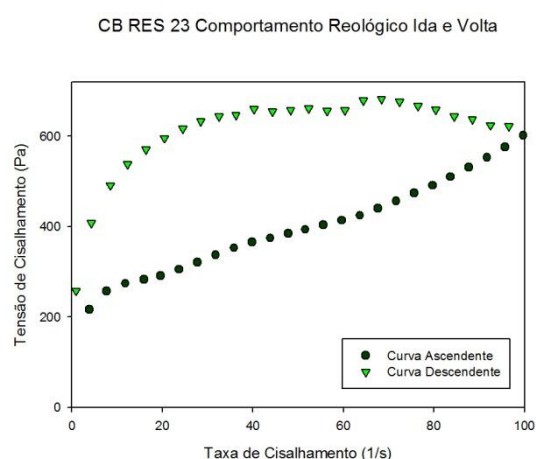


Figura 22. Reograma da formulação CB-23-RES.

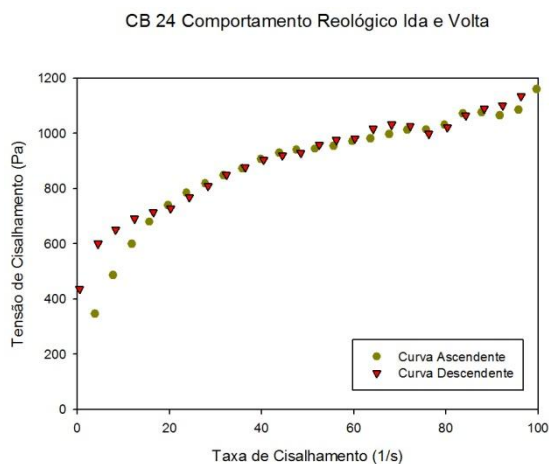


Figura 23. Reograma da formulação CB-24.

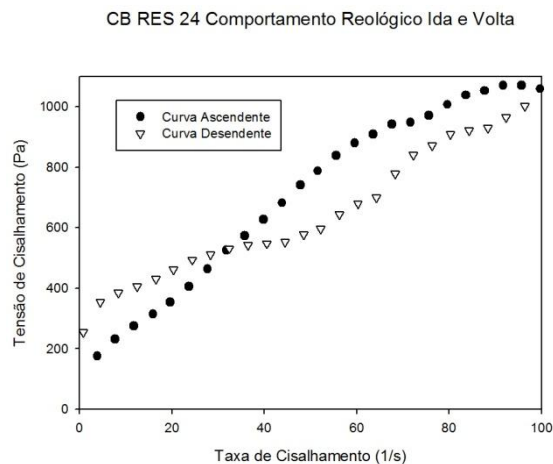


Figura 24. Reograma da formulação CB-24-RES.

É possível analisar através das Figuras de 21 a 24 que houve uma diminuição da tensão superficial quando foi incorporado o RES nas formulações. Ainda, é observável que as quatro formulações necessitaram de uma tensão inicial para começar a escoar, sendo a relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento não linear.

Há indícios, portanto, de que se trata de um fluido Herschel-Bulkley, ou seja, fluidos não newtonianos independentes do tempo com tensão de cisalhamento inicial (NASCIMENTO, 2008). No entanto, há poucos estudos na literatura deste comportamento reológico vinculado a sistemas de liberação controlada de fármacos.

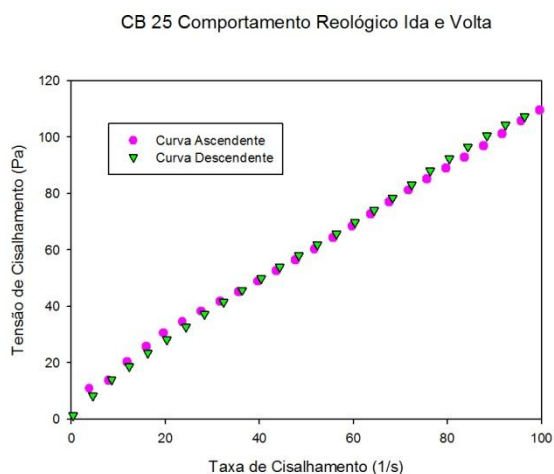


Figura 25. Reograma da formulação CB-25.

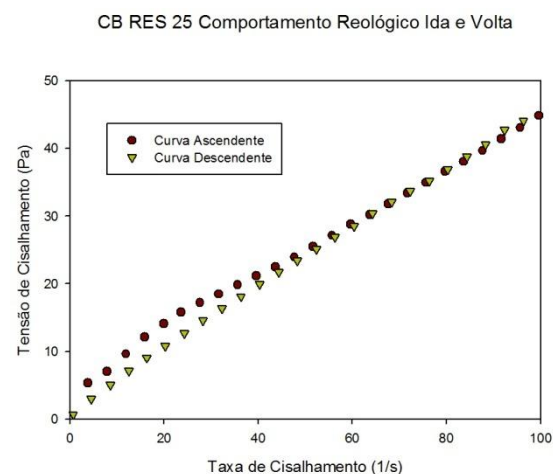


Figura 26. Reograma da formulação CB-25-RES.

Ao observar as curvas de fluxo acima, nota-se que as Figuras 25 e 26 apresentam fluxo não newtoniano, sendo que a Figura 25 se comporta como fluido pseudoplástico. A Figura 26 apresenta uma pequena área de histerese, sendo tixotrópico dependente do tempo, necessitando de um tempo maior para retornar à sua estrutura inicial.

Para as Figuras 21 a 26, foi possível verificar que a incorporação de RES resultou no aumento da área de histerese, havendo, portanto, o aumento na deformação das estruturas sob determinada tensão. A área de histerese está intimamente relacionada com o aumento na microestrutura das redes líquido-cristalinas, sendo ela influenciada pela presença de cristais líquidos (CHORILLI 2007).

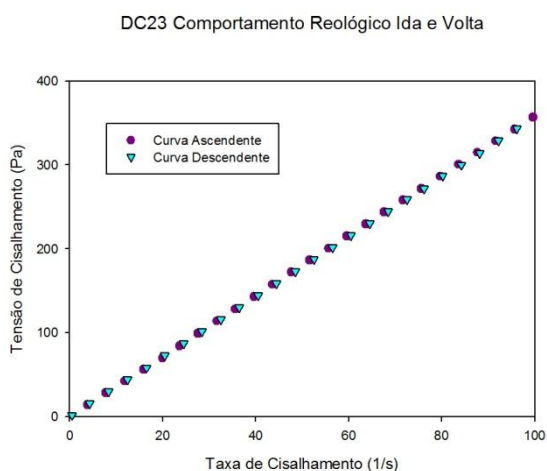


Figura 27. Reograma da formulação DC-23.

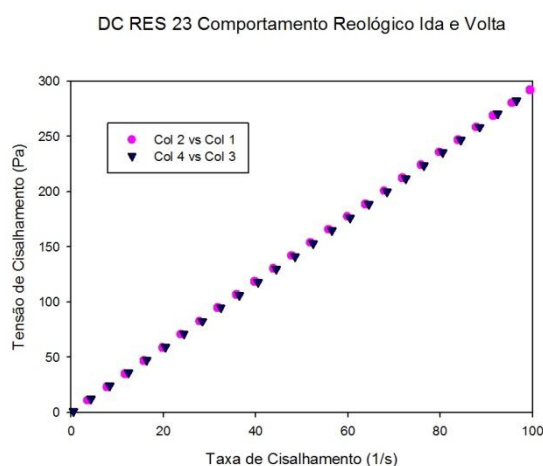


Figura 28. Reograma da formulação DC-23-RES.

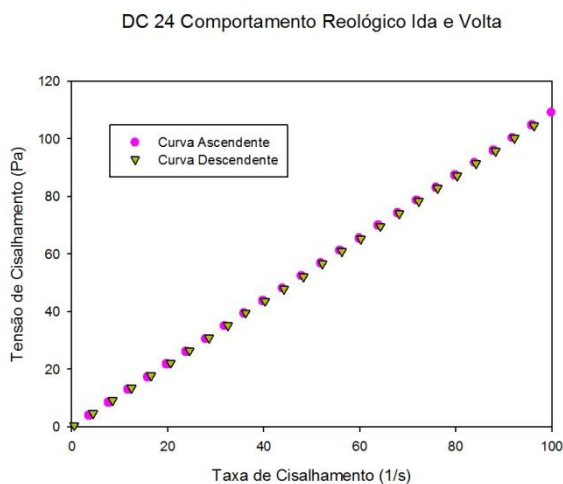


Figura 29. Reograma da formulação DC-24.

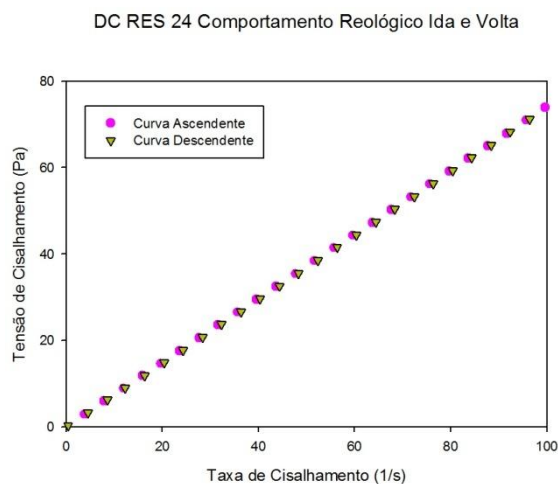


Figura 30. Reograma da formulação DC-24-RES.

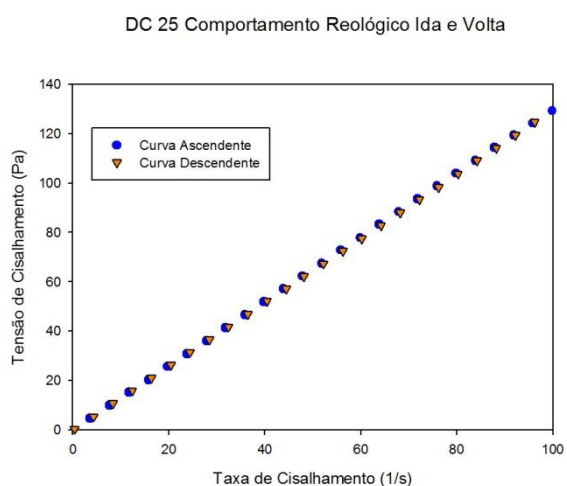


Figura 31. Reograma da formulação DC-25.

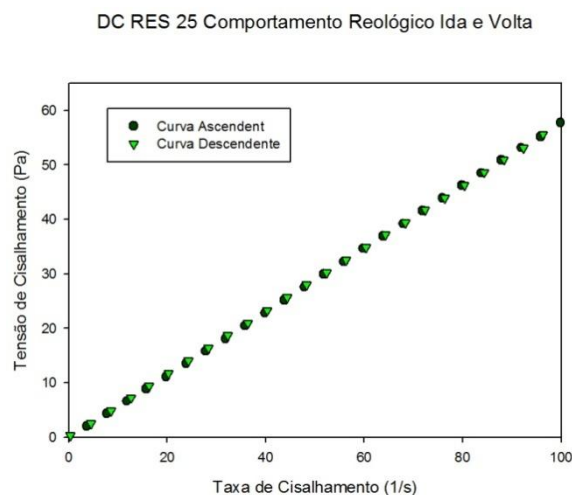


Figura 32. Reograma da formulação DC-25-RES.

As formulações do sistema S2, representados pelas Figuras 27 a 32, se mostraram, em todos os casos, como fluidos newtonianos. Esse resultado confirma os dados obtidos na caracterização estrutural, ou seja, tratam-se de microemulsões.

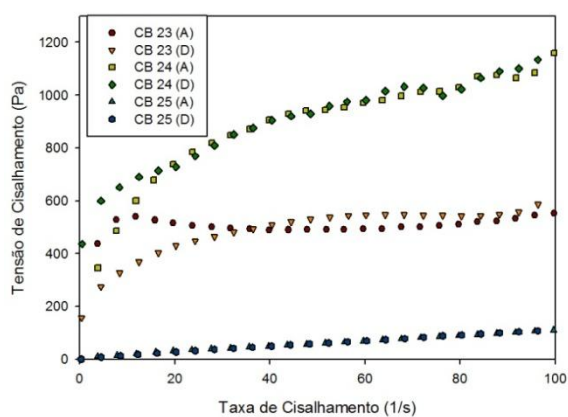


Figura 33. Reograma de comparação das formulações S1 (óleo de Copaíba).

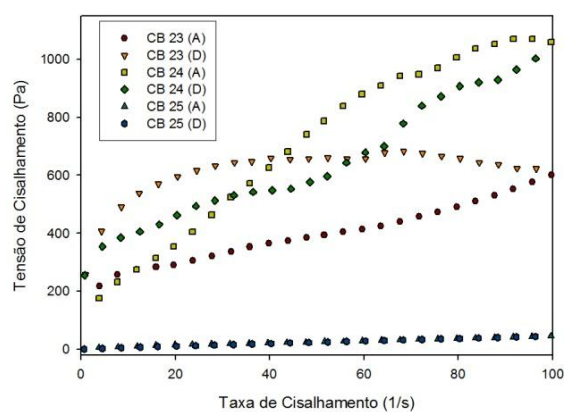


Figura 34. Reograma de comparação das formulações S1-RES.

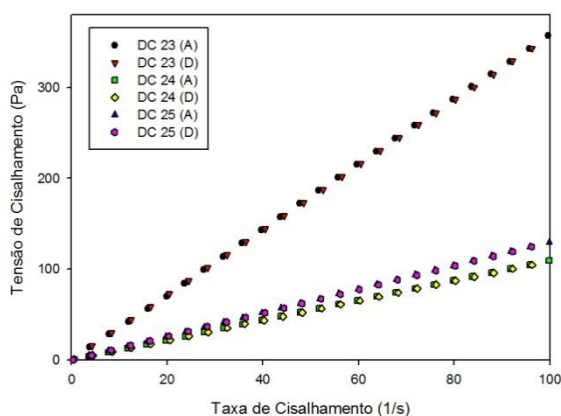


Figura 35. Reograma de comparação das formulações S2 (DC[®] 193).

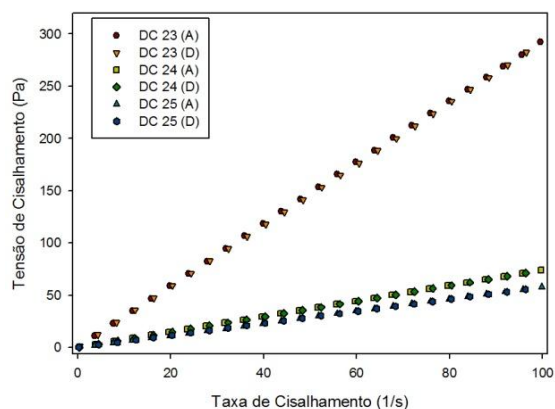


Figura 36. Reograma de comparação das formulações S2-RES.

A partir dos resultados obtidos nas Figuras 35 e 36, pode ser confirmada a estrutura das formulações do sistema S2 como sendo sistemas microemulsionados. Já as formulações do sistema S1 tiveram comportamentos reológicos distintos. As formulações CB-23, CB-24, CB-23-RES e CB-24-RES apresentam resultados peculiares, sugerindo ser fluidos Herschel-Bulkley; já a formulação CB-25 apresentou comportamento pseudoplástico, enquanto a formulação CB-25-RES apresenta comportamento tixotrópico.

Por fim, observou-se que as formulações do sistema S1 apresentaram maior área de histerese após a incorporação do RES nas formulações, o que significa que o sistema se desorganizou durante o cisalhamento e demorou mais tempo para retornar à estrutura inicial, representando maior possibilidade do ativo ser liberado do sistema.

4.2.4 Análise do perfil de textura

O desenvolvimento de produtos tópicos exige atributos desejáveis que contribuam para a aceitação do consumidor e demonstrem a eficácia clínica definida. Estes incluem as propriedades mecânicas, bioadesão adequada, viscosidade adequada, entre outros. Contudo, em condições fisiológicas, os produtos de aplicação tópica estão sujeitas a diversas forças de cisalhamento, por isso, se faz necessário análise das propriedades mecânicas dos produtos, e isto é realizado pela análise do perfil de textura (JONES, WOOLFSON, BROWN, 1997).

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

A dureza é a força necessária para se atingir uma determinada deformação; a compressibilidade é o trabalho requerido para se deformar um produto; a adesividade é o trabalho necessário para vencer as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da sonda do equipamento, conhecida como probe. Assim sendo, estes parâmetros indicam, respectivamente, a facilidade de aplicação da formulação, a facilidade de espalhamento desta sobre a superfície e a bioadesão. A adesividade pode em alguns casos, envolver a quebra de ligações coesivas na formulação, sendo em partes dependente da composição da amostra. (JONES, WOOLFSON, BROWN, 1997; SENYIGIT *et al.*, 2011).

A análise de perfil de textura foi realizada apenas para as formulações CB-23 e CB-24, pois estas apresentam resistência mecânica ao fluxo. As demais formulações, por não apresentarem resistência mecânica ao fluxo, não obtiveram resultados para a análise de perfil de textura. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 3.

Os dados apresentados na Tabela 3 foram analisados estatisticamente pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de Turkey com nível de significância de $p < 0,05$ e verificou-se que todos os parâmetros de dureza, compressibilidade, adesividade e coesão não apresentaram diferença significativa entre si.

Tabela 3. Propriedades mecânicas das formulações determinadas através da análise de perfil de textura. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão, à temperatura de 32° C.

Sistemas	Dureza (mN)	Compressibilidade (mN.s)	Adesividade (mN.s)	Coesão
CB-23	599,7 $\pm$ 25,0	8225,0 $\pm$ 210,9	6590,8 $\pm$ 284,6	0,817 $\pm$ 0,044
CB-23-RES	361,3 $\pm$ 51,4	4932,3 $\pm$ 75,7	2234,6 $\pm$ 71,3	0,752 $\pm$ 0,004
CB-24	188,3 $\pm$ 10,1	2369,7 $\pm$ 227,6	1627,5 $\pm$ 73,9	0,826 $\pm$ 0,034
CB-24-RES	86,0 $\pm$ 1,0	1366,3 $\pm$ 70,8	910,7 $\pm$ 3,5	0,737 $\pm$ 0,052

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que as formulações contendo RES tiveram suas propriedades mecânicas reduzidas quando comparadas com as formulações controle, sugerindo que a incorporação do RES pode facilitar a aplicação, o espalhamento da amostra e a bioadesão da formulação à pele.

4.2.5 Avaliação *in vitro* da força bioadesiva

A vantagem de se utilizar sistemas bioadesivos é prolongar o tempo de permanência do fármaco no local de aplicação, neste caso, a pele. Esse contato diminui a frequência de aplicação do produto, aumenta a biodisponibilidade do fármaco e a aderência do consumidor ao produto (SMART *et al.*, 2003; BONACUCINA *et al.*, 2006).

Segundo VILLANOVA e ORÉFICE (2010), polímeros bioadesivos são materiais capazes de se ligarem a substratos biológicos, podendo fazê-lo por meio da aderência à membrana celular, chamados também de citoadesivos. A bioadesão é uma propriedade muito explorada, pois pode diminuir a toxicidade de fármacos em virtude da diminuição da concentração de ativo e pode ocorrer em sítios específicos.

As forças bioadesivas necessárias para remover as formulações a partir da pele dermatomizada suína estão descritas na Tabela 4:

Tabela 4. Trabalho da força bioadesiva (N) das formulações. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão, à temperatura de 32° C.

Sistemas		Força bioadesiva (mN)	Sistemas		Força bioadesiva (mN)
	CB-23	94,972 $\pm$ 5,646	CB-23-RES		80,565 $\pm$ 5,551
Óleo de	CB-24	38,648 $\pm$ 1,880	CB-24-RES		20,303 $\pm$ 0,319
Copaíba	CB-25	5,524 $\pm$ 0,062	CB-25-RES		5,021 $\pm$ 0,108
Silicone	DC-23	5,770 $\pm$ 0,103	DC-23-RES		5,449 $\pm$ 0,385
Fluido	DC-24	4,809 $\pm$ 0,103	DC-24-RES		4,596 $\pm$ 0,103
DC [®] 193	DC-25	4,596 $\pm$ 0,103	DC-25-RES		4,276 $\pm$ 0,108

Os dados apresentados na Tabela 4 foram analisados estatisticamente e verificou-se que a força bioadesiva entre as formulações CB e DC, sem ou com a incorporação de RES, não demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre si.

Notou-se uma redução da força bioadesiva das formulações de CB-23 ao CB-25, com a diminuição da concentração de água e aumento da concentração de óleo de copaíba. Este resultado é interessante, pois com a menor intensidade da adesão (como o caso da formulação

CB-25), evita-se uma interação excessiva entre a formulação e a pele que dificulte a remoção do sistema e, conseqüentemente, cause irritação e abrasão à pele.

Já nos sistemas contendo o silicone DC[®] 193, observou-se que as interações entre o tensoativo, a água e o silicone ocorrem de tal forma que a força bioadesiva se manteve praticamente estável, mesmo com a alteração das concentrações de água e silicone.

4.3 Ensaios de estabilidade físico-química para as formulações obtidas

4.3.1 Avaliação visual

Durante o período de 30 dias de observação não foi observada nenhuma alteração de cor, homogeneidade, contaminação fúngica aparente ou aparecimento de separação de fases nas formulações, mesmo após a incorporação do RES. As fotografias da avaliação visual estão presentes na Figura 37.

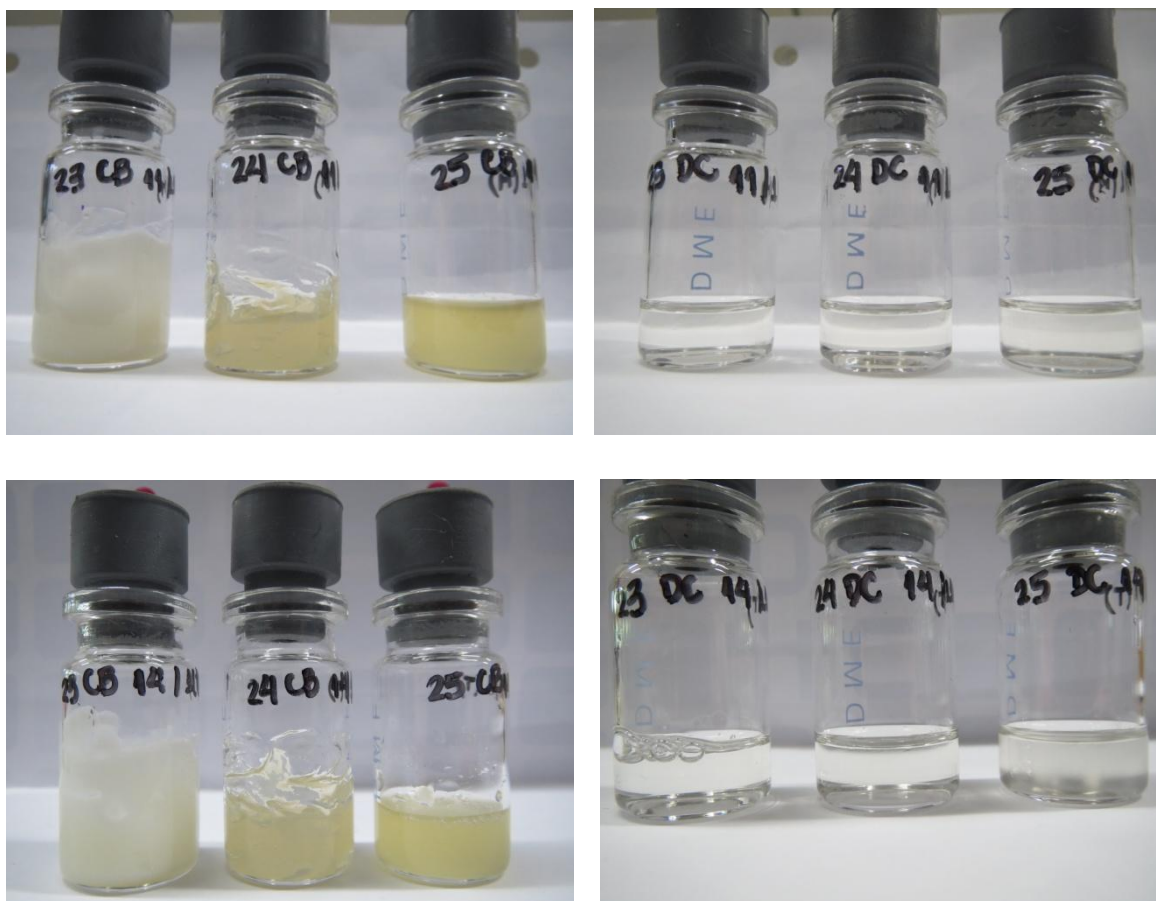


Figura 37. Avaliação visual das formulações CB-23, CB-24, CB-25, DC-23, DC-24 e DC-25, respectivamente, antes e após um período de um mês (30 dias).

4.3.2 Teste de centrífuga

As amostras não sofreram alteração após o teste de centrífuga, mesmo após a incorporação do RES, com exceção de uma das formulações, o CB-25. Este indicou uma leve separação de fase, visível pela diferença de tonalidade bege da amostra. Isso pode ter ocorrido devido a uma má homogeneização desta formulação durante seu preparo.

4.3.3 Determinação do pH

A pele apresenta pH levemente ácido, em torno de 4,6 a 5,8, contribuindo para a proteção bactericida e fungicida em sua superfície. Do ponto de vista cosmético e/ou dermatológico, o controle do pH das formulações se faz necessário para evitar a abrasão de substâncias e para se evitar a utilização de produtos tópicos inadequados (LEONARDI, GASPAR, CAMPOS, 2002). A Tabela 5 apresenta o valor de pH das formulações.

Tabela 5. Valores referentes ao pH, respectivamente, das amostras controle e das amostras contendo RES, 24 horas após a preparação em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Amostras Controle	pH	Amostras com RES	pH
CB-23	$5,02 \pm 0,01$	CB-23	$5,02 \pm 0,01$
CB-24	$4,73 \pm 0,01$	CB-24	$4,74 \pm 0,02$
CB-25	$4,64 \pm 0,02$	CB-25	$4,66 \pm 0,01$
DC-23	$4,90 \pm 0,02$	DC-23	$4,92 \pm 0,02$
DC-24	$4,41 \pm 0,01$	DC-24	$4,42 \pm 0,02$
DC-25	$4,31 \pm 0,02$	DC-25	$4,31 \pm 0,02$

Observou-se que a incorporação do RES não altera o pH das formulações. Foi possível concluir que o fato de a formulação ser ou não acrescida de RES não contribuiu para a alteração do pH cutâneo, uma vez que as formulações se encontram dentro da faixa de pH da pele, indicando que estes veículos seriam adequados ao uso cosmético.

4.4 Avaliação da atividade antioxidante

Antioxidantes são substâncias químicas que reduzem ou previnem a oxidação. Os métodos mais comumente utilizados para se determinar a capacidade antioxidante diferem em termos dos princípios de ensaio e das condições experimentais, culminando em dois grandes grupos: ensaios baseados na reação de transferência de um único elétron monitorado pela mudança de coloração enquanto o oxidante é reduzido; e os ensaios baseados na reação de transferência de um átomo de hidrogênio, onde o antioxidante e o substrato competem pelo radical livre (LUCAS-ABELLÁN *et al.*, 2011).

O ensaio com o radical DPPH é um ensaio baseado na transferência de um único elétron monitorado pela mudança de coloração. O DPPH é um radical livre estável com a faixa de absorção em torno de 515nm. Quando o elétron é transferido ao elétron desemparelhado do radical DPPH, a absorbância decresce de maneira proporcional ao aumento da forma não radical do DPPH (GÜLÇİN, 2010; LUCAS-ABELLÁN *et al.*, 2011).

Com base nos estudos de estabilidade físico-química e na caracterização estrutural dos sistemas, constatou-se que as formulações CB-23 e CB-24 não apresentaram boa aparência, boa viscosidade, boa bioadesão, propriedades mecânicas adequadas e nem um comportamento reológico adequado para aplicação tópica. Por esta razão, foram descartadas dos estudos da avaliação da atividade antioxidante e da atividade despigmentante.

Sabendo-se que houve a incorporação de 100µM de RES em cada formulação de 2 gramas, em cada formulação há aproximadamente 50µg de RES, ou seja, há uma concentração de 25µg de RES por grama de formulação (25µg/g). Inicialmente a curva padrão para o RES foi construída a partir de uma solução mãe contendo 200µg de RES em 4mL de álcool metílico. Com base na preparação da solução mãe foram obtidas as concentrações de 10µg/mL, 15µg/mL, 20µg/mL, 25µg/mL, 30µg/mL, 35µg/mL e 40µg/mL.

O ensaio foi realizado em triplicata. A média das absorbâncias de cada uma das concentrações foi obtida e a porcentagem de atividade inibitória do RES sobre o DPPH está representada na Figura 38:

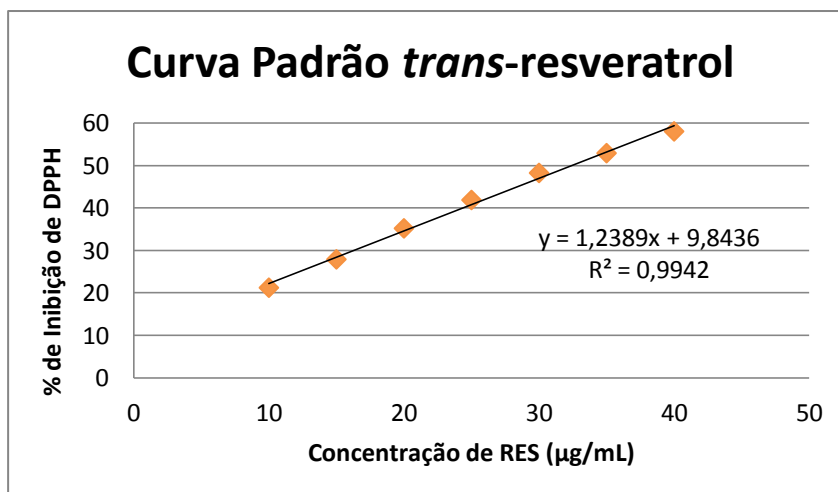


Figura 38. Porcentagem de atividade inibitória do RES sobre o DPPH.

A partir da curva padrão do RES a AI_{50} foi encontrada, ou seja, a concentração que acarretou uma atividade de inibição em 50% de DPPH. Por meio da equação da reta, constatou-se que a AI_{50} foi de aproximadamente 30µg/mL de RES.

Assim sendo, foi sugerido o aumento da concentração de RES para 30µg por grama de formulação (30µg/g). Logo, cada formulação de 2g passou a conter 60 µg de RES. Durante o preparo dos sistemas, foi possível notar que as formulações CB-25, DC-23, DC-24 e DC-25 apresentavam fácil solubilização em álcool metílico. Dessa forma, sugeriu-se a solubilização direta da formulação na solução de DPPH 0,06mM, mas para isso foi preciso determinar a densidade das formulações. Os valores das densidades se encontram na Tabela 6.

Tabela 6. Valor das densidades das formulações.

Sistemas	Densidade (g/mL)
CB-25	1,03
DC-23	1,05
DC-24	1,08
DC-25	1,06

As formulações controle, sem a incorporação do RES, foram analisadas com o intuito de se saber, se elas sozinhas, apresentavam alguma atividade antioxidante que pudesse interferir no resultado da determinação da atividade antioxidante do RES. A massa de 100 µg de cada formulação foi pesada diretamente, colocada em frascos pequenos de vidro

transparentes (protegidos com folhas de papel alumínio) para receber a solução de DPPH 0,06mM. Os valores da absorbância (A) e porcentagem de inibição de DPPH das formulações se encontram na Tabela 7.

Tabela 7. Valores da absorbância (A) e a respectiva % de inibição de DPPH das formulações DC-23, DC-23-RES, DC-24, DC-24-RES, DC-25 e DC-25-RES. Os valores da absorbância representam a média da triplicata.

Sistemas	Absorbância (A)	% de Inibição de DPPH
DC-23	0,664	---
DC-23-RES	0,558	13,35
DC-24	0,649	---
DC-24-RES	0,498	22,67
DC-25	0,653	---
DC-25- RES	0,501	22,20

Durante o procedimento acima, observou-se que as formulações CB-25 e CB-25-RES após a adição da solução de DPPH 0,06mM, geravam uma solução turva, como mostra a Figura 39. Por essa razão, estas formulações não puderam ser lidas em espectrofotômetro, sendo, portanto, descartadas para o estudo da atividade antioxidante do RES.



Figura 39. Solução das formulações com após a adição da solução de DPPH 0,06mM, respectivamente, antes e após a incorporação do RES.

Com base na tabela 7, evidenciou-se que, embora as formulações apresentassem a mesma concentração de RES (ainda com 25µg de RES/g de formulação), a formulação DC-23-RES apresentou uma menor porcentagem de inibição do DPPH, quando comparado com as formulações DC-24-RES e DC-25-RES. Foi possível observar que as formulações sem a

incorporação de RES não interferiam na atividade antioxidante dos sistemas uma vez que a taxa de inibição de DPPH não foi detectada.

Observou-se, também, que embora a concentração de RES fosse de 25µg/g de formulação, a porcentagem de inibição de DPPH foi inferior ao que se esperava quando comparada à curva padrão do RES, uma vez que na concentração de 25µg/mL da curva padrão do RES foi obtido aproximadamente 40% de inibição de DPPH. Assim sendo, uma investigação mais profunda com relação às amostras DC-24 e DC-25 se mostra interessante para se avaliar a atividade antioxidante do RES incorporado nestas formulações.

Num segundo momento, houve o aumento da concentração de RES nas formulações, passando para 30µg/g de formulação. Foram preparadas cinco formulações diferentes para as amostras DC-24 e DC-25: formulação simples sem a incorporação de RES, formulação com 60µg de RES, formulação com 100µg de RES, formulação com BHT, formulação com BHT + 60µg de RES. Cada formulação apresentava uma massa final de 2gramas. Os resultados da absorbância e da porcentagem de inibição de DPPH das formulações DC-24 e DC-25 se encontram, respectivamente, nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Valores da absorbância (A) e a respectiva % de inibição de DPPH das formulações DC-24. Os valores da absorbância representam a média da triplicata.

Sistema DC-24	Absorbância (A)	% de Inibição de DPPH
Simple	0,683	---
60µg de RES	0,591	10,45
100µg de RES	0,541	18,03
BHT a 0,1%	0,200	69,70
BHT + 60µg de RES	0,359	45,61

Tabela 9. Valores da absorbância (A) e a respectiva % de inibição de DPPH das formulações DC-25. Os valores da absorbância representam a média da triplicata.

Sistema DC-25	Absorbância (A)	% de Inibição de DPPH
Simple	0,676	---
60µg de RES	0,579	12,27
100µg de RES	0,529	19,85
BHT a 0,1%	0,220	66,67
BHT + 60µg de RES	0,212	67,87

De acordo com os resultados obtidos, confirma-se que as formulações sem RES não interferiram no ensaio por não apresentarem propriedades antioxidantes. Contudo, como verificado anteriormente, a incorporação do RES nas formulações na concentração equivalente à AI_{50} para o RES (ou seja, de $30\mu\text{g/mL}$), não promoveu a atividade antioxidante esperada.

Para as formulações contendo $60\mu\text{g}$ de RES, esperava-se que houvesse uma inibição de aproximadamente 50% de DPPH; e para as formulações contendo $100\mu\text{g}$ de RES a porcentagem esperada era de aproximadamente 70%. No entanto, para a formulação DC-24 com $60\mu\text{g}$ e $100\mu\text{g}$ de RES, foram obtidas, respectivamente, 10,45% e 18,03% de inibição de DPPH; e para a formulação DC-25 com $60\mu\text{g}$ e $100\mu\text{g}$ de RES, observou-se, respectivamente, 12,27% e 19,85% de inibição de DPPH.

O BHT é um antioxidante amplamente conhecido, utilizado geralmente a 0,05%, contudo, neste ensaio a porcentagem foi extrapolada para 0,1%. Observou-se que com a adição de BHT, a porcentagem de inibição de DPPH foi de 69,70% para a formulação DC-24 e de 66,67% para a formulação DC-25. Este fato evidencia que a formulação em si não altera a avaliação da atividade antioxidante.

Por último, associou o RES com o BHT, sendo esperado que a atividade antioxidante fosse maior do que todas as outras formulações preparadas, uma vez que havia na formulação a incorporação de dois antioxidantes. Este fato aconteceu na formulação DC-25, mas a diferença com a formulação contendo apenas o BHT foi quase que insignificante. Em contrapartida, na formulação DC-24, a porcentagem de inibição de DPPH da amostra contendo RES e BHT foi menor do que a amostra contendo apenas BHT.

Com base na curva padrão do *trans*-resveratrol, observa-se que o RES apresenta atividade antioxidante por ser capaz de inibir o radical DPPH. No entanto, evidenciou-se que a incorporação do RES nos sistemas contendo silicone não desenvolveu, como desejado, a atividade antioxidante desta substância.

4.5 Avaliação da atividade despigmentante

Melanina é um pigmento escuro produzido pelas células da camada basal da epiderme. Quando a pele é exposta à radiação UV, ocorre a formação de pigmentação anormal de

melanina que consiste em um grande problema estético que é evitado e prevenido por indivíduos à medida que a idade avança (NOH *et al.*, 2009).

Dentre os inibidores da tirosina, há o ácido kójico (AK) [5-hidroxi-2-(hidroximetil) - 4H-piran-4-ona], uma substância natural produzida principalmente por fungos do gênero *Aspergillus*. O AK causa a despigmentação cutânea por inibir a tirosinase melanocítica. Ele age como quelante de metais de transição, tais como o Cu^{2+} e o Fe^{3+} e um eliminador de radicais livres (CHO *et al.*, 2012).

O RES tem sido assunto de muitas pesquisas devido aos seus efeitos benéficos para a saúde, dentre eles, tendo ação antioxidante, antifúngico, anticarcinogênico, cardioprotetora e pela ação contra o envelhecimento. No entanto, pesquisas de seus efeitos na melanogênese e na tirosinase são escassas na literatura. Estudos recentes demonstram que o RES apresenta atividade inibitória da tirosinase (SATOOKA, KUBO, 2012).

Para a avaliação do ensaio despigmentante foram analisadas apenas as formulações DC-23, DC-24 e DC-25. Como a atividade antioxidante da formulação CB-25 não pode ser analisada, também não foi realizada a avaliação da atividade antioxidante para esta formulação.

Num segundo momento, as amostras que demonstraram sensibilidade ao primeiro ensaio foram colocadas para reagir com tirosinase a 480U.mL^{-1} e o tempo de incubação das microplacas foi de 60 minutos. As concentrações preparadas de AK para este segundo ensaio foram 0.625 , 1.25 , 2.5 , 5.0 e $10.0\mu\text{g.ml}^{-1}$.

As médias e as atividades inibitórias em porcentagem, de cada concentração de ácido kójico, do RES e das formulações, foram obtidas por meio da aplicação da Equação 1:

$$\text{AI (\%)} = [(C - S) / C] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde AI é a atividade inibitória, C é a absorbância do controle a 490nm e S é a absorbância da amostra a 490nm.

A absorbância foi medida a 490nm em ELISA no início da reação (tempo zero) e ao fim de 60 minutos e 120 minutos, incubadas em estufa a 30 ± 1 °C. As porcentagens de atividade inibitória do ácido kójico sobre a tirosinase 120U/mL e 480U/mL foram obtidas com o intuito de se determinar a AI_{50} . Elas estão demonstradas, respectivamente, nas Figuras 40 e 41.

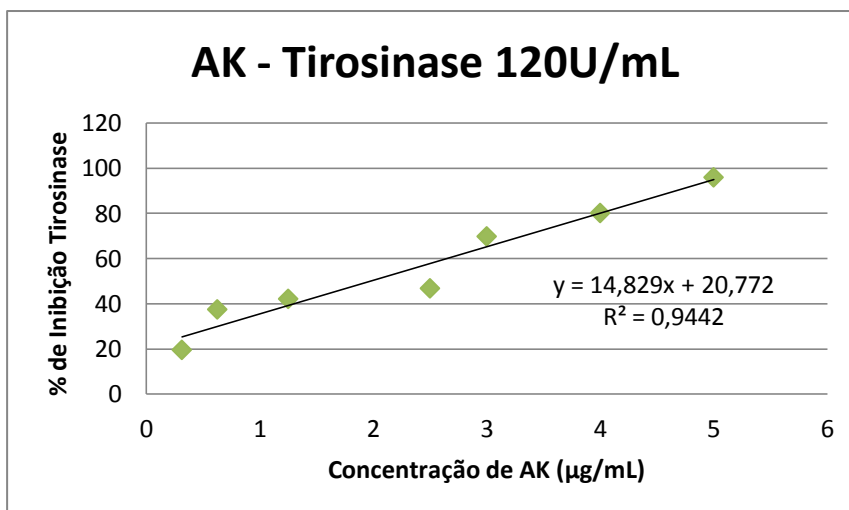


Figura 40. Porcentagem de atividade inibitória do AK sobre a tirosinase 120U/mL.

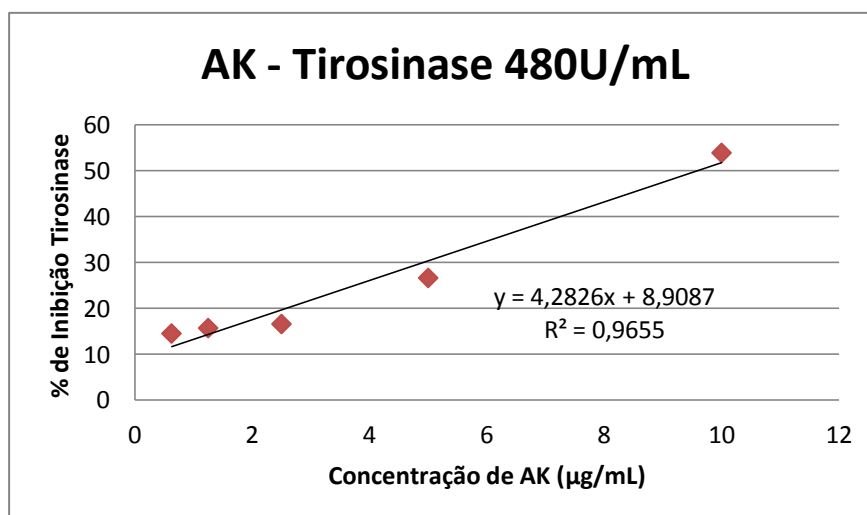


Figura 41. Porcentagem de atividade inibitória do AK sobre a tirosinase 480U/mL.

De acordo com as Figuras 40 e 41, o AI_{50} do AK obtido na reação com a tirosinase 120U/mL, calculado a partir da equação da reta, proveniente da relação porcentagem de inibição pela concentração, foi de 1,97µg/mL. Já para a reação com tirosinase 480U/mL a AI_{50} do AK foi de 9,59µg/mL. A Figura 42 a seguir indica a porcentagem de atividade inibitória do RES sobre a tirosinase 480U/mL.

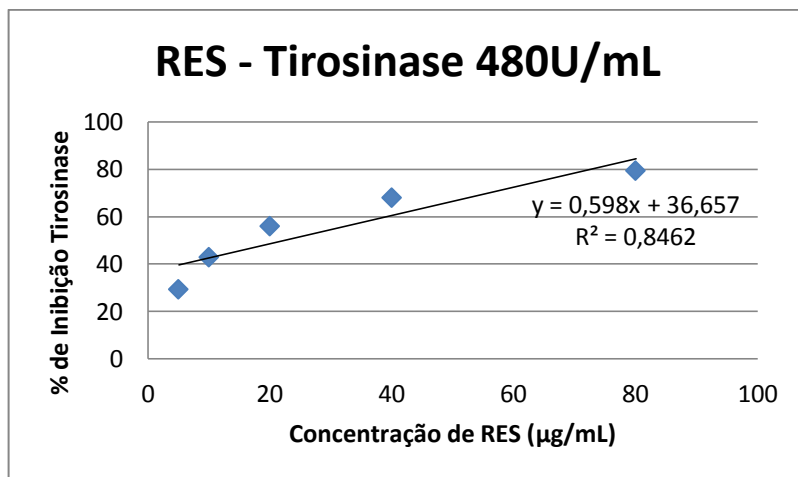


Figura 42. Porcentagem de atividade inibitória do RES sobre a tirosinase 480U/mL.

Com base na Figura 42, a AI_{50} do RES obtido na reação com a tirosinase 480U/mL foi de 22,31µg/mL, ou seja, esta é a concentração capaz de inibir 50% da enzima tirosinase e desempenhar a atividade despigmentante desejada. As formulações DC-23, DC-24 e DC-25 foram preparadas sem e com a incorporação de RES.

O RES, bem como as formulações com e sem a adição de RES, indicaram ter sensibilidade ao ensaio para avaliação da atividade despigmentante e por essa razão foram submetidos ao segundo ensaio com tirosinase a 480U/mL. A Tabela 10 apresenta os valores da atividade inibitória (em porcentagem) para as diferentes concentrações das formulações utilizando tirosinase 480U/mL. Na Tabela 11 está representada a equação da reta, o R^2 (coeficiente de correlação linear) e a AI_{50} para tais formulações.

Tabela 10. Valores da atividade inibitória (AI), em porcentagem, das formulações DC-23, DC-23-RES, DC-24, DC-24-RES, DC-25 e DC-25-RES utilizando tirosinase 480U/mL.

Sistemas	AI %				
	5µg/mL	10µg/mL	20µg/mL	40µg/mL	80µg/mL
DC-23	ND	ND	ND	ND	ND
DC-23-RES	4,14	8,01	10,20	12,86	16,12
DC-24	ND	ND	ND	ND	ND
DC-24-RES	5,74	9,04	15,79	19,9	27,37
DC-25	ND	ND	ND	ND	ND
DC-25-RES	7,92	10,76	16,19	20,45	25,49

ND = não determinado

Tabela 11. Equação da reta, R^2 e AI_{50} para as formulações DC-23, DC-23-RES, DC-24, DC-24-RES, DC-25 e DC-25-RES, utilizando tirosinase 480U/mL.

Sistemas	Equação da Reta	R^2	AI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
DC-23	$y = 0,3719x - 31,918$	0,7943	ND
DC-23-RES	$y = 0,1391x + 5,9529$	0,8612	316,66
DC-24	$y = 0,1379x - 26,924$	0,9336	ND
DC-24-RES	$y = 0,2708x + 7,1725$	0,9177	158,15
DC-25	$y = 0,1948x - 27,082$	0,8824	ND
DC-25-RES	$y = 0,2213x + 9,3029$	0,8993	183,90

ND = não determinado.

De acordo com a Tabela 11, observa-se que as formulações controle, ou seja, aquelas sem a incorporação de RES, não interferiram na atividade despigmentante, uma vez que suas inibições não puderam ser determinadas. Por outro lado, as formulações DC-23-RES, DC-24-RES e DC-25-RES demonstraram ter uma atividade inibitória positiva, embora a linearidade das curvas obtidas não fosse sempre significativa, ou seja, com $R^2 > 0,90$.

Nota-se ainda que quando os valores de $AI_{50\%}$ das formulações contendo RES foram comparados com a curva padrão do RES, a formulação que apresentou maior atividade foi o DC-24-RES, com $AI_{50\%}$ de 158 $\mu\text{g/mL}$ e sua relação dose dependência a esperada ($R^2=0,9177$). A amostra DC-24-RES foi a formulação mais ativa para a atividade despigmentante, seguida da formulação DC-25-RES e, com menor atividade, a formulação DC-23-RES.

Assim sendo, conclui-se que as formulações DC-24-RES e DC-25-RES foram aquelas que melhor apresentaram a atividade despigmentante. Para a formulação DC-23-RES, embora tenha sido detectada a atividade despigmentante, esta foi considerada a menos ativa por expressar porcentagens inferiores de inibição.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que a partir de 40% de tensoativo, o sistema composto pelo tensoativo (Eumulgin[®] HRE40), água deionizada como fase aquosa e óleo de copaíba como fase oleosa foi capaz de formar regiões líquido-cristalinas lamelares. Ainda, variando-se a fase oleosa e alterando-a por um silicone, foi possível a formação de microemulsões.

Na análise reológica, verificou-se que as formulações do sistema S1, a incorporação do RES resultou no aumento da área de histerese, havendo, portanto, o aumento na deformação das estruturas sob determinada tensão, representando maior possibilidade de o ativo ser liberado do sistema. Já as formulações do sistema S2 foram todos classificados como fluidos newtonianos, característico das microemulsões.

Durante a análise do perfil de textura, realizada apenas para as formulações CB-23 e CB-24, observou-se que a incorporação do RES leva a uma redução das propriedades mecânicas, sugerindo que este facilite a aplicação, o espalhamento da amostra e a bioadesão da formulação à pele.

Os ensaios de bioadesão evidenciaram que as formulações CB-25, DC-23, DC-24 e DC-25 são veículos interessantes para aplicação tópica, por resistirem por mais tempo na pele aumentando a eficácia do RES, sem gerar uma interação excessiva com a pele.

Verificou-se que as formulações estudadas no presente trabalho não sofreram nenhuma alteração de estabilidade físico-química no período de 30 dias, confirmada pela ausência de separação de fases, alteração de cor, homogeneidade ou alteração de pH, mesmo com a incorporação de RES.

Os resultados da atividade antioxidante evidenciaram que a incorporação do RES nas formulações não potencializou sua atividade antioxidante.

Os resultados de atividade despigmentante evidenciaram que a formulação DC-24-RES foi a mais efetiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMRI, A.; CHAUMEIL, J.C.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations. **J Control Release**, v.158, p.182-193, 2012.
- BENECH, G. Novo ativo clareador extraído de cítricos. **Cosmetics & Toiletries**, v.14, p.51-53, 2002.
- BONACUCINA, G.; CESPI, M.; MISICI-FALZI, M.; PALMIERI, G.F. Rheological, adhesive and release characterization of semisolid Carbopol/tetraglycol systems. **Int J Pharm**, v.307, p.129-140, 2006.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Séries temáticas: **Cosméticos. Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, v.1, p.1-52, 2004. Disponível em: <<http://www.avis.gov.br>>. Acesso em 03 set. 2013.
- CHO, J.C.; RHO, H.S.; BAEK, H.S.; AHN, S.M.; WOO, B.Y.; HONG, Y.D.; CHEON, J.W.; HEO, J.M.; SHIN, S.S.; PARK, Y.H.; SUH, K.D. Depigmenting activity of new kojic acid derivate obtained as a side product in the synthesis of cinnamate of kojic acid. **Bioorg Med Chem Lett**, v.22, p.2004-2007, 2012.
- 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**. 174f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2007.
- CORRÊA, N.M. JÚNIOR, F.B.C.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev Bras Cienc Farm**, v.41, n.1, p.73-78, 2005.
- CRUZ, D’J.O.; UCKUN, M.F. Gel-microemulsions as vaginal spermicidal and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v.64, p.113-123, 2001.
- DONG; Y.D.; BOYD, B.J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **Int J Pharm**, v.417, p.101-111, 2011.

FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Curr Opin Colloid In**, v.17, p.306-313, 2012.

FANUN, M.; WACHTEL, E.; ANTALEK, B.; ASERIN, A.; GARTI, N. A study of the microstructure of four-component sucrose ester microemulsions by SAXS and NMR. **Colloid Surface A**, v.180, p.173-186, 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ed., v.II, 2010.

FASOLIN, L.H.; SANTANA, R.C.; CUNHA, R.L. Microemulsions and liquid crystalline formulated with triacylglycerols: Effect of ethanol and oil unsaturation. **Colloid Surface A**, v.415, p.31-40, 2012.

FERNÁNDEZ-MAR, M.I.; MATEOS, R.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLA, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. **Food Chem**, v.130, p.797-813, 2012.

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, V.; PLOCKOVÁ, M.; SMIDRKAL, J.; SPICKOVÁ, Z.; MELZUCH, K.; SCHMIDT, S. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. **Food Chem**, v.83, p.585-593, 2003.

FORMARIZ, T.P.; COCENZA URBAN, M.C.; da SILVA JÚNIOR, A.A.; DAFLON GREMIÃO, M.P.; de OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev Bras Cienc Farm**, v.41, n.3, p.301-313, 2005.

GOSENCA, M.; BESTER-ROGAC, M.; GASPERLIN, M. Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate. **Eur J Pharm Sci**, v.50, p.114-122, 2013.

GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. **Innov Food Sci Emerg**, v.11, p.210-218, 2010.

HUNG, CF.; LIN, YH.; HUANG, ZR.; FANG, JY. Delivery of Resveratrol, a Red Wine Polyphenol, from Solutions and Hydrogels *via* the Skin. **Biol Pharm Bull**, v.31, n.5, p.955-962, 2008.

INFORMATIVO. EMBRAFARMA - silicone DC[®] 193. 2012.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.29, n.1, p.81-86, 2008.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mech Ageing Dev**, v.123, p.801-810, 2002.

JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; BROWN, A.F. Textural, viscoelástico and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **Int J Pharm**, v.151, p.223-233, 1997.

KLEIN, K. Liquid crystals and emulsions: A wonderful marriage. **Cosmet Toiletries**, v.117, n.5, p.40-34, 2002.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv Drug Deliver Rev**, v.54, suppl.1, s77-98, 2002.

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; CAMPOS, P.M.B.G. Estudo da variação do pH da pelle humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **An Bras Dermatol**, v.77, n.5, p.563-569, Rio de Janeiro, 2002.

LÉVÈQUE, J. L. Caracterização biofísica do fotoenvelhecimento cutâneo. **Cosmét Lin**, n.106, p.55-66, 1997.

LI, X.W.; ZHANG, J.; DONG, B.; ZHENG, L.Q.; TUNG, C.H. Characterization of lyotropic liquid crystals formed in the mixtures of 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide/p-xylene/water. **Colloid Surface A**, v.335, p.80-87, 2009.

LUCAS-ABELLÁN, C.; MERCADER-ROS, M.T.; ZAFRILLA, M.P.; GABALDÓN, J.A.; NÚÑEZ-DELICADO, E. Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. **Food Chem Toxicol**, v.49, p.1255-1260, 2011.

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

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

MASHAK, A.; RAHIMI, A. Silicone polymers in controlled drug delivery systems: A review. **Iran Polym J**, v.18, n.4, p.279-295, 2009.

MAZZARINO, L.; KNORST, M.T. Desenvolvimento e caracterização farmacotécnica de formas farmacêuticas semi-sólidas contendo nimesulida. **Lat Am J Pharm**, v.26, n.3, p.415-419, 2007.

MILAN, A.L.K.; MILÃO, D.; SOUTO, A.A.; CORTE, T.W.F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Rev Bras Cienc Farm**, v.43, n.4, p.649-657, 2007.

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Trop J Pharm Res**, v.5, n.1, p.561-573, 2006.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur J Pharm Biopharm**, v.58, p.343-356, 2004.

NASCIMENTO, C. R. Reologia e reometria aplicadas ao estudo de polpas minerais. **Série Rochas e Minerais Industriais**, CETEM/MCT, 12, p.1-53, 2008.

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

NESSEEM, D.I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **J Pharmaceut Biomed**, v.26, p.387-399, 2001.

NOH, J.M.; KWAK, S.Y.; SEO, H.S.; SEO, J.H.; KIM, B.G.; LEE, Y.S. Kojic acid-amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v.19, p.5586-5589, 2009.

OENDER, K.; TROST, A.; LANSCHUETZER, C.; LAIMER, M.; EMBERGER, M.; BREITENBACH, M.; RICHTER, K.; HINTNER, H.; BAUER, J.W. Cytokeratin-related loss of cellular integrity is not a major driving force of human intrinsic skin aging. **Mech Ageing Dev**, v.129, p.563-571, 2008.

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

PANDOLFO, Maria L.M. O processo de envelhecimento. **Personalité**, v.14, n.71, p.102-114, mar./abr. 2011.

PATEL, R.; PATEL, T.N. Liquid crystals and their application in the field of drug delivery. In: FANUN, M. **Colloids in Drug Delivery**, USA: CRC Press Taylor & Francis Group, p.311-336, 2010.

PYTEL, R.F.; SILVA, L.V.N.; NUNES, A.S.; GESZTESI, J.L.; COSTA, F. Estudo in vivo de atividade anti-radicalar por quantificação de peróxidos cutâneos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.80, supl.3, s.323-328, 2005.

ROSSI, C.G.F.T.; DANTAS, T.N.C.; NETO, A.A.D.; MACIEL, M.A.M. Microemulsões: Uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra**, v.26, n.1-2, p.45-66, 2007.

RUFINO, M.S.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia científica: Determinação da atividade total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico On Line**, n.127, Fortaleza, CE, 2007. ISSN 1679-6535.

SATOOKA, H.; KUBO, I. Resveratrol as a k_{cat} type inhibitor for tyrosinase: Potentiated melanogenesis inhibitor. **Bioorgan Med Chem**, v.20, p.1090-1099, 2012.

SCHICK, M.; SHIK, W.H. Simple microscopic model of a microemulsion. **Phys Rev Lett**, v.59, n.11, p.1205-1208, 1987.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos teóricos e práticos**. Ed.Artiliber, ed.2, São Paulo, 2006.

SCHWARZ, J.C.; KLANG, V.; HOPPEL, M.; MAHRHAUSER, D.; VALENTA, C. Natural microemulsions: Formulation design and skin interaction. **Eur J Pharm Biopharm**, v.81, p.557-562, 2012.

SCOTT, H. Reology. In: REMINGTON, J.P. **The Science and Practice of Pharmacy**, ed.20, cap.23, p.335-335, 2000.

SENYIGIT, T.; TEKMEEN, I.; SÖNMEZ, Ü.; SANTI, P.; ÖZER, Ö. 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.

SMART, J. D. et al. The retention of C-labelled poly (acrylic acids) on gastric and esophageal mucosa: An in vitro study. **Eur J Pharm Sci**, v. 20, n. 6, p. 83-90, 2003.

SPERNATH, A.; ASERIN, A. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. **Adv Colloid Interfac**, v.128-130, p.47-64, 2006.

TADWEE, I.; SHAHI, S.; RAMTEKE, V.; SYED, I. Liquid crystals pharmaceutical application: A review. **International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences**, v.1, i.2, p.06-11, 2012.

TYLE, P. Liquid crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems**. New York: VCH publishers, p.125-162, 1989.

VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE, R.L. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.20, n.1, p.51-64, 2010.

WOOD, J.H. Reologia farmacêutica. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, v.1, cap.6, p.210-253, 1986.

WU, C.F.; YANG, J.Y.; WANG, F.; WANG, X.X. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.11, n.1, p.0001-0015, 2013.

YARIV, D.; EFRAT, R.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloid Surface B**, v.78, p.185-192, 2010

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

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

Araraquara, 18 de Dezembro de 2013.

Cínthia Yuka Satake

De acordo,

Orientador
Marlus Chorilli