

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIANNE ARAUJO PEREIRA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÃO DE
ÓLEO DE SEMENTE DE UVA ENRIQUECIDO COM RESVERATROL
VISANDO AO TRATAMENTO DA ROSÁCEA**

BRASÍLIA

2023

MARIANNE ARAUJO PEREIRA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÃO DE
ÓLEO DE SEMENTE DE UVA ENRIQUECIDO COM RESVERATROL
VISANDO AO TRATAMENTO DA ROSÁCEA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

BRASÍLIA

2023

MARIANNE ARAUJO PEREIRA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÃO DE
ÓLEO DE SEMENTE DE UVA ENRIQUECIDO COM RESVERATROL
VISANDO AO TRATAMENTO DA ROSÁCEA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Brasília, 15 de dezembro de 2023.

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof^ª. Dr^ª Yris Maria Fonseca Bazzo (Membro Interno)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Henrique Rodrigues Marcelino (Membro Externo)
Universidade Federal da Bahia

Prof^ª. Dr^ª. Taís Gratieri (Suplente)
Universidade de Brasília

Autorizo a reprodução e a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por me abençoar e me conceder essa oportunidade grandiosa que foi chegar até aqui, com grandes ensinamentos, dificuldades superadas e muitas alegrias vividas ao longo do caminho. E agradeço pela intercessão de **Nossa Senhora** em todos os passos dados em minha vida.

Agradeço à minha família, em especial aos meus queridos pais, **Alexandre e Wigna**, por serem a minha base, por todo amor, por me incentivarem e apoiarem em todas as decisões, meu exemplo de força, dedicação e determinação. Ao meu irmão, **João Miguel**, que sempre esteve e está presente em todos os momentos da minha vida, meu amorzinho sempre irritado. Aos meus amados avós, **João e Marly**, por todo amor, por me motivarem diariamente, por sempre estarem presentes e por serem meu exemplo vivo de superação. A minha tia, **Simea**, meu exemplo de dedicação e persistência e que me acompanha desde o ventre da minha mãe sempre me motivando e zelando. Ao meu tio **Rafael**, por todo amor, carinho e incentivo. Agradeço por serem exemplos em minha vida e por estarem sempre ao meu lado em todas as dificuldades, todas as conquistas e alegrias. Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

Ao meu amado noivo, **José Vinícius**, com quem compartilho o melhor da vida há alguns anos. Obrigada por ser o melhor meu parceiro, meu ponto de apoio, meu amigo de todas as horas. Eu te agradeço por cada palavra, por cada gesto de amor, por insistir em nós, por me tornar uma pessoa melhor, por me amar e incentivar diariamente.

Agradeço aos meus sogros, **José Nogueira e Magnólia**, e aos meus cunhados, **Vivian, Felipe, Marla e Danilo**, por todo carinho, conselho e incentivos.

Aos meus amigos da vida, **Isabela Fontenele, Jean Vinícius Ocampo e Karoline Abreu**, por todo carinho, por me incentivarem e por serem meus amigos de todas as horas e momentos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Guilherme Gelfuso**, verdadeiro “pai científico”, por ter confiado na minha capacidade de realização deste trabalho, por toda atenção, acompanhamento e dedicação, estando sempre presente e disponível. Obrigada por me

acompanhar e proporcionar desafios que contribuíram de forma positiva para meu crescimento e desenvolvimento acadêmico. Obrigada pela confiança e pelo apoio.

Aos meus irmãos científicos, e hoje meus grandes amigos, **Camila Cardoso, Luma Nogueira, Seila Tolentino, Breno Noronha e Lucas Fraga, por todo carinho e amor,** por terem me ensinado e auxiliado tanto, por serem meu apoio e por estarem comigo durante toda essa jornada, por dividirem comigo todas as conquistas.

À **Universidade de Brasília (UnB)** por me proporcionar apoio para realização deste trabalho.

À **Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão de bolsa de Mestrado no país.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)** por todo o suporte nessa jornada, em especial aos membros da coordenação e secretárias.

A todos meus amigos e professores do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), que eu não mencionei aqui, mas que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

Rosácea é uma doença dermatológica crônica caracterizada principalmente por rubor centro-facial recorrente. Atualmente não existe tratamento específico para rosácea, sendo seu controle estabelecido com tratamentos tópicos ou orais que acarretam efeitos adversos. O resveratrol é uma substância natural com propriedades anti-inflamatória e antioxidante, portanto, interessante para o tratamento da rosácea. No entanto, ainda não existe nenhum produto tópico contendo resveratrol no mercado, provavelmente devido à sua alta lipofilicidade e conseqüente dificuldade em penetrar profundamente a pele. O presente estudo propôs o desenvolvimento de uma microemulsão (ME) óleo em água utilizando óleo de semente de uva enriquecido com resveratrol para o tratamento tópico da rosácea. Análises térmicas (DSC e TGA) de misturas binárias de resveratrol e dos componentes da formulação foram realizadas para avaliar a compatibilidade farmacêutica. De um diagrama de fases pseudoternário, duas MEs foram selecionadas para estudos posteriores. As MEs foram caracterizadas analisando a distribuição de tamanho das gotículas, potencial zeta, pH, morfologia e comportamento reológico. A permeação do ativo a partir das MEs foi estudada *in vitro* utilizando pele suína acoplada em células de difusão de Franz durante 24 h e comparada a uma solução de resveratrol utilizada como controle. Por fim, ensaios de HET-CAM foram realizados para verificar a segurança das formulações. As análises térmicas mostraram a compatibilidade entre o ativo e os componentes da formulação. As composições das MEs selecionadas (15% de óleo, 55% de água e 30% de tensoativos; e 10% de óleo 60% de água e 30% de tensoativos) consistiram em formulações translúcidas, apresentando tamanho médio de gotículas de $22,3 \pm 1,4$ e $24,2 \pm 0,8$ nm, pH $6,3 \pm 0,1$ e $6,8 \pm 0,8$, e comportamento de fluxo newtoniano, que foram fisicamente estáveis por pelo menos 60 dias. Além disso, as MEs mostraram promover aumento da penetração do ativo nas camadas mais profundas da pele (ME 1= $2,9 \pm 0,1$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em 4 vezes ($p < 0,001$) em comparação ao controle, enquanto reduziram de 3,5 a 6 vezes ($p < 0,05$) a retenção do ativo no estrato córneo. Ambas formulações foram seguras para aplicação tópica. Conclui-se que as MEs foram adequadas para aplicação tópica, pois são estáveis, seguras e capazes de estimular significativamente a penetração do resveratrol para as camadas mais profundas da pele, podendo beneficiar o tratamento tópico da rosácea.

Palavras chaves: Resveratrol, Nanotecnologia, Rosácea, Pele, Administração tópica.

ABSTRACT

Rosacea is a chronic dermatological disease mainly characterized by recurrent full-face flushing. Currently, there is no specific treatment for rosacea, its control being established with topical or oral treatments which present adverse effects. Resveratrol is a natural substance with anti-inflammatory and antioxidant properties, therefore interesting for the treatment of rosacea. However, there is still no topical product containing resveratrol on the market, probably due to its high lipophilicity and consequent difficulty in penetrating deeply into the skin. The present study proposed the development of an oil-in-water microemulsion (ME) using grape seed oil enriched with resveratrol for the topical treatment of rosacea. Thermal analyzes (DSC and TGA) of resveratrol and formulation components binary mixtures were performed to evaluate pharmaceutical compatibility. From a pseudoternary phase diagram, two MEs were selected for further study. MEs were characterized by analyzing droplet size distribution, zeta potential, pH, morphology, and rheological properties. Drug permeation from MEs was studied *in vitro* using porcine skin coupled to Franz diffusion cells for 24 hours and compared to a resveratrol solution used as a control. Finally, HET-CAM tests were carried out to verify the safety of the formulations. Thermal analyzes showed the compatibility between the drug and the formulation components. The compositions of the selected MEs (15% oil, 55% water and 30% surfactants; and 10% oil, 60% water and 30% surfactants) consisted of translucent formulations, with an average droplet size of 22.3 ± 1.4 and 24.2 ± 0.8 nm, pH 6.3 ± 0.1 and 6.8 ± 0.8 , and Newtonian flow behavior, which were physically stable for at least 60 days. Furthermore, MEs were shown to increase drug penetration into the deeper layers of the skin (ME 1= $2.9 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) by 4 times ($p < 0.001$) compared to the control, while reducing by 3.5 to 6 times ($p < 0.05$) the drug retention into the stratum corneum. Both formulations were safe for topical application. It is concluded that MEs were suitable for topical application, as they are stable, safe, and capable of significantly stimulating the penetration of resveratrol into the deeper layers of the skin, potentially benefiting the topical treatment of rosacea.

Keywords: Resveratrol, Nanotechnology, Rosacea, Skin, Drug Delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da organização estratificada da pele. Adaptado de (20) e criado com BioRender.	4
Figura 2. Representação dos estratos da camada da pele. Criado com BioRender.	4
Figura 3. Representação da penetração de substâncias no estrato córneo. A – Via transcelular; B – via intercelular; C – via de anexos cutâneos. Criado com BioRender. .	6
Figura 4. Ilustração do acometimento da rosácea na face. Adaptado de (3)	7
Figura 5. Estrutura química do Resveratrol. Fonte: Drugbank.com.....	9
Figura 6. Representação do tipo de sistemas microemulsionados. Criado com BioRender.	11
Figura 7. Representação do diagrama de fase pseudoternário e as suas regiões de formação. Adaptado de (22)	15
Figura 8. Representação do processo de remoção e limpeza da pele da orelha de suíno.	18
Figura 9. Representação da técnica de <i>tape-stripping</i> e métodos de extração testados para a recuperação do resveratrol das camadas da pele. A – Depois da limpeza da pele, separação das camadas, estrato córneo e pele remanescente; B – Adição da solução metanólica de resveratrol aos frascos com as camadas da pele separadas; C – Frascos após adição da solução de resveratrol aguardando a total evaporação do solvente; D – Adição de 5 mL de solvente para a extração. E – Amostras em repouso; F – amostras sob constante agitação para avaliação do método extrator para a recuperação do ativo; G e H – Término do período de 24h dos métodos de repouso e agitação, amostras filtradas com membrana de 0,45µm; I – amostras acondicionadas em vials de vidro âmbar; J – análise das amostras. Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.	20
Figura 10. Representação esquemática do processo de obtenção das microemulsões pela técnica do ponto de inversão de fases. A – Pesagem dos componentes da microemulsão, fase oleosa e fase aquosa; B – aquecimento da fase aquosa e agitação (300 rpm) da fase oleosa para solubilização do tensoativo e cotensoativo; C – adição da fase aquosa sob a oleosa; D – agitação das fases aquosa e oleosa proporcionando a formação de um sistema homogêneo; E – Agitação usando o sonicador; F – Centrifugação para avaliar a amostra desenvolvida; G – representação da amostra pronta. Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.	25

Figura 11. Representação da montagem do grid para análise no MET. Criado com BioRender.....	29
Figura 12. Representação da célula de difusão do tipo Phoenix™. Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.	30
Figura 13. Representação do equipamento Hanson utilizado nas permeações cutâneas. A – Equipamento e suas células em atividade; B – Célula de difusão com a pele inserida após o tempo de ensaio; C – pele após o ensaio com as formulações.	31
Figura 14. Representação do suporte e aparato usando microscópio e câmera de celular para registro do ensaio HET-CAM. Na figura é possível visualizar a membrana cório-alantoide do ovo exposta previamente ao início do ensaio com as formulações.	33
Figura 15. Sobreposição dos cromatogramas das diferentes amostras para a análise da seletividade do método analítico. RES – resveratrol; EC – estrato córneo; PR – pele remanescente. Na lateral, representação da estrutura química da molécula do resveratrol.	37
Figura 16. Representação gráfica da curva analítica, construída nas faixas de concentração de 1 a 20 µg/mL, obtida por CLAE para quantificação de RES. Equação da reta: $y = 278855x + 96305$	38
Figura 17. Representação do paralelismo apresentado pelas retas do efeito matriz e da linearidade juntos. Efeito Matriz EC - representa o efeito matriz obtido para as amostras do estrato córneo da pele do suíno; Efeito Matriz PR - representa o efeito matriz obtido para a pele remanescente. EC – Estrato córneo; PR – Pele remanescente.	39
Figura 18. Primeira derivada de TGA do resveratrol (RES) isolado e das misturas com excipientes da formulação. Cada evento de perda de massa está indicado na figura como porcentagem (%).	46
Figura 19. Análise das curvas de DSC do RES, do óleo de semente de uva e das misturas físicas. O pico de fusão do ativo foi sombreado. RES – resveratrol.	47
Figura 20. Representação do diagrama de fase pseudoternário mostrando as regiões de formação das microemulsões. Em rosa estão indicadas as regiões escolhidas para a continuidade dos ensaios. O diagrama foi composto por Tween 80 e Span 80 na proporção 2:1 (p/p) como tensoativos, óleo de semente de uva como fase oleosa e água ultrapura como fase aquosa.	49
Figura 21. Microemulsões selecionadas desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos Alimentos e Cosméticos – LTMAC da Universidade de Brasília, em que	

é possível observar uma das consequências da variação dos excipientes através da construção do diagrama de fases. A e B estáveis após 20 min de centrifugação; C apresentando uma separação de fases após 20 min de centrifugação.....	50
Figura 22. Imagens obtidas por MET para as formulações: ME 1 e ME 2. MET – Microscopia eletrônica de transmissão; ME – Microemulsão. A – ME com RES 1; B – ME 2 com RES; C – ME 1 sem RES; D – ME 2 sem RES.....	53
Figura 23. Gráfico referente a tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento. A – Gráfico para ME 1; B – Gráfico para ME 2.	54
Figura 24. Quantidade de RES recuperado das camadas da pele em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. EC - Estrato Córneo; PR - Pele remanescente; RES - Resveratrol. Análise estatística por ANOVA (* $p < 0,0001$).....	56
Figura 25. Sequência ilustrativa das imagens do ensaio de HET-CAM demonstrando o efeito do controle negativo (NaCl 0,9%), controle positivo (NaOH 1 mol/L), ME 1 e ME 2 na membrana cório-alantoide nos tempos 0 s, 30 s, 2 min e 5 min.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sumário da composição das misturas físicas do ativo e dos excipientes para verificação da compatibilidade química da formulação.	24
Tabela 2. Escala para teste de HET-CAM conforme efeitos observados ao longo de 5 min.	33
Tabela 3. Classificação final das formulações analisadas considerando a pontuação cumulativa ao grau de irritabilidade no HET-CAM.	33
Tabela 4. Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método CLAE para quantificação do resveratrol.	36
Tabela 5. Apresentação da área do pico e seu tempo de eluição em minutos de cada componente analisado em CLAE. Resveratrol em metanol a 5 µg/mL; interferentes da pele remanescente (PR) e interferentes do estrato córneo (EC) extraídos em metanol. .	38
Tabela 6. Cálculo do efeito matriz na curva do ativo na presença da solução metanólica contaminada com estrato córneo e pele remanescente	39
Tabela 7. Resultados dos testes de precisão para determinação de resveratrol (RES). CV = coeficiente de variação (%).	40
Tabela 8. Resultados do teste método de extração do resveratrol das camadas da pele. Concentração teórica de 7,5 (µg/mL). EC – Estrato córneo; PR – pele remanescente. .	42
Tabela 9. Valores da exatidão/recuperação do RES das camadas da pele, após 24h sob agitação a 300 rpm. EC – Estrato córneo; PR – Pele remanescente; CV – Coeficiente de variação. Valores correspondem à média de 3 repetições ± desvio padrão.	42
Tabela 10. Demonstração experimental do limite de quantificação do método cromatográfico. Valores correspondem à média de 3 repetições ± desvio padrão.	43
Tabela 11. Solubilidade do resveratrol em meios propostos para os ensaios de permeação cutânea. Todas as soluções foram diluídas em metanol (1:1000 v/v) para análise em CLAE. Os dados são compostos por médias de 3 repetições ± desvio padrão.	44
Tabela 12. Faixa de decomposição e perda de massa em porcentagem dos excipientes da formulação.	46
Tabela 13. Composição das microemulsões selecionadas.	51
Tabela 14. Caracterização das microemulsões ME 1 sem ativo, ME 2 sem ativo, ME 1 e ME 2 quanto ao diâmetro médio de gotículas (nm), PDI, potencial zeta (mV) e pH. PDI – Índice de polidispersão; pH – potencial hidrogênico. Valores correspondem à média de 3 repetições ± desvio padrão da média.	51

Tabela 15. Resultado das viscosidades das formulações ME 1 e ME 2, na temperatura de 25°C. Valores correspondem à média de 3 repetições \pm desvio padrão.	55
Tabela 16. Classificação da irritabilidade das formulações testadas de acordo com a escala acumulativa. Valores correspondem à média de 3 repetições \pm desvio padrão.	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ACN – Acetonitrila

A/O – Água em óleo

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DSC – Calorimetria de varredura diferencial

HET-CAM – do inglês, *Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane*

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

ME – Microemulsão

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

O/A – Óleo em água

pH – potencial hidrogeniônico

RES – Resveratrol

TGA – Termogravimetria

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Anatomia da pele	3
2.2. Permeação de ativos através da pele.....	5
2.3. Rosácea	6
2.4. Resveratrol	7
2.5. Óleo de semente de uva	9
2.6. Nanotecnologia	10
2.7. Diagramas de fases pseudoternários	14
3 OBJETIVOS	16
3.1. Geral	16
3.2. Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Material.....	17
4.2. Obtenção e preparo da pele de porco.....	17
4.3. Desenvolvimento e validação do método analítico	18
4.3.1 <i>Padronização do processo de extração de ativo da pele</i>	19
4.3.2 <i>Seletividade</i>	21
4.3.3 <i>Linearidade</i>	21
4.3.4 <i>Precisão</i>	22
4.3.5 <i>Exatidão</i>	22
4.3.6 <i>Limites de detecção e quantificação</i>	22
4.4. Solubilidade	23
4.5. Estudos de compatibilidade	24
4.6. Obtenção das microemulsões	24
4.6.1 <i>Método do ponto de inversão de fases</i>	25
4.6.2 <i>Construção do diagrama de fases</i>	27
4.6.3 <i>Seleção das microemulsões</i>	27
4.7. Caracterização das microemulsões	27
4.7.1 <i>Diâmetro das gotículas de PDI</i>	27
4.7.2 <i>Potencial Zeta</i>	27

4.7.3. <i>pH</i>	28
4.7.4. <i>Morfologia</i>	28
4.8. Estudo reológico das microemulsões.....	29
4.9. Estudo de estabilidade	29
4.10. Avaliação <i>in vitro</i> de permeação cutânea do resveratrol	30
4.11. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial irritativo	32
4.12. Análise estatística dos dados	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Desenvolvimento e validação de método analítico.....	35
5.1.1. <i>Seletividade</i>	36
5.1.2. <i>Linearidade</i>	38
5.1.3. <i>Precisão</i>	40
5.1.4. <i>Exatidão</i>	40
5.1.5. <i>Limites de detecção e quantificação</i>	43
5.2. Solubilidade	43
5.3. Estudos de compatibilidade	44
5.4. Obtenção das microemulsões	48
5.5. Caracterização das microemulsões	51
5.6. Estudo reológico da microemulsão.....	54
5.7. Estudo de estabilidade	55
5.8. Avaliação <i>in vitro</i> de permeação cutânea do resveratrol	55
5.9. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial irritativo	56
6. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

A rosácea é uma doença dermatológica crônica, que se apresenta principalmente por meio de rubor recorrente no centro da face e hiperplasia maciça das glândulas sebáceas (1,2). Pode ser desencadeada por fatores genéticos, inflamatórios, neurovasculares e por desequilíbrio das camadas cutâneas, e é agravada por fatores externos, como radiação UV e fatores nutricionais (1,3).

Atualmente, não há um tratamento específico para a rosácea e a principal forma de controlar as crises é por meio de tratamento tópico, que nem sempre é efetivo devido à baixa penetração cutânea que alguns ativos apresentam, o que resulta em baixa biodisponibilidade dermatológica. Além disso, algumas formulações comerciais tendem a ser pouco toleradas pela pele sensível dos pacientes acometidos pela doença, o que resulta na descontinuação do tratamento. Para os casos mais graves de rosácea, faz-se necessário o uso de medicações por via oral. Entretanto, a descontinuidade do tratamento neste caso também é elevada devido às reações adversas relacionadas ao uso desses medicamentos, geralmente corticoides ou anti-inflamatórios (2–4). Entre as principais reações adversas provenientes desses medicamentos orais estão desconfortos gastrintestinais, problemas renais e hepáticos, retenção de líquido, entre outros (5–8).

O resveratrol é um ativo promissor para o tratamento de rosácea. É indicado para o tratamento de inflamações tópicas por apresentar atividades fotoprotetora, antioxidante e imunomoduladora, diminuindo a expressão de citocinas e quimiocinas envolvidas no processo inflamatório da doença (9). Entretanto, por causa da sua alta lipossolubilidade ($\text{Log } P = 3,1$, solubilidade em água = 0,03 mg/mL) (10), é uma molécula de difícil incorporação em formulações de base aquosa. Além disso, o ativo lipofílico possui certa dificuldade em transpassar o estrato córneo, que é a camada mais superficial da epiderme que também possui alta lipofilicidade e baixo conteúdo aquoso. O rápido metabolismo do resveratrol também dificulta seu uso terapêutico (11,12).

Na tentativa de contornar as dificuldades biofarmacêuticas apresentadas pelo resveratrol de uso tópico, o presente trabalho propõe o uso de sistemas microemulsionados para sua incorporação. Microemulsão é uma dispersão de dois líquidos imiscíveis, estabilizada por agentes emulsionantes de composição e concentração específica, com a formação de gotículas de dimensões inferiores a 200 nm (13). Esse sistema, além de apresentar elevada estabilidade física e ser capaz de incorporar

substâncias apolares como o resveratrol, tem se revelado um eficiente promotor de permeação cutânea, que favorece a absorção de moléculas para as camadas mais profundas da pele (14). Além disso, as microemulsões são de fácil aplicação e espalhamento na pele, por se tratar de sistemas líquidos, homogêneos e transparentes ((15).

Para o preparo das microemulsões para o tratamento da rosácea foi selecionado o óleo de semente de uva. Esse óleo já tem benefícios e usos conhecidos na literatura voltados para a área nutricional, farmacêutica e cosmética (16,17). Suas propriedades estão relacionadas à composição química do óleo, que contém resveratrol, ácido linoleico, vitamina E, entre outros (17). Entre os benefícios para a pele estão a hidratação, restauração da função de barreira cutânea e ação antioxidante, que protege a pele do envelhecimento, do dano oxidativo e de outras doenças, como dermatite, acne, rosácea, e psoríase (17–19).

Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver uma microemulsão óleo-em-água contendo óleo de semente de uva enriquecido com resveratrol destinada ao tratamento tópico da rosácea. Espera-se que a formulação seja estável, bem tolerada pela pele e que promova o aumento da permeação cutânea do ativo através do estrato córneo, garantindo a eficácia do tratamento proposto para a doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Anatomia da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano. Histologicamente, pode ser dividida em epiderme (camada mais externa), derme e hipoderme, que apesar de serem compostas por diferentes tipos celulares e estruturas, juntas formam uma barreira mecânica para proteção em relação a entrada de agentes, incidência da radiação solar, funcionam como proteção à perda de água do organismo e termorregulação corporal, no metabolismo e na regulação do equilíbrio de fluidos (Figura 1) (20).

A epiderme é a camada mais externa e se caracteriza por sua função de barreira protetora. O estrato córneo que possui uma espessura de 10µm a 15µm tem a função de servir como primeira barreira à absorção percutânea de moléculas e contra a perda de água pelo organismo. É uma camada queratinizada, como mostra a Figura 1, e passa rotineiramente por processo de descamação. A penetração de um dado medicamento na pele através do estrato córneo depende de fatores que incluem as propriedades físico-químicas do ativo, da formulação utilizada e a condição cutânea da região que irá receber o produto (14,20,21). Assim, para transpor o estrato córneo, o ativo deve apresentar balanço adequado em sua solubilidade aquosa e oleosa ou a formulação em que ele está inserido deve possuir componentes capazes de afetar a estrutura celular e, assim, superar a barreira do estrato córneo até atingir as camadas mais profundas da epiderme e derme (20). Algumas doenças dermatológicas são capazes de provocar uma disfuncionalidade do estrato córneo, com a diminuição da capacidade de atrair e reter água, piorando o processo inflamatório e agravando o dano à barreira mecânica da pele (4)

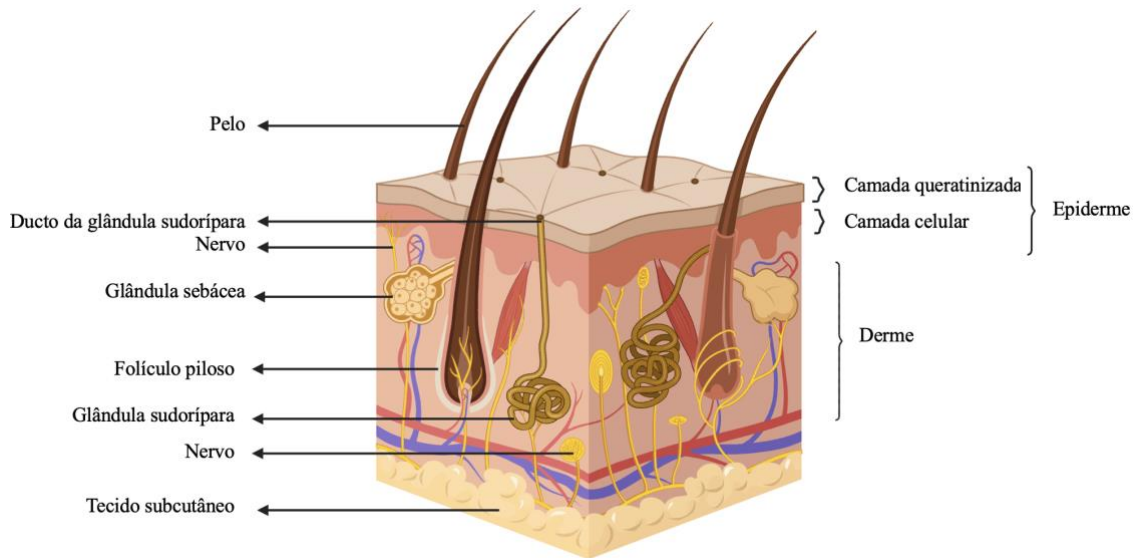


Figura 1. Representação da organização estratificada da pele. Adaptado de (20) e criado com BioRender.

Localizando-se abaixo do estrato córneo, o estrato lúcido é um revestimento formado por uma camada de células achatadas, planas e translúcidas (Figura 2). Essa camada está presente apenas em regiões do corpo em que a pele é mais espessa, como a palma da mão e a planta dos pés. O estrato granuloso (Figura 2), logo abaixo do estrato lúcido, geralmente apresenta de 1 a 4 células de espessura, sendo composto por grânulos de queratina em suas células, que promovem a queratinização (21). O estrato granuloso é seguido do estrato espinhoso: encontram-se nessa camada os grânulos de melanina e as células de *Langerhans*, importantes fagócitos que auxiliam na resposta imunológica da pele. O estrato espinhoso apresenta células ligadas através de desmossomos (tipo de membrana que tem a função de manter as células unidas umas às outras), que conferem resistência ao tecido (20–22). No estrato basal, as células são responsáveis pela renovação contínua da epiderme por meio de sucessivas mitoses (21).

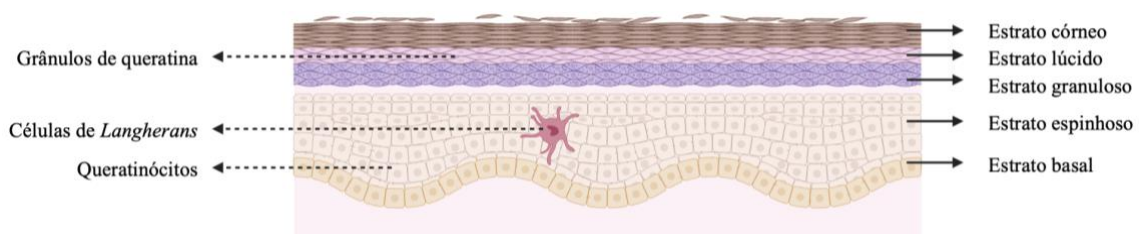


Figura 2. Representação dos estratos da camada da pele. Criado com BioRender.

A derme, segunda camada da pele, tem uma espessura entre 0,5 e 5 mm e contempla componentes celulares como linfócitos, fibroblastos, mastócitos, plasmócitos

e células dendríticas. A presença de fibroblastos garante a textura e elasticidade da pele. Também são encontrados alguns canais linfáticos, vasos sanguíneos e nervos sensoriais (Figura 1). A camada mais interna da pele, chamada de hipoderme ou tecido subcutâneo (Figura 1), é composta por tecido adiposo e conjuntivo e tem como principal função a reserva energética, proteção contra choque mecânico e também atua como isolante térmico (14,21).

2.2. Permeação de ativos através da pele

A principal barreira para a penetração cutânea de um ativo é o estrato córneo, assim, essa penetração pode acontecer seguindo a via transepidérmica, em que há a difusão através das camadas, ou por vias alternativas, sendo absorvidos pelas glândulas sebáceas, sudoríparas e/ou estruturas capilares (21).

A via transepidérmica pode envolver a passagem das moléculas através das células do estrato córneo, chamada de via transcelular (Figura 3A) ou pela passagem através da matriz lipoproteica existente entre as células, chamada de via intercelular (Figura 3B) (21,23). De maneira geral, a via transcelular favorece a penetração de composto polares, como por exemplo, água, enquanto as substâncias mais apolares, que apresentam afinidade lipídica, difundem-se lentamente pela via intercelular, ao longo de seus espaços (24).

A via transcelular permite que as moléculas se difundam atravessando diretamente as células, corneócitos, se localizando no interior da membrana lipídica. Na via intercelular acontece a difusão através do contorno completo das células e da matriz lipídica, ou seja, há uma transposição da molécula por um caminho tortuoso, sem atravessar as células. E existe ainda a via de anexos cutâneos, em que o ativo pode ser absorvido por meio dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, na qual ocorre a penetração mais rápida das moléculas (14,21,25).

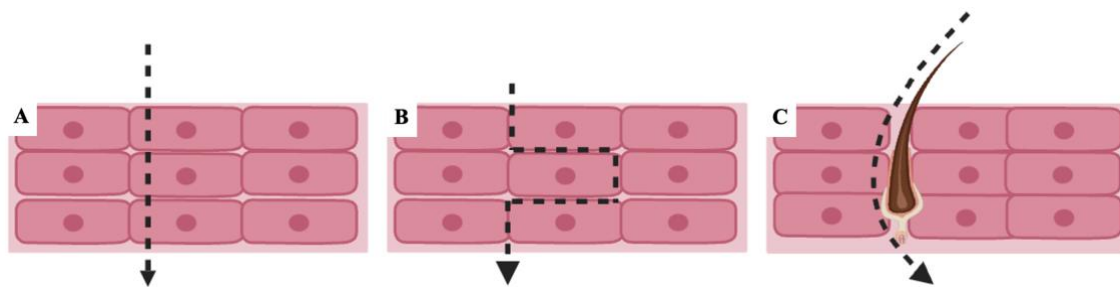


Figura 3. Representação da penetração de substâncias no estrato córneo. A – Via transcelular; B – via intercelular; C – via de anexos cutâneos. Criado com BioRender,

A via de penetração através do estrato córneo ou dos anexos cutâneos está inteiramente associada às propriedades físicas e químicas tanto do ativo quanto da formulação utilizada. Dessa forma, algumas características como lipofilicidade adequada (moléculas altamente lipofílicas podem ficar retidas no estrato córneo), baixo peso molecular, concentração do ativo, composição da formulação, condições da pele, podem favorecer o processo de penetração do estrato córneo e melhorar a resposta farmacêutica esperada (25).

2.3. Rosácea

Rosácea é uma doença dermatológica crônica, ainda de fisiopatologia desconhecida, e sem cura, que pode ter controle através do tratamento adequado. Estudos mostram que fatores genéticos, anomalias do sistema imunológico, disfunção neuronal, reações inflamatórias causadas por microrganismos e hiper-reatividade vascular podem estar envolvidos no desenvolvimento da rosácea, além dos fatores ambientais, como calor, estresse, exposição à radiação UV e fatores nutricionais(2,8,9).

Acomete principalmente a região centro-facial e está associada ao comprometimento da barreira cutânea, o que contribui para a fisiopatologia da doença. Observa-se que pacientes com rosácea possuem um aumento da perda de água transepidérmica, tornando a pele seca com maior suscetibilidade à descamação e alta sensibilidade (3).

De forma geral, a rosácea caracteriza-se pelo rubor facial (Figura 4), que pode ser transitório ou não transitório, eritema, telangiectasia, formação de pápulas ou pústulas inflamatórias no nariz, queixo e bochechas, podendo estar associada ou não a sintomas oculares, como olho seco e sensível (2,8). Existem quatro tipos clínicos de rosácea com base nos sinais e sintomas predominantes, sendo eles: 1) Subtipo Eritemato-

telangiectásica, 2) Subtipo Papulopustuloso, 3) Subtipo Fimatoso e 4) Subtipo Ocular (1,2,9).

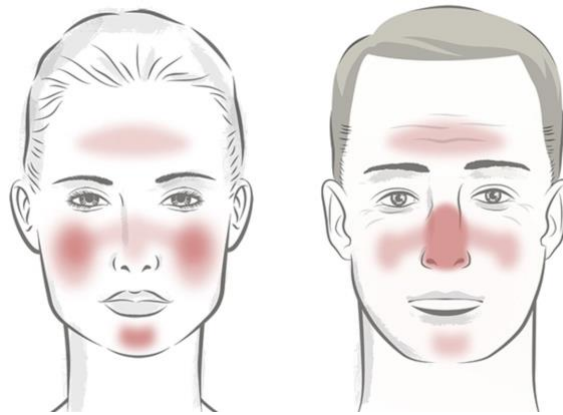


Figura 4. Ilustração do acometimento da rosácea na face. Adaptado de (3)

Embora os sinais e sintomas sejam cutâneos, a rosácea, por ser uma doença dermatológica facial pode causar implicações na saúde mental dos pacientes, impactando drasticamente na qualidade de vida dos acometidos (4). Dessa forma, torna-se de grande relevância o tratamento da doença com o intuito de evitar o agravamento e possíveis complicações.

Apesar da rosácea ser descrita como uma doença sem cura, é possível controlar os sintomas com as diversas opções terapêuticas disponíveis para cada caso clínico, sendo elas de uso tópico ou sistêmico (3).

Os tratamentos tópicos visam controlar os surtos com opções terapêuticas que sejam de boa tolerabilidade e impacto positivo na qualidade de vida dos acometidos (3). Entretanto, os tratamentos disponíveis são pouco tolerados pela pele sensível e nem sempre mostram efeitos devido principalmente à baixa penetração cutânea dos princípios ativos das formulações, impactando em uma baixa biodisponibilidade dermatológica do ativo (13).

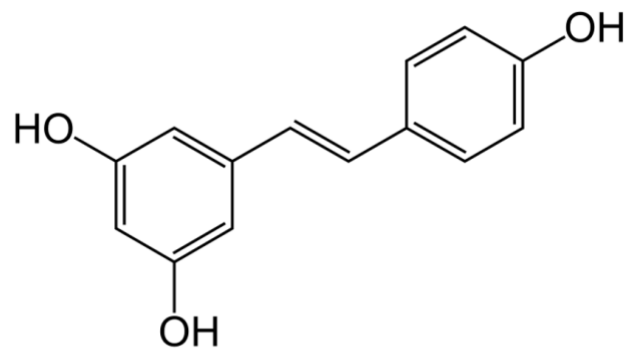
O Consenso Global de Rosácea (ROSCO) considera a doença de origem multifatorial com fisiopatologia voltada para a potencialização de processos inflamatórios e vasculares que desencadeiam a rosácea, induzindo à aceleração da proliferação e diferenciação epidérmica e à disfunção do estrato córneo, com a diminuição da capacidade de controlar os níveis de água, acarretando a piora da inflamação e agravo na barreira da pele (1,3,4,9).

2.4. Resveratrol

O resveratrol é um componente polifenólico natural que exibe diversas atividades farmacológicas já descritas na literatura, como ação anti-inflamatória, imunomoduladora, antiviral e antioxidante (10,26,27). É sintetizado na epiderme das folhas e no pericarpo das bagas de uva, e também é encontrado em outras 70 espécies naturais (10). É uma molécula de difícil incorporação em formulações tópicas convencionais de base aquosa por causa de sua alta lipossolubilidade (11). Problemas de estabilidade e baixa penetração cutânea também tem impedido seu uso terapêutico em formulações de aplicação tópica.

A molécula do resveratrol foi isolada pela primeira vez em 1939, na raiz da planta japonesa *Polygonum cuspidatum*, considerada a espécie com maior concentração de resveratrol. Foi categorizada como um estilbeno natural com a fórmula química 3,5,4'-trihidroxi-trans-stilbeno. Curiosamente, o resveratrol é um metabólito secundário da planta, produzido como resultado da reação adaptativa a fatores de estresse ambientais, como infecções fúngicas, lesões e irradiação UV (28–33). As fitoalexinas, metabólito de baixo peso molecular do resveratrol, são capazes de inibir o progresso de infecções causadas por fungos.

Os polifenóis como o resveratrol estão ganhando grande popularidade devido aos seus efeitos benéficos, porém um fator limitante é a baixa estabilidade (32). Por isso, para a utilização do ativo que vem se tornando cada vez mais popular é necessário o desenvolvimento de tecnologias que melhorem a sua biodisponibilidade e estabilidade(34). A respeito das características físico-químicas da molécula de resveratrol, tem-se que o seu peso molecular é 228,24 g/mol, Log P = 3,1, possui baixa solubilidade em água (0,03 mg/mL); porém apresenta solubilidade em solventes orgânicos; e temperatura de decomposição igual a 261°C (19).



Resveratrol

Figura 5. Estrutura química do Resveratrol. Fonte: Drugbank.com

Estudos *in vitro* sugerem que o resveratrol pode proteger contra doenças cardiovasculares por diferentes mecanismos, como inibição da lipoproteína LDL, inibição de plaquetas, ou aumento da vasodilatação. Os benefícios cardiovasculares estão associados ao consumo moderado de vinho e pode ser uma das explicações do “paradoxo francês”, isto é, a baixa mortalidade por doenças coronárias na França, apesar da dieta desregrada e intenso tabagismo(35).

Nos últimos anos houve um aumento significativo de novos produtos contendo resveratrol no mercado, que vão desde alimentícios, até farmacêuticos e cosméticos. Isso tende a aumentar considerando que a molécula de resveratrol apresenta muitas propriedades benéficas para a saúde e que a aplicação de novas tecnologias na produção de formulações farmacêuticas e cosméticas devem sanar as características das moléculas que prejudicam a sua comercialização, como instabilidade físico-química e baixa solubilidade aquosa (36).

2.5. Óleo de semente de uva

O óleo de semente de uva tem sido amplamente utilizado tanto na indústria farmacêutica para a produção de medicamentos e cosméticos, como também na indústria alimentícia, devido ao seu valor nutricional (17). O óleo é extraído das sementes, geralmente a partir de um processo de prensagem a frio, método que não envolve tratamento térmico e, portanto, preserva mais as propriedades farmacológicas dos seus constituintes aumentando os benefícios (37,38).

Constituído por uma grande quantidade de compostos fenólicos (flavonóides, carotenóides, ácidos fenólicos, e estilbenos), ácidos graxos, como o ácido linoleico e vitamina E, o óleo de semente de uva apresenta propriedades benéficas para a pele devido aos seus constituintes (16,39,40). Os principais efeitos citados estão relacionados com o resveratrol, compostos fenólicos, ácido linoleico, fitoesteróis e vitamina E (16).

Os compostos fenólicos na composição do óleo apresentam grande potencial antioxidativo, relacionado à remoção de radicais livres que influenciam na sinalização celular, reduzindo o processo inflamatório. O ácido linoleico, ácido graxo mais abundante na composição do óleo (16), por sua vez, além de possuir atividade anti-inflamatória, apresenta potencial de hidratação, pela reparação e fortalecimento da barreira cutânea, prevenindo contra a ação de agentes externos e impedindo a desidratação – promovendo a hidratação pela redução da perda de água pela barreira cutânea (16,39).

A vitamina E, também conhecida como tocoferol, é também um antioxidante, que tem ação anti-inflamatória e poder rejuvenescedor por atuar na inibição da enzima que destrói o colágeno, a colagenase (41). O resveratrol, já citado anteriormente nesse estudo e classificado como um polifenol natural, também faz parte da composição do óleo e é capaz de reduzir a resposta inflamatória pela inibição do ácido araquidônico (42) .

Tendo em vista que a atividade biológica esperada depende da capacidade da formulação sintetizada com óleo de semente de uva em atravessar a barreira cutânea, o óleo se mostra como uma interessante alternativa para tratar problemas de pele, devido ao seu grande potencial antioxidante, anti-inflamatório e hidratante.

2.6. Nanotecnologia

A nanotecnologia se dedica ao desenvolvimento de sistemas em escala nanométrica a partir de diferentes tipos de materiais e com as mais variadas aplicações. Uma dessas aplicações é a obtenção de novos medicamentos. Sistemas farmacêuticos concebidos em escala nanométrica possibilitam a liberação direcionada de fármacos, aumento de estabilidade, melhor absorção e, como consequência, biodisponibilidade aumentada que normalmente reflete em redução de doses, mais segurança e melhora da resposta terapêutica (14,22,43).

Entre os diversos sistemas nanotecnológicos, as nano e microemulsões compreendem dispersões coloidais estáveis de dois líquidos imiscíveis entre si,

geralmente água e óleo, estabilizadas por agente tensoativo normalmente auxiliado por um cotensoativo (44).

As microemulsões, cuja definição foi proposta em 1943 por Hoar e Shulman (45) especificamente, ao contrário das emulsões convencionais, são sistemas termodinamicamente estáveis de formação espontânea. São sistemas isotrópicos, transparente, formados pela dispersão de água e óleo e um sistema tensoativo em proporções bem estabelecidas. O tamanho das gotículas da fase interna de uma microemulsão é compreendido entre 20 e 200 nm (14,22). As microemulsões podem ser classificadas como: óleo em água – O/A, quando as gotículas de água estão dispersas em fase aquosa; água em óleo – A/O, quando ocorre o inverso, em que as gotículas de água estão dispersas em fase oleosa contínua; ou sistema bicontínuo, que seria um estado de transição entre os dois estados anteriores (14) (Figura 6).

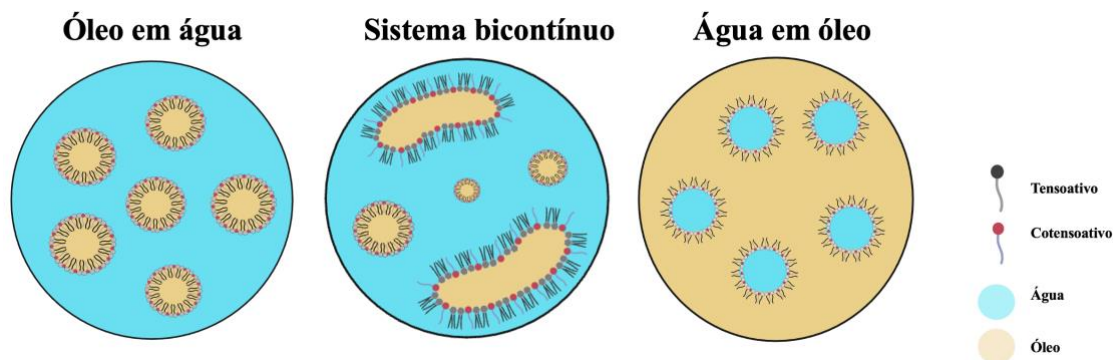


Figura 6. Representação do tipo de sistemas microemulsionados. Criado com BioRender.

O desenvolvimento de uma nanoformulação é possível por dois métodos distintos, de alta e baixa energia de emulsificação. Quando desenvolvida pelo método de alta energia, utilizam-se equipamentos mecânicos que sejam capazes de produzir intensas perturbações físicas, como por exemplo, agitadores de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e geradores de ultrassom. Quanto maior a força utilizada durante o processo de produção, espera-se menor o tamanho de gotícula (14,22).

No método de alta energia há uma perturbação intensa e um fluxo de cisalhamento que mistura as fases oleosa e aquosa sob alta pressão. Na técnica de microfluidização, a emulsificação ocorre através da colisão de correntes de dois fluidos que são imiscíveis, e se deslocam em um microcanal sob alta pressão; e é submetida a várias passagens pelo equipamento para garantir uma uniformidade de tamanho (20).

O gerador de ultrassom, também chamado de ultrassom de ponta ou sonicador de ponta, é o método que necessita de menos energia, pois depende de ondas sonoras. O equipamento produz ondas ultrassônicas que produzem bolhas de cavitação que crescem continuamente até implodirem. Essa implosão gera o colapso das bolhas, que são causadas pelas flutuações de pressão da onda ultrassônica, reduzindo o seu tamanho (46).

Vale ressaltar que assim como as nanoemulsões, as microemulsões são dispersões coloidais produzidas a partir de uma proporção de água, óleo e sistema tensoativo. Entretanto, as microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis e podem ser formadas espontaneamente, sem a necessidade de qualquer energia externa, como os métodos citados anteriormente. Já as nanoemulsões sempre requerem a aplicação de alguma energia externa para a conversão dos componentes isolados em uma dispersão coloidal, por serem sistemas termodinamicamente instáveis (14,47,48). A forma como a energia externa é aplicada para formar uma nanoemulsão pode variar, dependendo do método de preparação utilizado (47).

Em contraste aos métodos que utilizam alta energia, tem-se o desenvolvimento de microemulsões que se utilizam de baixa energia de emulsificação. São subdivididos em emulsificação espontânea (EI) e inversão de fases por temperatura (IFT). A emulsificação espontânea envolve a mistura de um agente tensoativo lipofílico com a fase oleosa do sistema, um agente tensoativo hidrofílico com a fase aquosa. Nessa sequência, a fase oleosa é adicionada a fase aquosa sob agitação magnética constante e o sistema é prontamente formado (49,50).

Para o método de inversão de fases por temperatura, as microemulsões se formam explorando alterações na solubilidade do tensoativo em resposta à flutuação da temperatura ou composição da formulação. Pode ocorrer de duas maneiras: (A) inversão de transição induzida por mudanças que afetam o equilíbrio hidrófilo-lipofílico (EHL), temperatura ou concentração de eletrólitos e (B) inversão catastrófica, em que é induzido o aumento do volume da fase dispersa (51,52).

Dependendo do sistema e composição, vários tamanhos de gotículas podem ser desenvolvidos para os métodos que envolvam alta ou baixa energia de emulsificação. Quanto ao tipo de microemulsão formada, há grande influência das propriedades físicas e químicas do tensoativo e cotensoativo selecionados, que são traduzidas pelo seu valor EHL (14,20).

O sistema EHL é uma forma de classificar a predominância das porções hidrofílicas e lipofílicas sobre a ação de um tensoativo. Por esse método, atribui-se um valor EHL a um tensoativo com base em sua polaridade. Materiais altamente polares ou hidrofílicos apresentam valores mais elevados do que os menos polares e mais lipofílicos. Tensoativos com valores de 3 – 6 são altamente lipofílicos e usados com maior predominância para formar microemulsões A/O e os com valores de 8 – 18 são mais hidrofílicos com predominância de formação de microemulsões O/A (20). Cabe enfatizar que a capacidade de formação de uma ME O/A ou A/O não depende somente do EHL do tensoativo, mas também de fatores como temperatura do meio e presença de cotensoativo (20).

Uma tarefa difícil é a distinção entre esses dois tipos de dispersões coloidais, nano e microemulsão, simplesmente analisando o sistema visualmente, medindo a distribuição de diâmetro de gotícula ou com base nos métodos usados para produzi-las (47). O método de emulsificação espontânea, por exemplo é uma dispersão coloidal visualmente transparente, formada a partir da mistura de tensoativo e óleo adicionada a uma solução de água sob agitação. As dispersões formadas por essa abordagem podem ser tanto do tipo microemulsão como nanoemulsão, dependendo da razão tensoativo, nesse caso chamado de surfactante para óleo (SOR): em que o SOR mais alto, a microemulsão é formada, em contrapartida, o SOR mais baixo, o resultado é a nanoemulsão (47,53). Para esse estudo, como base no método de desenvolvimento, na análise óptica do sistema de dispersão coloidal gerado e na distribuição de diâmetro de gotícula, foram formadas microemulsões, como proposto pelo objetivo.

O aumento do uso de microemulsões se dá por fatores que são: excelente capacidade para solubilizar substâncias, o aumento da estabilidade e biodisponibilidade de fármaco destinado para as diversas maneiras de administração, aumento da entrega, penetração do fármaco em seu alvo devido ao pequeno tamanho de gotícula, fácil manipulação, uma vez que possui baixa viscosidade, além de serem termodinamicamente estáveis e, portanto, geram produtos com maior prazo de validade (14,20).

2.7. Diagramas de fases pseudoternários

Quando se propõe desenvolver um sistema microemulsionado, uma das melhores alternativas para planejamento e desenvolvimento é o uso do diagrama de fases ternário. Ele ilustra o equilíbrio de várias fases com todas as combinações possíveis de três componentes (fase oleosa, fase aquosa e tensoativo) a uma temperatura e pressão constantes (Figura 7) (54,55). O diagrama de fases desenvolvido para esse estudo é caracterizado por ser pseudoternário, em que os componentes tensoativos que atuam como emulsificantes são agrupados. Logo, nos vértices do digrama foram empregadas: a mistura tensoativo-cotensoativo, como um componente, fase aquosa e oleosa (56). A proporção de tensoativo-cotensoativo utilizada foi previamente estabelecida conforme com o EHL requerido de emulsificação para o tensoativo e cotensoativo.

A construção do diagrama de fases elucida interações que ocorrem quando diferentes proporções dos componentes de uma mistura são incorporadas. A formação de uma microemulsão é influenciada por uma variedade de fatores, incluindo a proporção de seus constituintes, composição química das substâncias desenvolvidas, bem como pressão e temperatura (23).

Na construção do diagrama de fases, é possível identificar regiões que correspondam à proporção entre os componentes em que são formadas microemulsões do tipo O/A, bicontínua e A/O. Esse estudo planejado permite prever qual o tipo de microemulsão será desenvolvida a partir da seleção dos constituintes e proporções de cada um (14,22).

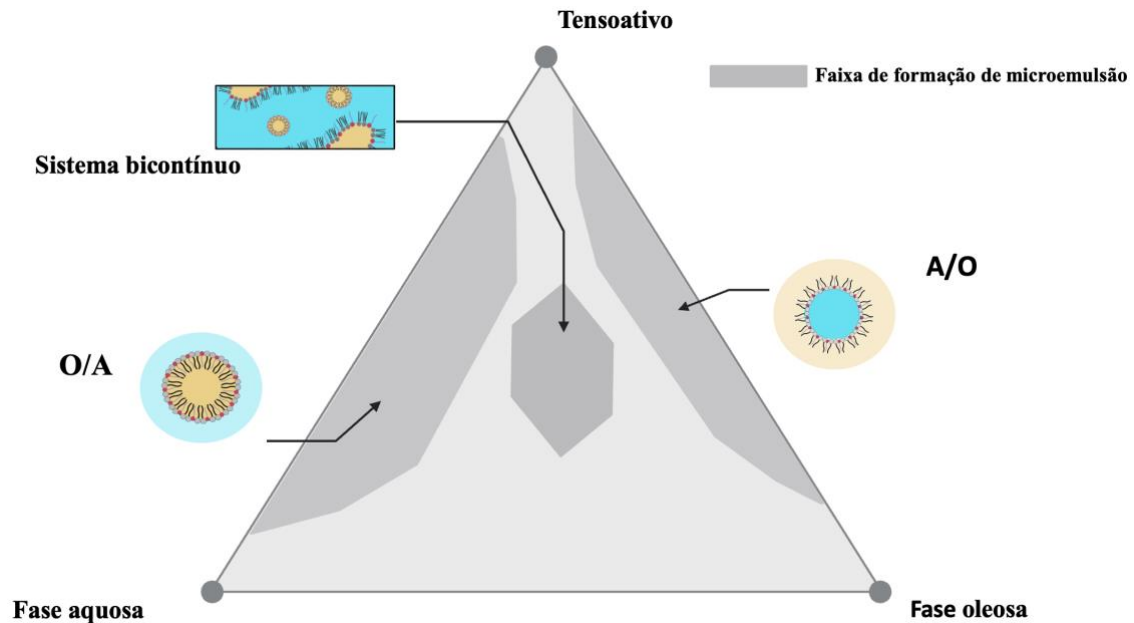


Figura 7. Representação do diagrama de fase pseudoternário e as suas regiões de formação. Adaptado de (22)

O diagrama de fases pseudoternário representa diretamente um sistema formado por três componentes, podendo ser água, óleo, tensoativo-cotensoativo. Sua representação é feita com base em um diagrama triangular, em que cada constituinte ocupa um vértice do triângulo, como ilustra a Figura 7. Para a interpretação do diagrama representado por um triângulo equilátero, vale ressaltar que cada vértice representa de 0 a 100% de cada componente e a distância de um ponto a um dos lados representa a porcentagem do componente indicado no vértice oposta este lado, e a soma das porcentagens indicadas dos componentes serão sempre iguais a 100%, formando uma estrutura que pode incluir microemulsão do tipo óleo em água ou água em óleo, dependendo da concentração dos componentes (48)

3.OBJETIVOS

3.1. Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar microemulsões contendo óleo de semente de uva enriquecido com resveratrol como alternativa terapêutica tópica segura e eficaz para o tratamento da rosácea.

3.2. Específicos

- Validar método analítico seletivo, preciso e exato para quantificação do resveratrol extraído das camadas da pele nos experimentos de permeação cutânea;
- Verificar a compatibilidade entre resveratrol e os componentes utilizados para o preparo das microemulsões;
- Desenvolver microemulsões com óleo de semente de uva enriquecida com resveratrol;
- Caracterizar físico-quimicamente as microemulsões selecionadas para estudo;
- Avaliar comportamento reológico e estabilidade das microemulsões;
- Avaliar *in vitro* a penetração/permeação cutânea do resveratrol a partir das microemulsões;
- Estudar *in vitro* a segurança das microemulsões desenvolvidas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

O resveratrol ($\geq 99\%$) foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os solventes utilizados nas análises cromatográficas (acetonitrila e metanol) foram obtidos da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e o ácido fosfórico grau cromatográfico foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Para o preparo das microemulsões, o óleo de semente de uva foi obtido da Mundo dos Óleos (Brasília, Brasil), o polissobarto 80 (Tween 80) e monoleato de sorbitano (Span 80) foram obtidos da Dinâmica Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil) e Supelco (São Paulo, Brasil), respectivamente. Para o preparo do tampão foram adquiridos o fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e hidróxido de sódio (Dinâmica Contemporânea Ltda. São Paulo, Brasil). Fitas Scotch Book Tape no. 845 (3M, St. Paul, MN, EUA) foram utilizadas no procedimento de *tape stripping*. Os ovos de galinha utilizados nos estudos de irritação (HET-CAM) foram cedidos pela Avifran (Planaltina, Brasil). Filtros de nylon pré-limpos, de diâmetro 25 mm e poro 0,45 μm , hidrofóbicos e hidrofílicos, foram comprados da Analítica (São Paulo, Brasil). Todas as análises foram realizadas com água tipo Milli-Q (Millipore, França).

4.2 Obtenção e preparo da pele de porco

Para o teste de permeação cutânea foram utilizadas orelhas de suínos cedidas pelo Frigorífico Nippobras (Formosa, Goiás, Brasil) ou adquiridas no Frigorífico Sabugi (Planaltina, Distrito Federal, Brasil). As orelhas dos suínos utilizadas nos estudos foram coletadas logo após o abate do animal, antes do processo de escalda, e transportadas sob refrigeração para o laboratório. Após lavagem em água corrente, a pele foi removida da região externa da orelha com auxílio de bisturi e separada de sua camada adiposa com o auxílio de tesoura (Figura 8). A pele foi cortada então em fragmentos circulares de aproximadamente 2cm^2 de diâmetro e armazenada a -4°C por período de até dois meses antes do uso.

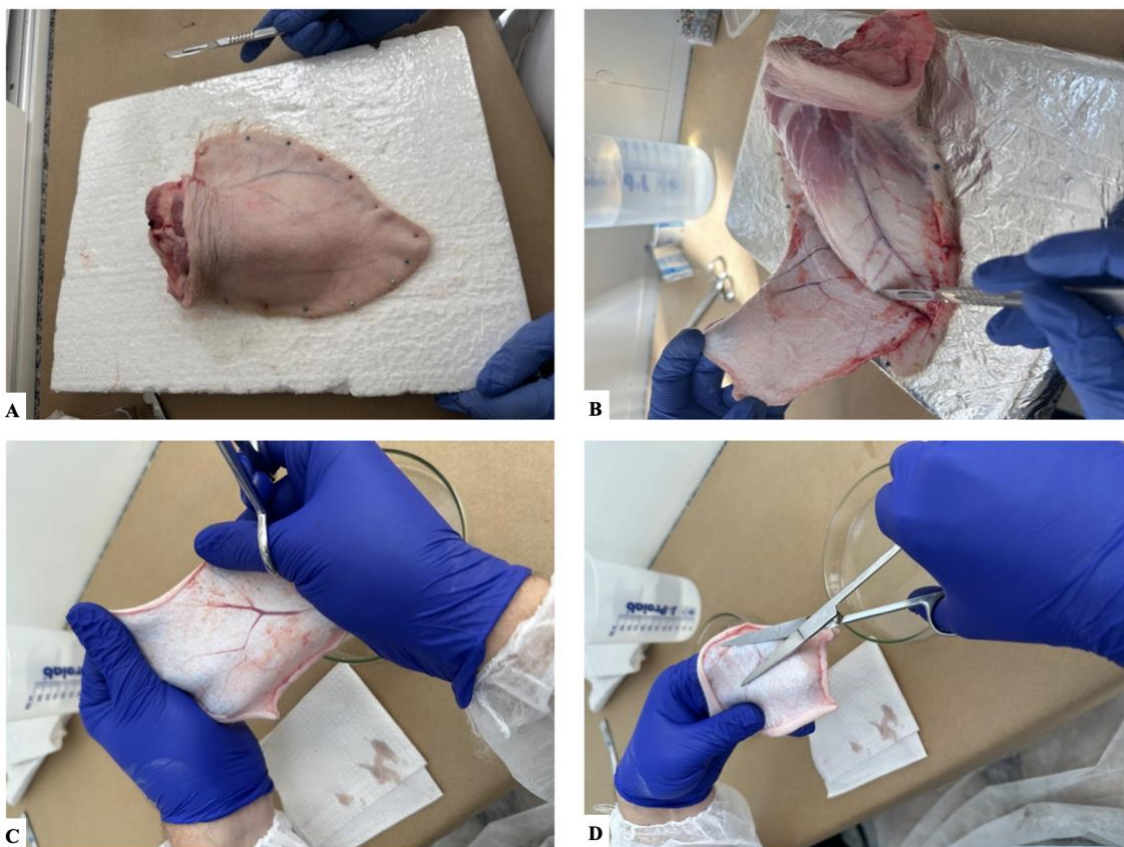


Figura 8. Representação do processo de remoção e limpeza da pele da orelha de suíno.

O processo de remoção e limpeza da pele da orelha do suíno começa com a fixação da orelha em suporte com o auxílio de alfinetes (Figura 8A). Com a orelha bem fixada levanta-se a pele com o auxílio de bisturi, de forma que a pele vá se separando da orelha (Figura 8B). Com a pele inteira removida da região externa da orelha (Figura 8C), é removida a camada adiposa, muscular e vasos sanguíneos com o auxílio de tesoura (Figura 8D).

4.3. Desenvolvimento e validação do método analítico

Para desenvolvimento do método analítico cromatográfico, primeiramente foi feito um levantamento bibliográfico utilizando os bancos de dados Google Scholar, Pubmed, Scielo e Scopus. Os termos utilizados, para a pesquisa, foram “*development analytics resveratrol*”, “*resveratrol and HPLC*” e “*resveratrol and validated HPLC method*”. Dos resultados obtidos do levantamento bibliográfico, foi realizada uma seleção dos estudos que tinham como objetivo validação de método. Foram escolhidos os métodos que consistiam no uso de coluna de fase reversa C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm). Para a fase móvel, optou-se pelos métodos isocráticos descritos por Vivero-Lopez e Lopes e seus colaboradores usando proporções de acetonitrila e ácido fosfórico a 0,01 –

0,02 mol/L, com temperatura de forno de 30 – 50°C, volume de eluição de 10 µL e comprimento de onda a 310 – 320 nm (34,35)

As análises cromatográficas foram realizadas usando equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) modelo Shimadzu LC 20-AD, equipado com detector de arranjo de diodos (SPD-20A), bomba (LC-20D), desgaseificador (DGU-20A3), injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS). A adaptação do método resultou na seleção de fase estacionária, em que foi utilizada coluna de fase reversa Discovery C₁₈ (Supelco 250 mm x 4.6 mm, 5 µm). A fase móvel utilizada foi composta por ácido fosfórico a 0,01mol/L e acetonitrila em uma proporção de 70:30 (v/v). Após a mistura dos componentes, a fase móvel foi filtrada em membrana de nylon de 0,45 µm, em sistema de filtração à vácuo, e desgaseificados em banho de ultrassom por 10 min. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL, com o forno aquecido na temperatura de 30°C e eluição a 0.8 mL/min. A detecção e quantificação foram realizadas com o comprimento de onda a 310 nm.

O método analítico padronizado foi validado conforme as diretrizes estabelecidas pela RDC N° 166, DE 24 julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e de acordo com as diretrizes preconizadas pelo *International Conference on Harmonisation* – ICH, em termos de especificidade/seletividade considerando os interferentes da pele, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação (57,58).

4.3.1 Padronização do processo de extração de ativo da pele

Inicialmente, a técnica de *tape-stripping* (Figura 9) foi aplicada com o intuito de separar as frações da pele, ou seja, o estrato córneo da pele remanescente, que corresponde à epiderme viável e derme (59). Para isso, fragmentos de pele de suínos (2 cm²) foram fixados com o auxílio de alfinetes em suporte de isopor, com o estrato córneo voltado para cima. Com a aplicação de 15 pedaços de fita adesiva sob a pele de suíno, o estrato córneo foi completamente removido. As fitas foram colocadas conjuntamente em frasco. A pele remanescente foi cortada em pequenos pedaços com o auxílio de tesoura, acondicionados em segundo frasco.

A cada frasco de vidro contendo as camadas da pele foram adicionados 250 µL de solução metanólica de resveratrol (25 µg/mL). Os frascos foram deixados abertos em capela de exaustão para a completa evaporação do solvente orgânico.

Após, foram aplicados dois diferentes protocolos de extração do ativo: 5 mL de metanol foram adicionados a cada frasco, que foram tampados, uma das amostras deixada em repouso por 24 h sem agitação, e a outra mantida sob agitação moderada durante o mesmo período. Em seguida, as amostras foram filtradas em membrana de 0,45 μm e levadas para observação seguindo o método CLAE para análise do conteúdo de resveratrol.

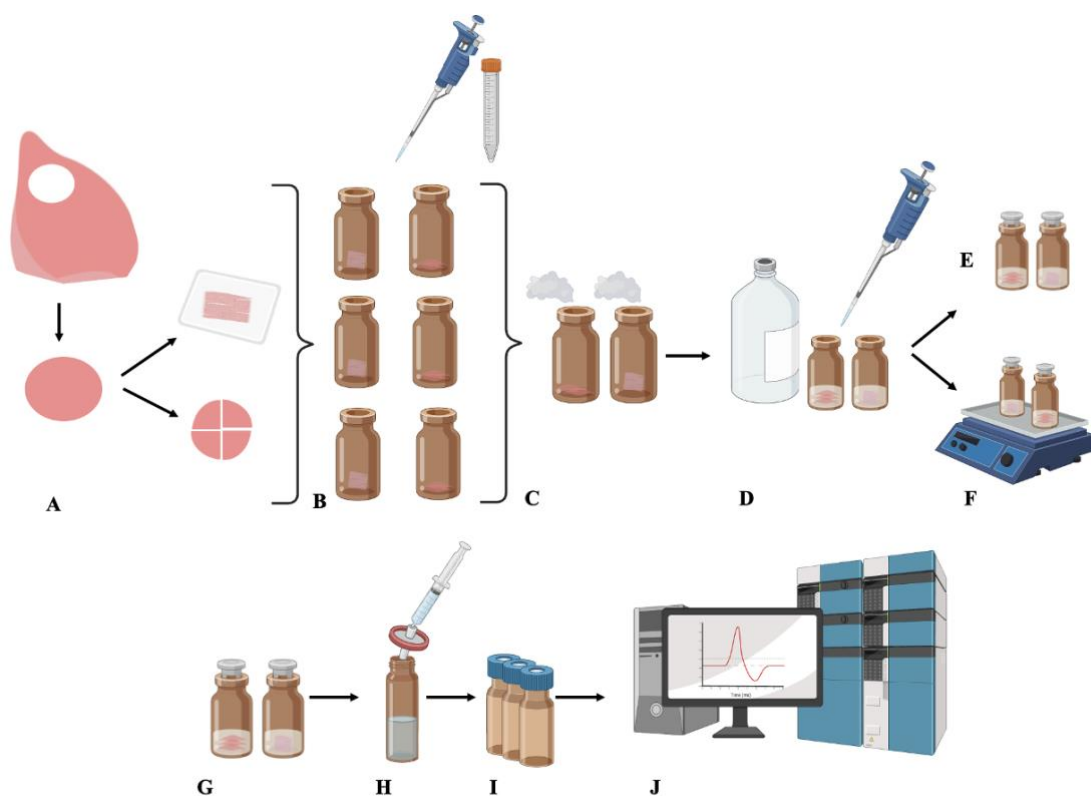


Figura 9. Representação da técnica de *tape-stripping* e métodos de extração testados para a recuperação do resveratrol das camadas da pele. A – Depois da limpeza da pele, separação das camadas, estrato córneo e pele remanescente; B – Adição da solução metanólica de resveratrol aos frascos com as camadas da pele separadas; C – Frascos após adição da solução de resveratrol aguardando a total evaporação do solvente; D – Adição de 5 mL de solvente para a extração. E – Amostras em repouso; F – amostras sob constante agitação para avaliação do método extrator para a recuperação do ativo; G e H – Término do período de 24h dos métodos de repouso e agitação, amostras filtradas com membrana de 0,45 μm ; I – amostras acondicionadas em vials de vidro âmbar; J – análise das amostras. Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.

4.3.2. Seletividade

Para avaliação da seletividade do método, foram analisadas amostras de estrato córneo e pele remanescente, utilizando o metanol como solvente para a extração dos interferentes a partir das matrizes biológicas, obtidas de forma semelhante ao descrito no item anterior. As amostras foram contaminadas ou não com o resveratrol (57,58). Os cromatogramas obtidos da análise dos extratos de pele na presença ou ausência de ativo foram comparados entre si e ao cromatograma do ativo sem a presença dos interferentes da pele, de modo a se verificar a capacidade do método de quantificar e distinguir o ativo dos interferentes da pele.

4.3.3. Linearidade

Três soluções-estoque independentes de resveratrol a 100 µg/mL em metanol foram preparadas. Alíquotas dessas soluções foram diluídas em metanol para obter uma curva de calibração na faixa de concentração de 1 µg/mL a 20 µg/mL (1, 5, 10, 15 e 20 µg/mL). As alíquotas foram preparadas em triplicata para cada concentração, filtradas em filtro de nylon de membrana de porosidade 0,45 µm e analisadas por CLAE segundo o método analítico padronizado.

Os dados obtidos foram plotados em gráficos, relacionando a concentração do resveratrol com a área do pico fornecida pelo equipamento, seguidos da análise estatística dos dados, utilizando o método de regressão linear, que fornece uma reta no formato $y = (a)x + (b)$, em que (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) ao coeficiente linear. Dessa forma, a linearidade foi determinada usando o coeficiente de correlação linear (r), em que o valor mínimo aceitável foi igual ou superior a 0,99 (57)

Também foi testado o efeito matriz que os contaminantes poderiam gerar sobre as respostas analíticas, sendo determinado pela comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com o ativo em metanol e com o ativo em metanol contaminado com interferentes do estrato córneo e da pele remanescente (57,60), obtidos de acordo com o procedimento descrito no item 4.3.1. De acordo com a RDC nº 166 24 de julho de 2017, o paralelismo das retas indica ausência de interferência dos componentes da matriz. A Equação 1 (57,58) descrita a seguir foi utilizada para determinar a significância do efeito (%):

$$Ef = \frac{S_{matrix-Ssolvente}}{S_{solvente}} \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

em que: *Smatriz* é o coeficiente angular da curva de calibração do analito na matriz, e *Ssolvente* é o coeficiente angular da curva de calibração do analito em metanol.

4.3.4. Precisão

A precisão, que avalia a proximidade entres os resultados obtidos em múltiplas análises seguindo o método (57), foi determinada pela repetibilidade instrumental, utilizando a mesma amostra na concentração de 10 µg/mL para o ativo em seis análises realizadas de forma independente. Foi analisada também a repetibilidade do método em dois dias diferentes com dois analistas diferentes. Após a análise das amostras, as concentrações de resveratrol foram determinadas e os coeficientes de variação (CV), que determina a precisão, foram calculados por meio da seguinte Equação 2 (57,58):

$$CV\% = (\text{Desvio Padrão}/\text{Concentração Média}) \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

em que: CV% = coeficiente de variação; Desvio Padrão = estimativa do desvio padrão da média; Concentração Média = média das medidas, em triplicata, para cada concentração analisada.

4.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir da porcentagem de resveratrol recuperado do estrato córneo e da pele remanescente usando o método de extração estabelecido. Os ensaios foram conduzidos com três concentrações diferentes (5, 10 e 15 µg/mL), em triplicata para cada concentração.

Para obtenção das amostras que foram analisadas, fragmentos da pele suína foram separados usando a técnica de *tape stripping*, conforme descrição prévia (item 4.3.2). Uma solução metanólica de resveratrol foi aplicada em cada amostra e após o solvente ter evaporado por completo, foram adicionados 5 mL de metanol em cada amostra de estrato córneo e pele e deixados sob agitação a 300 rpm por 24 h. Após, as amostras foram filtradas em filtro de nylon de membrana de 0,45 µm e adicionadas em frascos para análise cromatográfica.

No CLAE foi utilizada a metodologia citada acima e a exatidão foi relatada como a porcentagem de resveratrol recuperado em cada camada da pele em relação à concentração de ativo inicialmente adicionada.

4.3.6. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção – LD, que corresponde à menor quantidade de analito em amostra que pode ser detectada, pôde ser estimado baseando-se nos parâmetros da curva analítica, usando o desvio padrão na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (57) conforme a Equação 3(57,58):

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

em que: LD = Limite de detecção; DP = Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações da substância próximas ao suposto limite de quantificação; IC = Inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação – LQ teórico, que corresponde à menor quantidade do analito em amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (57) foi estimado com base na Equação 4 (57,58):

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

em que: LQ = Limite de quantificação; DP = Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações da substância próximas ao suposto limite de quantificação; IC = inclinação da curva de calibração.

Após a determinação dos limites teóricos, foram preparadas amostras de concentração decrescentes de resveratrol (concentrações abaixo da menor concentração da curva analítica: 0,50, 0,40, 0,30, 0,20, 0,10, 0,08, 0,05 e 0,02 µg/mL) com o intuito de verificar o menor valor quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, confirmando o valor teórico calculado de LQ.

4.4. Solubilidade

O ensaio de solubilidade do resveratrol foi realizado em temperatura ambiente, adicionando-se uma quantidade em excesso de resveratrol, para garantir a saturação, em frascos compreendendo 1 mL dos seguintes meios: água e tampão fosfato 0,01 mol/L pH 7,4, contendo 0, 1, 2,5 e 5% de polissorbato 80 (Tween 80), polissorbato 80 (Tween 80) isolado, monoleato de sorbitano 80 (Span 80) isolado e óleo de semente de uva isolado. O ensaio foi realizado em triplicata para cada meio testado.

Os frascos foram fechados e deixados sob agitação magnética a 300 rpm por 24 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2150 x g por 30 min para a sedimentação do excesso de resveratrol. O sobrenadante foi filtrado e a solução obtida foi levada para quantificação no CLAE, seguindo o método analítico validado.

4.5. Estudos de compatibilidade

Os estudos de compatibilidade foram realizados por meio da análise térmica do ativo individualmente, e da mistura física do ativo junto dos componentes da microemulsão em proporções equimassa, como descrito na Tabela 1, a seguir. As amostras foram submetidas aos estudos de compatibilidade utilizando-se as técnicas de análise termogravimétrica e de calorimetria de varredura diferencial. A composição selecionada para as misturas foram calculadas com o objetivo de maximizar o surgimento de possíveis incompatibilidades (61)

Tabela 1. Sumário da composição das misturas físicas do ativo e dos excipientes para verificação da compatibilidade química da formulação.

MISTURAS	COMPOSIÇÃO (% p/p)			
	Resveratrol	Span 80	Tween 80	Óleo de semente de uva
M1	50	50	-	-
M2	50	-	50	-
M3	50	-	-	50
M4	50	16,67	16,67	16,67

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas usando o DTG-60H (Shimadzu, Japão). As amostras foram pesadas (3 – 5 mg) em *pans* de platina em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min e velocidade de aquecimento de 10 °C/min no intervalo entre 25 e 500 °C. Todas as medições térmicas foram realizadas usando o *software* TA-60 Shimadzu.

As análises de calorimetria de varredura diferencial (DSC) foram realizadas em DSC-60 (Shimadzu, Tokyo, Japan), em *pans* de alumínio, sob atmosfera controlada de nitrogênio com vazão de 20 mL/min. As amostras de aproximadamente 3 mg foram analisadas sob a taxa de aquecimento de 10 °C/min de 30° até a máxima de 280 °C.

4.6. Obtenção das microemulsões

4.6.1. Método do ponto de inversão de fases

Para o desenvolvimento da microemulsão O/A foi utilizado o método do ponto de inversão de fases (EIP). Primeiramente, certa quantidade de fase oleosa (contendo as devidas proporções de tensoativo e cotensoativo) enriquecida com o ativo foi agitada mecanicamente por 15 min (300 rpm) a temperatura igual a $50 \pm 5^\circ\text{C}$. A quantidade estabelecida de fase aquosa (água ultrapura), levemente aquecida, foi então adicionada por meio de gotejamento a fase oleosa e deixada em agitação mecânica (300 rpm) por mais 20 min. Após esse período, a dispersão foi submetida à agitação utilizando o ultrassonificador por 15 min (10 s ligado e 5 s desligado em amplitude de 20%), com o objetivo de acelerar o processo de homogeneização e estabilização da formulação. Em seguida, o sistema foi centrifugado e analisado (Figura 10).

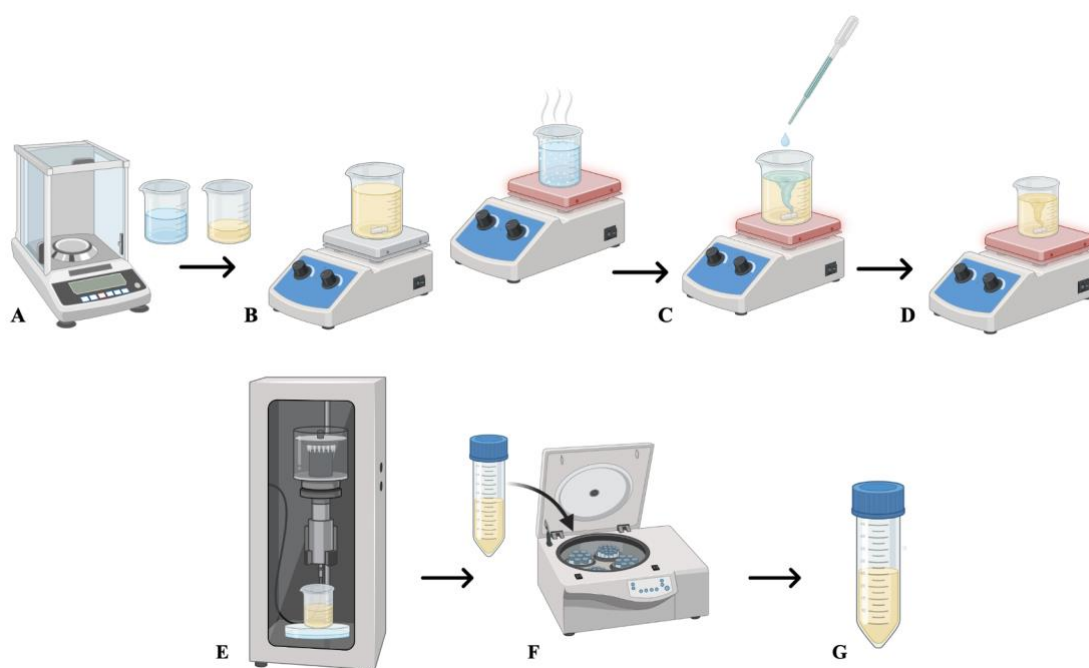


Figura 10. Representação esquemática do processo de obtenção das microemulsões pela técnica do ponto de inversão de fases. A – Pesagem dos componentes da microemulsão, fase oleosa e fase aquosa; B – aquecimento da fase aquosa e agitação (300 rpm) da fase oleosa para solubilização do tensoativo e cotensoativo; C – adição da fase aquosa sob a oleosa; D – agitação das fases aquosa e oleosa proporcionando a formação de um sistema homogêneo; E – Agitação usando o sonicador; F – Centrifugação para avaliar a amostra desenvolvida; G – representação da amostra pronta. Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.

A quantidade de ativo selecionada para incorporação nas microemulsões foi igual a $0,5 \text{ mg/mL}$ e foi incorporada na fase oleosa durante o preparo das microemulsões. Para isso, o ativo foi disperso no óleo de semente de uva e o sistema foi mantido em agitação

a 300 rpm durante 20 min, em temperatura ambiente para completa dissolução. O valor obtido para o enriquecimento da formulação foi obtido com base no teste de solubilidade em óleo.

4.6.2. Construção do diagrama de fases

O diagrama de fases pseudoternário foi construído, misturando os tensoativo (Tween 80 e Span 80), o óleo de semente de uva e a água ultrapura. Esse método permitiu identificar em quais faixas de concentração há formação de microemulsão.

Foram testadas diferentes concentrações dos componentes da formulação: óleo de semente de uva, Tween 80, Span 80 e água ultrapura seguindo-se a metodologia descrita no item anterior (4.6.1). O diagrama de fases pseudoternário foi então construído com o auxílio do software *Origin Pro® 8.0* (Origin Lab Corporation, EUA) em que os sistemas foram classificados quanto à aparência, como microemulsão, formulação turva, formulação leitosa e separação de fases.

4.6.3. Seleção das microemulsões

Com a construção do diagrama, foi possível identificar a área em que se obteve sistemas classificados como microemulsão. Para os ensaios, foram selecionadas duas formulações, que se caracterizaram pelas maiores proporções da fase aquosa e menores concentrações de tensoativos, mantendo-se a concentração de fase oleosa entre 10 e 15%, para garantir a incorporação de concentração apropriada de resveratrol nesta fase.

4.7. Caracterização das microemulsões

4.7.1. Diâmetro das gotículas de PDI

O diâmetro hidrodinâmico médio e o PDI das gotículas das microemulsões selecionadas foram determinados pelo espalhamento da luz dinâmica utilizando o equipamento Zetasizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). A diluição utilizada para preparo das amostras foi produzida adicionando-se 100 µL de cada amostra preparada a 900 µL de água ultrapura e levada para análise.

4.7.2. Potencial Zeta

O potencial zeta foi analisado pela verificação da mobilidade eletroforética utilizando o equipamento Zetasizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). A diluição utilizada para preparo das amostras foi produzida adicionando-se 100 µL de cada amostra preparada a 900 µL de água ultrapura e levada para análise.

4.7.3. pH

Os valores de pH das microemulsões foram medidos pela imersão direta do eletrodo nas amostras não diluídas. O eletrodo esteve conectado a potenciômetro digital (Digimed, modelo DM-22) devidamente calibrado com soluções tampão pH 4,00 e 7,00 à temperatura de 25°C. As análises foram realizadas em triplicata para cada formulação.

4.7.4. Morfologia

A análise morfológica das microemulsões selecionadas foi feita por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando equipamento modelo JEM 1011 (JEOL, Tóquio, Japão), instalado no Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. As microemulsões foram diluídas em água (1:1000 v/v) e depositadas em grade de cobre revestida com “formvar” (Electron Microscopy Sciences, PA, EUA). Após secagem por aproximadamente 3 min em temperatura ambiente, 3 µL de solução de acetato de uranila a 0,5% (p/v) foi adicionada sob a grade e submetida a secagem por mais 3 min. Ao final desse tempo, o excesso de líquido foi removido com papel filtro (Figura 11). As imagens foram capturadas, em magnitude de aumento de até 30.000 vezes, com câmera GATAN BioSacan (modelo 820, GATAN, PA, EUA), utilizando o software Digital Micrograph 3.7.5 (GATAN, PA, EUA).

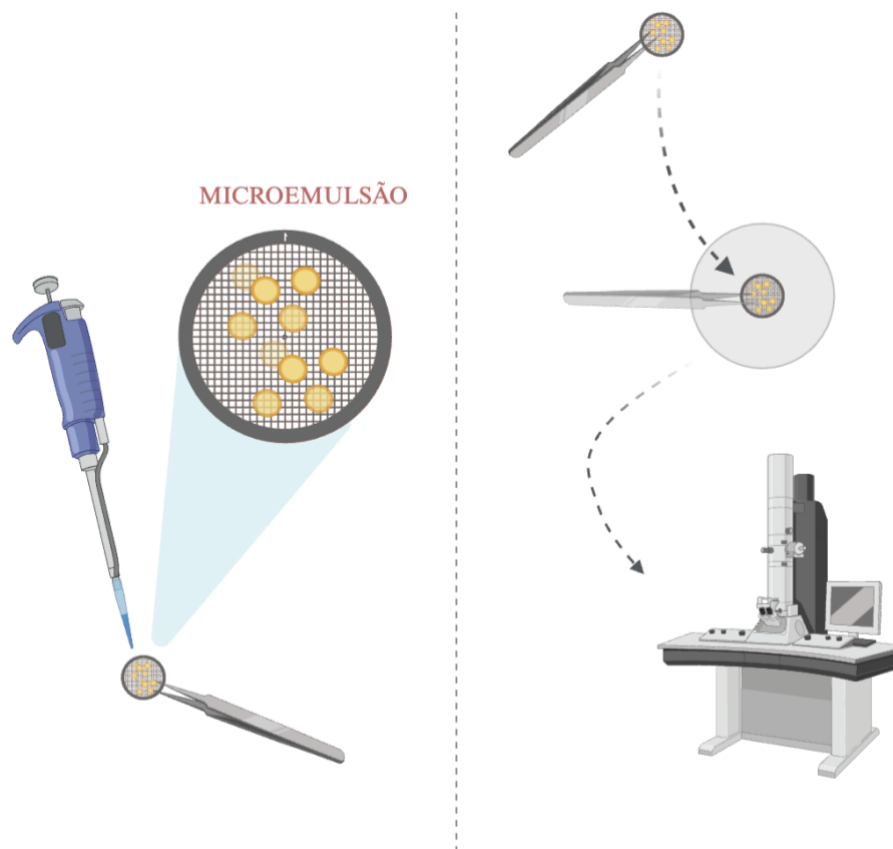


Figura 11. Representação da montagem do grid para análise no MET. Criado com BioRender.

4.8. Estudo reológico das microemulsões

A medição reológica das amostras foi realizada usando reômetro Discovery HR-2 (TA Instruments, Delaware, DE, EUA) acoplado a cone de 50 mm de diâmetro e placa de ângulo de 1 grau com espaço de 50 μm entre os dois. As medições foram realizadas em triplicata para cada microemulsão. Para a análise, as amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior do reômetro, garantindo que o cisalhamento da formulação fosse minimizado. Todos os procedimentos foram estabilizados em equilíbrio térmico por 60 s antes das análises.

4.9. Estudo de estabilidade

As microemulsões O/A enriquecidas com resveratrol foram avaliadas nas temperaturas $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (temperatura geladeira e ambiente) em relação aos parâmetros de separação de fase, ou precipitação após a centrifugação a 2150 x g por 30 min, coloração da microemulsão e viscosidade. As análises ocorreram no tempo 0, 7, 15, 30 e 60 dias.

4.10. Avaliação *in vitro* de permeação cutânea do resveratrol

Os estudos de permeação *in vitro* foram realizados em células de difusão verticais com área de difusão de 1,55 cm² acopladas ao sistema Phoenix[®]DB-6 (Teledyne Hanson Inc., Chatsworth, CA, EUA) (Figura 12 e 13). As células foram montadas com as peles de orelha suína com o estrato córneo voltado para cima. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 e o compartimento doador foi preenchido com 500 µL das microemulsões analisadas ou da formulação controle (solução de água, Tween 80 a 2,5% e resveratrol a 0,5 mg/mL). Após a aplicação das formulações, as células foram mantidas em condições de temperatura a 37±1°C, sob agitação magnética a 300 rpm por um período de 24 h. Este ensaio foi realizado em sextuplicata para cada formulação.

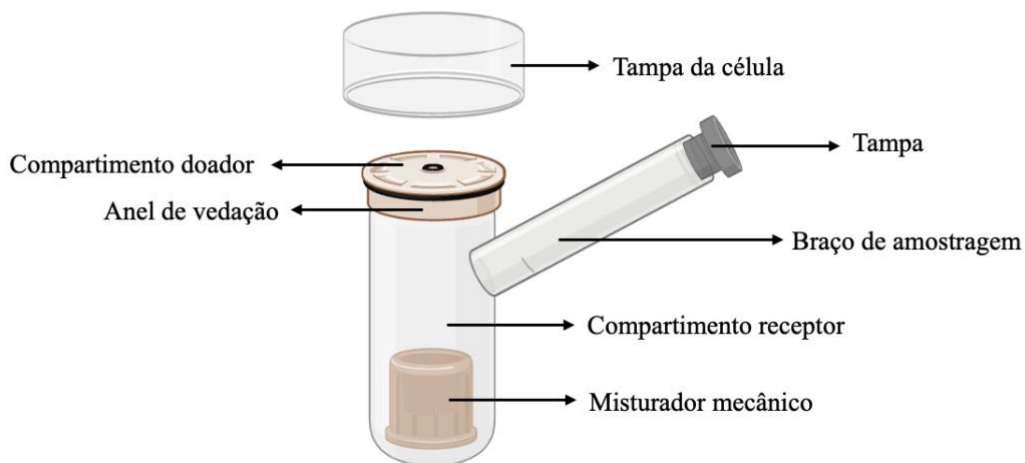


Figura 12. Representação da célula de difusão do tipo PhoenixTM. Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.



Figura 13. Representação do equipamento Hanson utilizado nas permeações cutâneas. A – Equipamento e suas células em atividade; B – Célula de difusão com a pele inserida após o tempo de ensaio; C – pele após o ensaio com as formulações.

Ao final do experimento, uma alíquota do meio receptor foi retirada e levada para quantificação por CLAE. A pele foi removida da célula de difusão e colocada em posição inclinada para retirada do excesso de formulação com aplicação de água ultrapura por um período de 10 s. Em seguida, a pele foi seca e fixada em uma superfície plana higienizada com o estrato córneo voltado para cima. Foi aplicada a técnica de *tape stripping* para separação do estrato córneo. Posteriormente, a pele foi cortada em pedaços menores com o auxílio de tesoura. As fitas adesivas contendo o estrato córneo e os fragmentos da pele remanescente foram adicionados a recipientes de vidro âmbar contendo 5 mL de metanol, que foram deixados sob agitação a 300 rpm por 24 h. As amostras foram então filtradas

em membranas de 0,45 μm e a quantidade de resveratrol recuperada da pele foi quantificada seguindo o método por CLAE, como descrito anteriormente.

Os resultados foram expressos em quantidade de resveratrol que permeou ou penetrou a pele por unidade de área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

4.11. Avaliação *in vitro* do potencial irritativo

O grau de irritação das microemulsões desenvolvidas foi avaliado utilizando o ensaio em membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados, no inglês, *Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane* (HET-CAM). Os ovos foram cedidos pela empresa Avifran (Planaltina, Brasil) no 9º dia de fertilização e os ensaios foram realizados na mesma data da coleta dos ovos.

Para o ensaio, inicialmente, ovo foi colocado em suporte adaptado, de modo que a câmara de ar ficasse voltada para cima. Com o auxílio de pinça, foi retirada cuidadosamente a casca do ovo ao redor da câmara de ar, expondo assim a área de interesse para o ensaio, que era a membrana cório-alantoide (Figura 14).

Com a membrana exposta, foram aplicados 300 μL das seguintes amostras:

- Solução salina a 0,9% (p/v), utilizada como controle negativo;
- Solução de NaOH 1 mol/L, utilizada como controle positivo;
- Microemulsões contendo resveratrol.

O tempo necessário para a ocorrência das reações foi registrado em minutos, e estão apresentados na Tabela 2. O cálculo do índice de irritabilidade foi realizado utilizando a Equação 5 (62):

$$\text{II} = \frac{(301-HE)x 5}{300} + \frac{(301-HP)x 7}{300} + \frac{(301-CO)x 9}{300} \quad \text{(Equação 5)}$$

em que: II = índice de irritabilidade; HE = tempo de ocorrência de hemorragia (s); HP = tempo de ocorrência para hiperemia (s); e CO = tempo para ocorrência de coagulação/opacidade (s).

Tabela 2. Escala para teste de HET-CAM conforme efeitos observados ao longo de 5 min.

Efeito / Tempo (min)	Escala		
	0,0 – 0,5	0,5 – 2,0	2,0 – 5,0
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

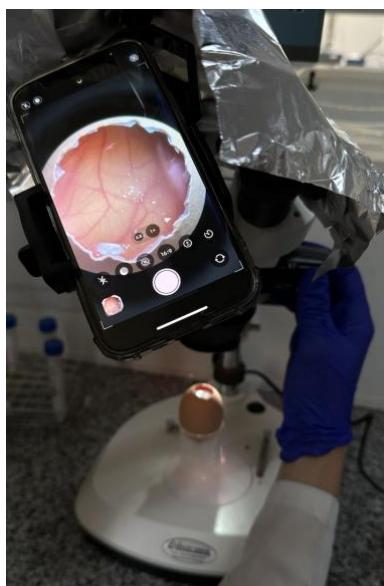


Figura 14. Representação do suporte e aparato usando microscópio e câmera de celular para registro do ensaio HET-CAM. Na figura é possível visualizar a membrana cório-alantoide do ovo exposta previamente ao início do ensaio com as formulações.

A classificação usada para avaliar quanto ao potencial irritativo das formulações no ensaio HET-CAM está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Classificação final das formulações analisadas considerando a pontuação cumulativa ao grau de irritabilidade no HET-CAM.

Índice de irritabilidade	Classificação
0 – 0,9	Não Irritante (NI)
1 – 4,9	Irritante Leve (IL)
5 – 8,9	Irritante Moderado (IM)
9 – 21, 0	Irritante Severo (IS)

4.12. Análise estatística dos dados

A construção dos cromatogramas e termogramas foi realizada com o programa *Origin Pro 8*[®]. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa *GraphPad Prisma*[®] 8.0. A análise comparativa foi realizada por ANOVA. O Teste de t-Student foi utilizado para comparar amostras dependentes e independentes. O nível de significância estatística foi aceito como $p < 0.05$. Os experimentos foram realizados em triplicata a sextuplicata e os resultados estão representados como média \pm desvio padrão da média. As equações de reta e as regressões lineares foram obtidas com a utilização do programa *Microsoft*[®] Excel 2022.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento e validação de método analítico

A avaliação do desempenho das microemulsões desenvolvidas para aplicação tópica foi feita de forma analítica. Para isso, foi necessário padronizar e validar o método capaz de identificar e quantificar adequadamente o ativo usado, separando-o dos interferentes contidos na formulação e na matriz biológica, que no caso foi a pele de suínos.

O método padronizado teve como referência estudos que usaram como fase estacionária para separação do resveratrol a coluna C₁₈ (11,40,63–67). Foram então ajustados os parâmetros de temperatura do forno, composição e volume de eluição da fase móvel, e comprimento de onda para detecção do ativo, conforme apresentado na Tabela 4. Dessa forma, os parâmetros que obtiveram os melhores picos cromatográficos referentes ao resveratrol usando o método por CLAE em um tempo de retenção de 8,6 min foram: temperatura de forno a 30°C, fase móvel composta por ácido fosfórico a 0,01mol/L e acetonitrila a uma proporção de 70:30 (v/v), vazão a 0,8 mL/min e comprimento onda de detecção do ativo a 310 nm. Ressalta-se que o método padronizado obteve os picos do ativo sem apresentar interferência das matrizes testadas (estrato córneo e pele remanescente), em corrida fixada em 15 min. O método então passou por protocolo de validação, considerando sua seletividade, linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade (limites de detecção e quantificação).

Tabela 4. Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método CLAE para quantificação do resveratrol.

COLUNA	FASE MÓVEL	PRORPOÇÃO	T (°C) FORNO	VOLUME DE INJEÇÃO	VAZÃO	RESULTADO
C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm x 5 µm)	água acidificada pH 3: ACN	40:60	25°	20 µL	0,8 mL/min	Volume morto
C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm x 5 µm)	água acidificada pH 3: ACN	50:50	25°	20 µL	0,8 mL/min	Cauda
C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm x 5 µm)	água acidificada pH 3: ACN	60:40	25°	20 µL	0,8 mL/min	Cauda
C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm x 5 µm)	água acidificada pH 3: ACN	65:35	35°	20 µL	0,8 mL/min	Cauda
C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm x 5 µm)	água acidificada pH 3: ACN	70:30	40°	20 µL	0,8 mL/min	Melhor pico, em 3 min
C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm x 5 µm)	água acidificada pH 3: ACN	70:30	30°	20 µL	0,8 mL/min	Melhor pico

5.1.1. Seletividade

A seletividade de um método analítico demonstra a capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, mesmo em meio a possíveis interferentes presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (57). Esse parâmetro foi avaliado em meio aos possíveis interferentes da camada da pele (estrato córneo e pele remanescente) contendo o resveratrol, analito de interesse. A sobreposição dos cromatogramas referentes aos interferentes em relação ao ativo está apresentada na Figura 15.

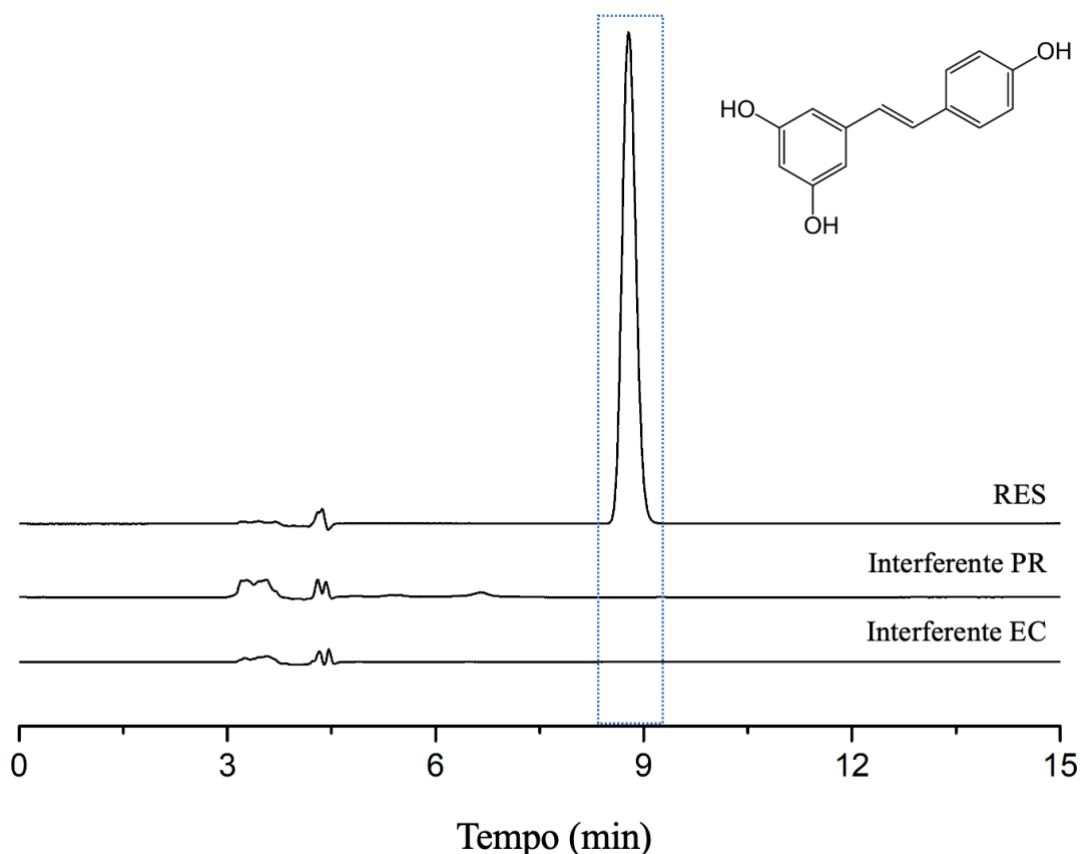


Figura 15. Sobreposição dos cromatogramas das diferentes amostras para a análise da seletividade do método analítico. RES – resveratrol; EC – estrato córneo; PR – pele remanescente. Na lateral, representação da estrutura química da molécula do resveratrol.

O resveratrol eluiu em 8,8 min, superior ao tempo necessário para eluir os contaminantes das camadas da pele. O método tem indício de ser, portanto, seletivo para a quantificação do resveratrol nos experimentos de permeação cutânea, uma vez que nenhum pico dos contaminantes eluiu próximo ao tempo de retenção do ativo de interesse na coluna cromatográfica.

Foi realizada avaliação das áreas dos picos cromatográficos do ativo em metanol, com o objetivo de identificar se os interferentes influenciariam o tempo de eluição ou área do pico do ativo. Conforme apresentado na Tabela 5, foi possível observar que o tempo de eluição de cada um dos interferentes da pele foi diferente do tempo de eluição do resveratrol. Dessa forma a área do pico do ativo não foi afetada mesmo em presença dos interferentes, estrato córneo e pele remanescente, quando analisada no comprimento de onda a 310 nm. O solvente utilizado tanto para a extração dos interferentes quanto para a solução do ativo foi o metanol.

Tabela 5. Apresentação da área do pico e seu tempo de eluição em minutos de cada componente analisado em CLAE. Resveratrol em metanol a 5 µg/mL; interferentes da pele remanescente (PR) e interferentes do estrato córneo (EC) extraídos em metanol.

Amostra	Área do pico	Tempo de eluição (min)
Resveratrol	1474613	8,8
Interferente PR	121670	4,7
Interferente EC	106659	4,4

5.1.2. Linearidade

A linearidade demonstra a capacidade do método de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (57). A curva analítica para quantificação do resveratrol está apresentada na Figura 16.

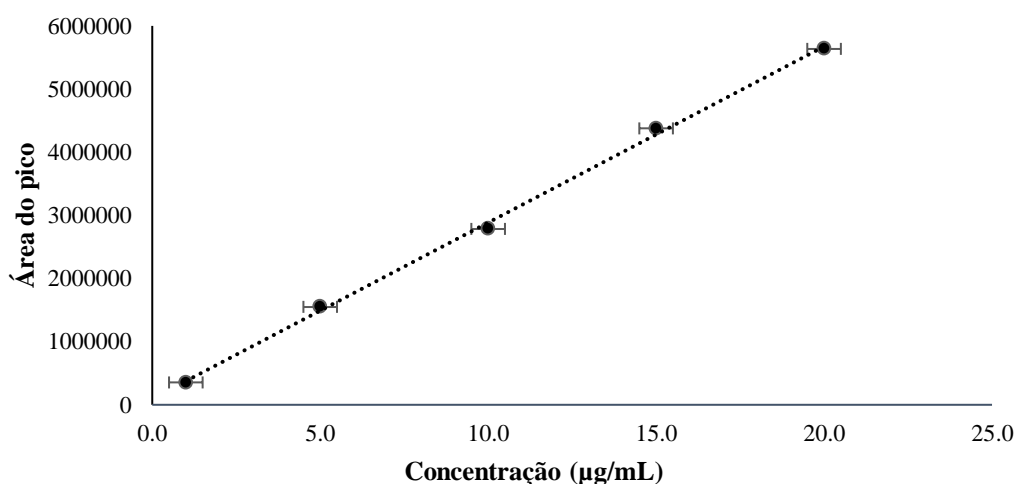


Figura 16. Representação gráfica da curva analítica, construída nas faixas de concentração de 1 a 20 µg/mL, obtida por CLAE para quantificação de RES. Equação da reta: $y = 278855x + 96305$.

O método pode ser considerado linear na faixa de concentração de 1 a 20 µg/mL, intervalo que apresentou proporcionalidade entre concentração de resveratrol e sinal analítico. O cálculo de regressão linear resultou na equação: $y = 278855x + 96305$. O coeficiente de determinação obtido para a curva padrão foi de 0,998 e o coeficiente de correlação obtido foi de 0,999, demonstrando alta probabilidade de correlação, estando de acordo com as diretrizes padronizadas tanto pela ANVISA (57) quanto pelo ICH (58).

O efeito matriz é um parâmetro que deve ser determinado durante a quantificação dos compostos e avaliado durante a validação do método analítico (57). A interferência

da matriz acontece quando substâncias inerentes, no caso as camadas da pele, eluem com os compostos de interesse, resultando em aumento ou supressão do sinal do analito (57). Dessa forma, os resultados obtidos para a investigação mostraram que os interferentes da pele não influenciaram na análise, de acordo com o gráfico da Figura 17, no qual se observa o paralelismo das retas obtidas quando as curvas foram preparadas com e sem a presença dos interferentes da pele.

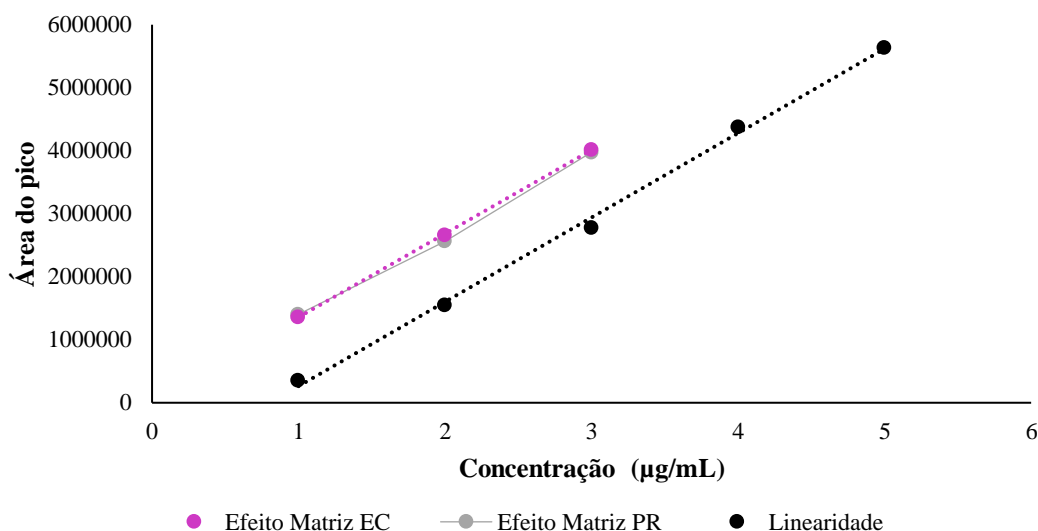


Figura 17. Representação do paralelismo apresentado pelas retas do efeito matriz e da linearidade juntos. Efeito Matriz EC - representa o efeito matriz obtido para as amostras do estrato córneo da pele do suíno; Efeito Matriz PR - representa o efeito matriz obtido para a pele remanescente. EC – Estrato córneo; PR – Pele remanescente.

A Tabela 6 apresenta os resultados referentes ao cálculo do efeito matriz na solução metanólica contaminadas com estrato córneo e pele remanescente. Os resultados indicaram que as matrizes não alteraram o sinal do RES no método analítico. E de acordo com as legislações nacional e internacional, o valor de $\pm 15\%$ de efeito matriz é aceitável para métodos bioanalíticos (57,58)).

Tabela 6. Cálculo do efeito matriz na curva do ativo na presença da solução metanólica contaminada com estrato córneo e pele remanescente

Matriz	Efeito matriz (%)
Estrato Córneo	-4,81
Pele Remanescente	-7,72

5.1.3. Precisão

A precisão de um método analítico é a avaliação da proximidade entre os resultados obtidos em análises repetidas e independentes (57,58). A precisão foi medida usando seis replicatas da solução de resveratrol a 10 µg/mL.

A repetibilidade do método foi avaliada sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica, usando a mesma concentração intermediária de 10 µg/mL (57).

Os resultados foram expressos em função do coeficiente de variação apresentados na Tabela 7. O coeficiente de variação obtido para a precisão intermediária exibiu valores abaixo de 3,6%, mesmo sob a análise de dois analistas em dias distintos. Com isso, esses valores mostram que o valor obtido para CV está dentro dos critérios de aceitação (não maior que 5%), como estabelecido pelo ICH (58).

Tabela 7. Resultados dos testes de precisão para determinação de resveratrol (RES). CV = coeficiente de variação (%).

		Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)	CV geral (%)
Precisão Intermediária				
Analista 1	Dia 1	9,88 ± 0,10	1,25	0,98
Analista 2	Dia 1	9,85 ± 0,06	0,71	
Analista 1	Dia 2	10,17 ± 0,30	3,57	3,30
Analista 2	Dia 2	9,81 ± 0,30	3,03	
Repetibilidade do método				
		9,89 ± 0,2	2,80	2,80

A repetibilidade do método foi comprovada por valores de coeficiente de variação abaixo de 2,80% (Tabela 7), demonstrando que o método foi capaz de se ajustar e quantificar mesmo com variação entre as diferentes pesagens das amostras durante o preparo. O valor encontra-se dentro dos critérios de aceitação (<5%) do ICH (58)

5.1.4. Exatidão

A exatidão do método analítico foi obtida e avaliada em termos de recuperação do ativo das matrizes biológicas, ou seja, estrato córneo e pele remanescente. Quando se

estuda um ativo, sabe-se que ele pode interagir de diferentes maneiras com os interferentes da pele. A recuperação do ativo a partir da matriz selecionada, que no caso deste estudo são estrato córneo e pele remanescente, tem a finalidade de verificar a capacidade de extração do solvente empregado (60).

Previamente à realização desse estudo, o metanol foi o solvente selecionado, com base na literatura, a ser usado para extrair o resveratrol das camadas da pele. Quanto ao método usado, optou-se pelo método sob agitação 24 h por alcançar maior extração do ativo em comparação ao método sem agitação (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados do teste método de extração do resveratrol das camadas da pele. Concentração teórica de 7,5 (µg/mL). EC – Estrato córneo; PR – pele remanescente.

Método	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração mensurada (µg/mL) EC	Concentração mensurada (µg/mL) PR
Sem agitação	7,5	6,22 ± 0,98	4,77 ± 1,12
Com Agitação	7,5	7,03 ± 0,85	7,36 ± 0,79

Na Tabela 9, a seguir, estão apresentados os valores de recuperação do resveratrol do estrato córneo e pele remanescente nos três níveis de concentração avaliados. Para o estrato córneo, o percentual de extração variou entre 88,0% e 99,5% e para a pele remanescente, entre 81,7% e 98,5%.

Tabela 9. Valores da exatidão/recuperação do RES das camadas da pele, após 24h sob agitação a 300 rpm. EC – Estrato córneo; PR – Pele remanescente; CV – Coeficiente de variação. Valores correspondem à média de 3 repetições ± desvio padrão.

Matriz Biológica	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
EC	5	4,40 ± 0,32	7,34	87,96
	10	9,66 ± 0,58	5,99	96,60
	15	14,93 ± 0,74	4,94	99,54
PR	5	4,69 ± 0,42	8,97	93,78
	10	8,17 ± 01,03	12,58	81,68
	15	14,74 ± 0,32	2,16	98,53

Assim, os resultados obtidos mostram que o método de extração conseguiu recuperar altas concentrações do ativo nas matrizes biológicas de interesse para os nossos estudos (57,60) e que o método analítico desenvolvido apresentou níveis de exatidão superiores a 81,6%, considerando as duas camadas da pele analisadas e os três níveis de concentração. Como os valores de recuperação foram inferiores a ±15%, que é o limite estabelecido pelas autoridades sanitárias no caso de métodos bioanalíticos (63,68), o método foi considerado exato.

5.1.5. Limites de detecção e quantificação

Com as curvas analíticas obtidas e apresentadas na Figura 16, calculou-se o valor do desvio padrão dos coeficientes lineares de cada uma das replicatas da curva e a média dos respectivos coeficientes angulares, de modo que se pôde calcular o LD e LQ do método de análise do resveratrol. O LD e LQ teóricos foram iguais a 0,07 µg/mL e 0,21 µg/mL, respectivamente: representam as menores concentrações do ativo que pode ser detectada pelo método analítico e quantificada com precisão e exatidão.

Já o teste experimental (Tabela 10) demonstrou que o LQ para análise do resveratrol foi igual a 0,3 µg/mL, pois foi a menor concentração do ativo que se conseguiu analisar com valores de precisão e exatidão aceitáveis para o método analítico. Esse valor foi condizente ao calculado anteriormente, demonstrando a elevada sensibilidade do método cromatográfico desenvolvido para determinação do resveratrol nas camadas da pele.

Tabela 10. Demonstração experimental do limite de quantificação do método cromatográfico. Valores correspondem à média de 3 repetições ± desvio padrão.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
0,02	0,020 ± 0,002	9,6	119,84
0,05	0,050 ± 0,022	5,0	99,83
0,08	0,080 ± 0,004	5,9	103,62
0,10	0,110 ± 0,002	1,5	109,20
0,20	0,180 ± 0,001	0,6	90,55
0,30	0,300 ± 0,008	2,7	99,40
0,40	0,390 ± 0,005	1,3	98,16
0,50	0,510 ± 0,007	1,5	102,41

5.2. Solubilidade

A solubilidade de um fármaco é parâmetro físico-químico essencial para a realização de ensaios *in vitro* que envolvam a difusão, como ensaios de permeação cutânea. Além disso, afeta diretamente sua biodisponibilidade, seja oral ou tópica (20).

No caso dos ensaios de permeação cutânea *in vitro*, é importante assegurar a ocorrência em condições *sink*. A condição *sink* estabelece que a concentração da substância na solução receptora desses ensaios não deve ultrapassar 10% da sua

solubilidade no meio. Essa condição deve ser mantida durante todo o ensaio a fim de garantir a livre difusão da substância de interesse sem a saturação do meio receptor (69).

Assim, a solubilidade do resveratrol foi determinada nos meios descritos abaixo com o objetivo de selecionar tanto o meio para preparo da solução controle, usada para fins de comparação durante os ensaios de penetração, e do meio receptor para garantir as condições *sink* para o estudo. Os resultados desses ensaios estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Solubilidade do resveratrol em meios propostos para os ensaios de permeação cutânea. Todas as soluções foram diluídas em metanol (1:1000 v/v) para análise em CLAE. Os dados são compostos por médias de 3 repetições \pm desvio padrão.

Meio	Solubilidade (mg/mL)
Água	0,48 \pm 0,09
Água:Tween 80 1%	1,02 \pm 0,07
Água:Tween 80 2,5%	2,26 \pm 0,12
Água:Tween 80 5%	2,18 \pm 0,01
Óleo de Semente de uva	0,95 \pm 0,21
Span 80	1,56 \pm 0,09
Tampão fosfato pH 7,4	0,56 \pm 0,10
Tween 80	1,67 \pm 0,15

A solubilidade do resveratrol aumentou substancialmente conforme adicionou-se Tween 80 à água, sendo selecionado para ser aplicado como solução controle durante os ensaios de penetração usando pele de porco. Para os resultados de solubilidade, previa-se que a maior concentração de Tween80 adicionado á água fosse capaz de solubilizar o meio com resveratrol, entretanto, a concentração de 2,5% de Tween 80 em meio aquoso foi capaz que solubilizar melhor quando comparado a concentração de 5%. A possível explicação para o acontecido está a na saturação do meio, em que o Tween 80 foi capaz de solubilizar melhor o meio saturado do resveratrol. Entretanto, não houve diferença significativa entre as concentrações 2,5% e 5% de Tween 80, utilizou-se a menor concentração para os experimentos seguintes (2,5%).

5.3. Estudos de compatibilidade

A análise térmica utiliza-se de conjunto de técnicas que têm o objetivo de estudar as propriedades físicas e químicas de uma substância enquanto a temperatura da amostra é submetida a alteração controlada (12,27). As análises realizadas por DSC demonstram o grau de cristalinidade com relação à entalpia de fusão da amostra sólida analisada. Com isso, a partir das mudanças no ponto de fusão de um fármaco na presença de excipientes é possível prever a compatibilidade físico-química entre o fármaco em questão e os demais componentes da formulação (70).

As análises por TGA fornecem informações com relação às variações de massa em função do tempo e/ou temperatura e as curvas obtidas fornecem dados sobre a composição e estabilidade térmica da amostra, dos seus produtos intermediários e possível resíduo formado (12).

Desta forma, as técnicas de DSC e TG quando associadas, fornecem dados úteis na compreensão dos processos físico-químicos relativos à decomposição térmica, determinação da estabilidade e polimorfismo das amostras. Para este estudo, o resveratrol e os componentes selecionados para preparo das microemulsões foram avaliados separadamente e após mistura física ativo/excipiente.

Na Figura 18 estão representadas a primeira derivada de TG (DrTGA), que permite a demarcação das etapas de perda de massa e fornece informações sobre o nível de interação do resveratrol e os excipientes da formulação.

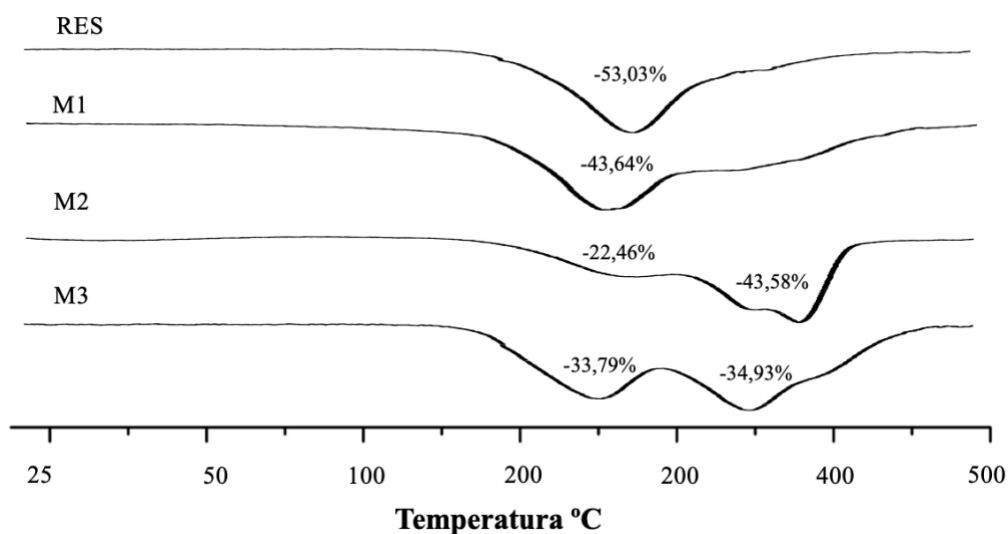


Figura 18. Primeira derivada de TGA do resveratrol (RES) isolado e das misturas com excipientes da formulação. Cada evento de perda de massa está indicado na figura como porcentagem (%).

O resveratrol sofre processo de decomposição de 53% entre 298,17 e 352,12°C. Estudo anterior descreveu que o resveratrol foi termicamente estável até 240°C, tendo apresentado pico endotérmico acentuado a 267°C (12), divergindo pouco dos resultados obtidos nessa análise, em que o resveratrol foi estável termicamente até 298°C e gerou pico endotérmico a 324°C. A divergência apresentada pode estar relacionada com o tipo de padrão do ativo utilizado nas análises, como também aos métodos de operação durante a análise.

Para M1 (mistura de resveratrol com Span 80), foi possível observar antecipação do processo de decomposição, porém a perda de massa foi menor (aproximadamente 10%), sugerindo interação entre o ativo e o excipiente. Em M2 e M3, observou-se duas etapas no processo de perda de massa, iniciando-se em 175°C e com perda de massa inferiores à correspondente da mistura. A decomposição de cada excipiente da formulação está indicada na Tabela 12.

Tabela 12. Faixa de decomposição e perda de massa em porcentagem dos excipientes da formulação.

Composto	Perda de massa (%)	Faixa/(°C)
Óleo de Semente de Uva	97,00	383 – 444
Tween 80	91,97	376 – 421
Span 80	95,31	341 – 420

As misturas do ativo com cada excipiente demonstraram uma interação entre eles, mas nenhum excipiente comprometeu a estabilidade térmica do resveratrol, uma vez que, apesar de haver em todos os casos analisados antecipação do processo de decomposição pela temperatura, a perda de massa foi inferior se comparada às análises das substâncias isoladas.

Nos ensaios de DSC foi possível observar que o resveratrol apresentou pico endotérmico a 260°C (Figura 19), temperatura correspondente ao demonstrado na literatura (12). Para as misturas (M1-M4) o resveratrol foi parcialmente dissolvido nos excipientes. A fusão detectada no DSC apresenta a porção cristalina do ativo; dessa forma, a diminuição da entalpia no pico de fusão é considerada como aumento da amorfa do ativo, indicando que o ativo se dispersou no meio (12).

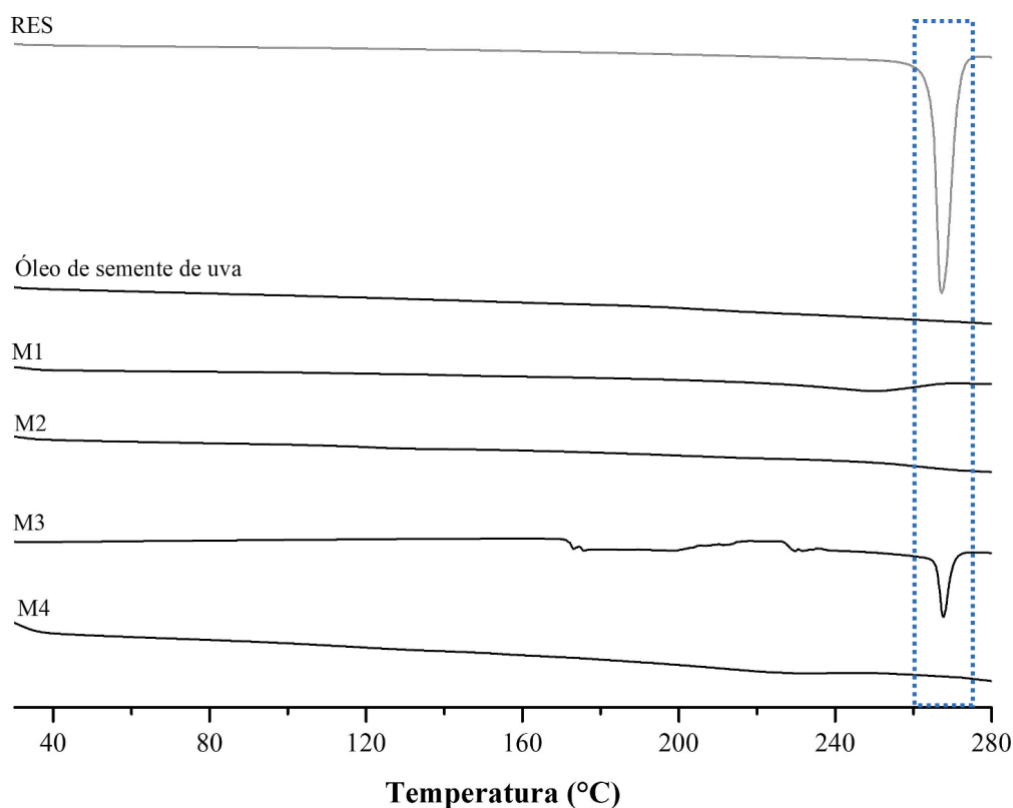


Figura 19. Análise das curvas de DSC do RES, do óleo de semente de uva e das misturas físicas. O pico de fusão do ativo foi sombreado. RES – resveratrol.

Na Figura 18, observou-se redução do pico da entalpia da fusão das misturas com o resveratrol, permitindo inferir que os excipientes diminuíram a porção cristalina do ativo. De fato, nas misturas M1, M2 e M4 é possível notar que os excipientes foram capazes de dispersar completamente o ativo, sugerindo a forma amorfa do ativo; que por

sua vez está relacionada com o aumento da solubilidade do resveratrol entre os excipientes. Dessa forma, os ensaios de análise térmica indicam que nenhum dos excipientes têm interação com o ativo que indique a ocorrência de incompatibilidade, permitindo que sejam utilizados no desenvolvimento das microemulsões.

5.4. Obtenção das microemulsões

A seleção dos excipientes para preparo das microemulsões avaliou quais as exigências para o desenvolvimento de formulação tópica voltada para o tratamento de doença dermatológica provocada por uma cascata de inflamação. Microemulsões com altas concentrações de tensoativos podem facilitar a absorção cutânea, porém esses componentes podem causar irritação na pele, prejudicando o quadro do paciente ((6). Com isso, a definição dos excipientes, principalmente tensoativo e cotensoativo, deve ser cautelosa. Assim, foram escolhidos o Tween 80 e o Span 80 como tensoativos para a nanoformulação.

O Tween 80 (monoleato de sorbitano polioxietileno 80, EHL: 15,0) (22) é um tensoativo não-iônico, de característica predominantemente hidrofílica, amplamente usado em produtos cosméticos e farmacêuticos, devido à baixa probabilidade de causar irritação cutânea (71,72). O Span 80 (Monoleato de sorbitano 80, EHL: 4,3), foi usado como cotensoativo, apresentando também aspectos não-iônico e de baixo potencial irritante para a pele (22).

O uso de um cotensoativo é aconselhável no preparo de micro e nanoemulsões, pois auxilia na redução da tensão interfacial entre as fases, o que facilita o processo de dispersão (22,73), assim como tende a melhorar as características de estabilidade (22,72,73). Dessa forma, para combinação entre as quantidades de Tween 80 e Span 80 foi calculado o valor EHL de ambos com o objetivo de se determinar a quantidade a ser utilizada de cada tensoativo. O EHL da formulação usando Tween 80 e Span 80 deu o equivalente a 11,43, corroborando para a obtenção de uma formulação óleo em água (20).

O óleo de semente de uva foi escolhido como veículo da fase oleosa por apresentar inúmeros benefícios, como a atividade anti-inflamatória, além de já conter em sua composição certa concentração de resveratrol (16). É rico em composto fenólicos, ácidos graxos e vitaminas, por isso tem sido bastante empregado na área de cosméticos (17,65,73,74).

A formulação foi enriquecida com resveratrol após a determinação da quantidade de ativo presente no óleo de semente de uva usando o método CLAE. A dosagem de resveratrol no óleo deu em um valor abaixo do esperado, encontrando-se inferior ao limite de quantificação teórico.

O diagrama de fases pseudoternário foi preparado utilizando como tensoativo e cotensoativo, respectivamente, o Tween 80 e o Span 80 na proporção 2:1 (p/p). A construção do diagrama permitiu identificar regiões de formação de vários tipos de sistemas, incluindo a área de formação de microemulsões (Figura 19) (22,73,75).

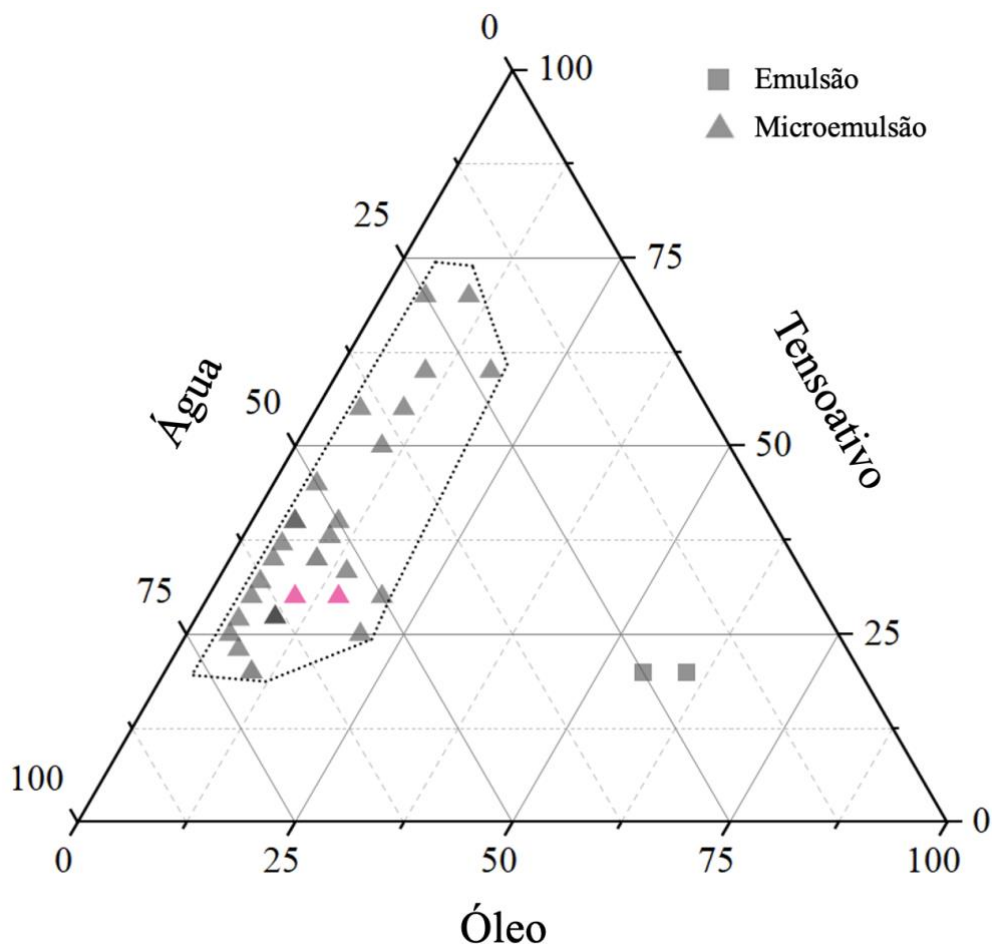


Figura 20. Representação do diagrama de fase pseudoternário mostrando as regiões de formação das microemulsões. Em rosa estão indicadas as regiões escolhidas para a continuidade dos ensaios. O diagrama foi composto por Tween 80 e Span 80 na proporção 2:1 (p/p) como tensoativos, óleo de semente de uva como fase oleosa e água ultrapura como fase aquosa.

As microemulsões do tipo O/A foram formadas quando a fração do tensoativo estava em maior proporção, e a de fase oleosa, menor. Durante os ensaios de desenvolvimento, quando a fase oleosa estava em maior proporção em comparação à

quantidade de tensoativo, foi possível observar que as formulações ficaram turvas ou apresentaram separação de fases (Figura 21C). Por outro lado, quando a fase aquosa e o tensoativo estavam em concentrações semelhantes entre si, observou-se a obtenção de formulações do tipo emulsão. O aspecto físico das microemulsões selecionadas pode ser visualizado na Figura 21.

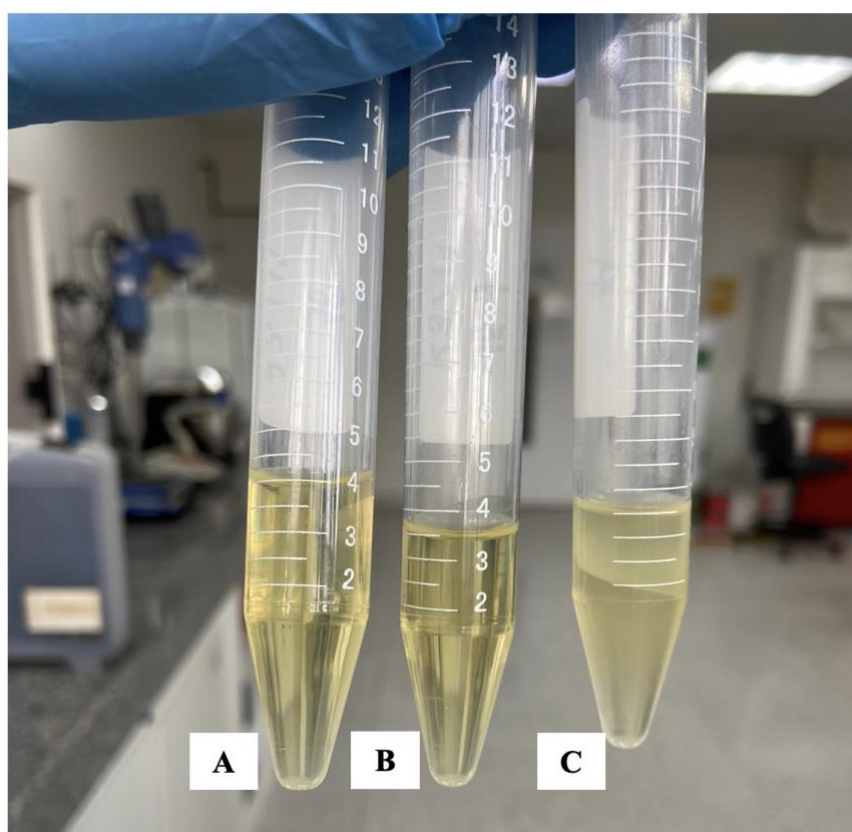


Figura 21. Microemulsões selecionadas desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos Alimentos e Cosméticos – LTMAC da Universidade de Brasília, em que é possível observar uma das consequências da variação dos excipientes através da construção do diagrama de fases. A e B estáveis após 20 min de centrifugação; C apresentando uma separação de fases após 20 min de centrifugação.

A seleção de duas microemulsões para estudo a partir do diagrama de fases foi feita com base em sua composição de tensoativo, selecionando as que apresentaram menor concentração, pensando em reduzir ao máximo a possibilidade de ocorrência de efeito irritante para a pele. Também foi levada em consideração a viscosidade apresentada, optando-se por sistemas de baixa viscosidade, além de pH adequado para a pele; sua composição está apresentada na Tabela 13.

Tabela 13. Composição das microemulsões selecionadas.

Microemulsão	Fase oleosa (%)	Tensoativos (%)	Fase aquosa (%)
ME 1	15	35	50
ME 2	10	30	60

5.5 Caracterização das microemulsões

Formulações classificadas como microemulsão devem atender a alguns requisitos, como tamanho de gotícula adequado, e ser desenvolvidas de acordo com a via de administração em que se deseja administrá-las (22). Assim, as microemulsões, ME 1 e ME 2, foram caracterizadas quanto aos seguintes parâmetros: tamanho das gotículas, PDI, potencial zeta, pH e morfologia.

O diâmetro das gotículas de uma microemulsão é importante para garantir a sua estabilidade, relacionada ao prazo de validade do medicamento que poderá se tornar. Além disso, esse parâmetro está relacionado com o potencial que o sistema tem em aumentar a penetração cutânea do ativo incorporado, conseqüentemente ampliando a biodisponibilidade tópica da formulação, garantindo efeito terapêutico adequado (14,53).

Na Tabela 14 estão apresentados dados de diâmetro médio de gotículas, PDI, potencial zeta e pH das microemulsões ME 1 e ME 2 sem e com ativo.

Tabela 14. Caracterização das microemulsões ME 1 sem ativo, ME 2 sem ativo, ME 1 e ME 2 quanto ao diâmetro médio de gotículas (nm), PDI, potencial zeta (mV) e pH. PDI – Índice de polidispersão; pH – potencial hidrogênico. Valores correspondem à média de 3 repetições \pm desvio padrão da média.

Amostra	Diâmetro da gotícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	pH
ME 1 s/ ativo	23,1 \pm 0,7	0,34 \pm 0,20	-11,7 \pm 0,5	6,2 \pm 0,5
ME 1 c/ ativo	22,3 \pm 1,4	0,40 \pm 0,01	-10,2 \pm 0,7	6,3 \pm 0,1
ME 2 s/ ativo	24,9 \pm 1,7	0,47 \pm 0,50	-13,6 \pm 0,9	7,1 \pm 1,1
ME 2 c/ ativo	24,2 \pm 0,8	0,72 \pm 0,30	-14,6 \pm 0,1	6,8 \pm 0,8

As microemulsões formadas, apresentaram aspecto transparente, com valores de diâmetro de gotícula baixos, inferiores a 25 nm, o que garante as propriedades coloidais do sistema, principalmente relacionadas à estabilidade, reduzindo a possibilidade da ocorrência de processos de instabilização, como coalescência ou separação de fases, além

de proporcionar o aumento da penetração do ativo e conseqüentemente sua biodisponibilidade (22). O tamanho pequeno de gotícula já era esperado, devido à presença das moléculas de cotensoativo juntas ao tensoativo, que permitem a redução da tensão interfacial, diminuindo o raio de curvatura das microemulsões (75).

O PDI, que indica a distribuição do diâmetro das gotículas da microemulsão em torno do valor médio, indica certa homogeneidade de tamanho para a ME 1, mas maior variação para a ME 2 (22). Esses valores relativamente altos de PDI podem ser explicados pela dificuldade da técnica, já que altas diluições das amostras requeridas pelo equipamento normalmente alteram as propriedades da nanoformulação (66). Entretanto, os ensaios com microscopia eletrônica de transmissão que serão apresentados a seguir poderão auxiliar na visualização da homogeneidade das gotículas formadas, a partir do diâmetro das esferas formadas.

O potencial zeta é resultado da densidade de carga em torno das gotículas e fornece informações sobre o grau de repulsão entre elas. Dessa forma, quanto maior o potencial, de grandeza negativa ou positiva, maior deve ser a estabilidade da nanodispersão (76). No caso das microemulsões ME 1 e ME2, os valores estão em torno de 10-15 mV, considerado próximo à neutralidade. Essa característica se deve ao fato dos tensoativos utilizados para preparo serem de natureza não-iônica (22).

O estudo do pH de uma formulação é extremamente importante devido às implicações que a administração de sistemas com pHs extremos pode gerar durante a aplicação, podendo refletir na perda da integridade cutânea (77). O pH de uma pele considerada saudável tem o seu valor em torno de 4,6 e 5,8, sendo que um pH levemente ácido auxilia o processo de proteção da pele contra fungos e bactérias (56). Assim, as microemulsões apresentaram valor de pH apropriado para a aplicação tópica, estando entre $6,3 \pm 0,1$ e $6,8 \pm 0,8$ (Tabela 13). Vale ressaltar que o enriquecimento das formulações com o ativo não provocou alterações significativas no valor do pH.

A avaliação morfológica das microemulsões foi realizada a partir da análise das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, que estão apresentadas na Figura 21 (18,6–71).

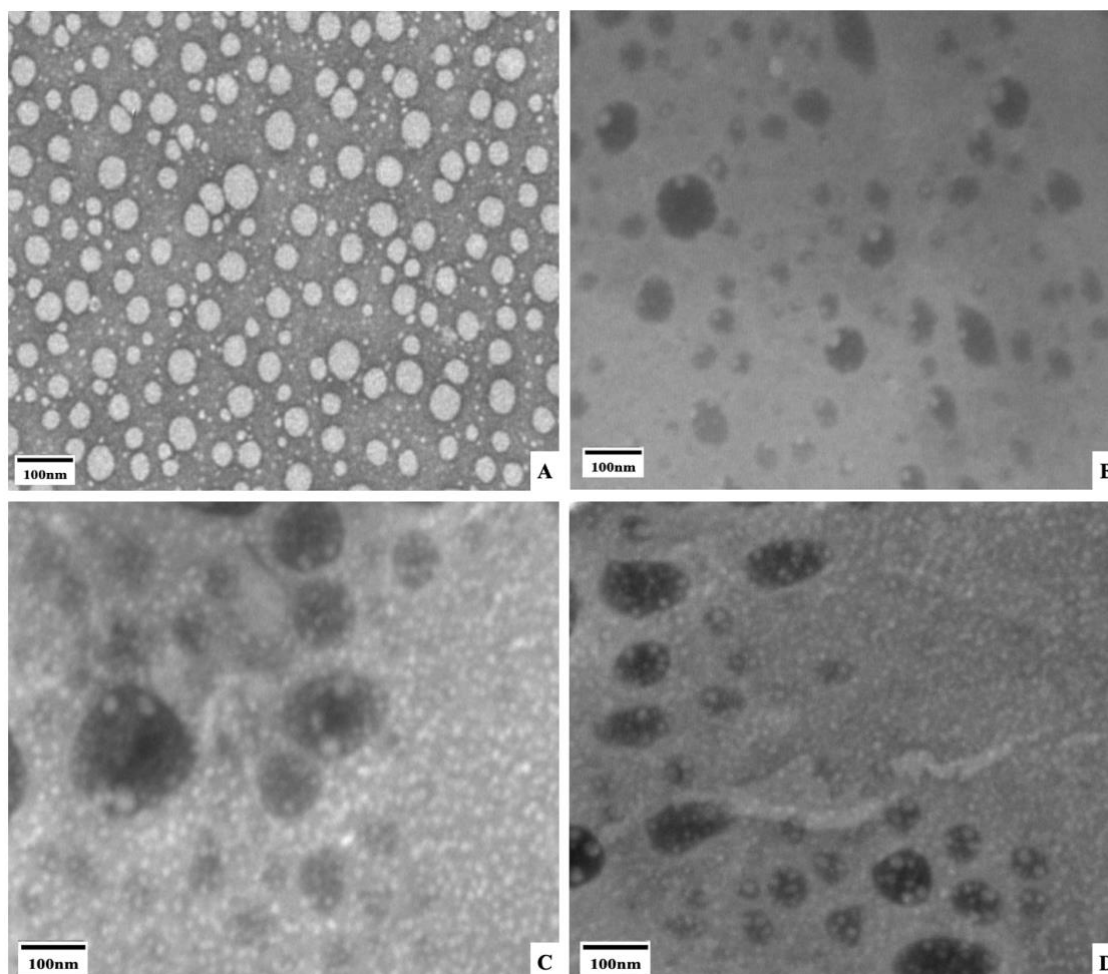


Figura 22. Imagens obtidas por MET para as formulações: ME 1 e ME 2. MET – Microscopia eletrônica de transmissão; ME – Microemulsão. A – ME com RES 1; B – ME 2 com RES; C – ME 1 sem RES; D – ME 2 sem RES.

As gotículas das microemulsões apresentaram formato esférico, conforme descrito na literatura (22,56,78,79), com discretas alterações no tamanho. A medição por meio das imagens foi feita, e obteve-se tamanho de $22,16 \pm 0,72$ nm para as microemulsões com ativo, próximo ao verificado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico. As imagens também foram capazes de revelar mais nitidamente a homogeneidade entre os tamanhos das gotículas, maior na microemulsão ME 1 do que na ME 2, também em compasso com os resultados obtidos pela outra técnica.

Em relação às microemulsões enriquecidas com ativo e às sem ativo, foi possível observar pouca diferença entre os parâmetros apresentados e esse resultado, o que pode ser explicado pela dispersão do resveratrol, pois teve a sua quantidade a ser usada nas formulações estudadas previamente, na fase oleosa do sistema; na qual esteve completamente solubilizado no meio.

5.6. Estudo reológico da microemulsão

O estudo das características de fluxo é um parâmetro importante a ser avaliado para formulações destinadas à aplicação tópica, uma vez os resultados podem indicar a sua influência sobre precisão da dosagem, conforto na aplicação, espalhamento e o tempo de residência sobre a pele após a aplicação (80,81). É necessário que a viscosidade garanta uma aplicação fácil e confortável, porque sendo muito baixa, como água, a formulação pode escorrer da pele instantaneamente, não permitindo que haja tempo para a penetração do ativo na camada de interesse. No entanto, se a apresentar uma alta viscosidade a aplicação poderá ser dificultada (14,20,22,82).

As microemulsões foram classificadas como fluido *newtoniano*, pois não foram observadas alterações de sua viscosidade frente às mudanças das tensões de cisalhamento aplicadas, como mostra a Figura 22. Normalmente, microemulsões exibem comportamento de fluido *newtoniano* por exibirem baixa viscosidade (83), entretanto o comportamento pseudoplástico se mostra apropriado para formulações de aplicação tópica, em que reflete maior facilidade de aplicação: se tornam mais fluidos quando submetidos a pressão externa, espalhando-se mais facilmente na região e recuperando sua viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação, impedindo que o produto escorra durante o procedimento (82,84). Frente aos resultados obtidos para a classificação do tipo de fluido das microemulsões, o fluido newtoniano ainda sim garantiria facilidade durante a aplicação.

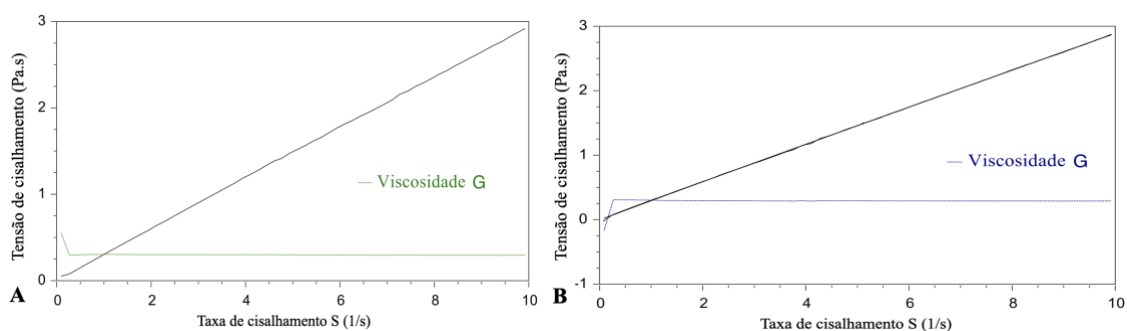


Figura 23. Gráfico referente a tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento. A – Gráfico para ME 1; B – Gráfico para ME 2.

Os dados apresentados na Tabela 15, a seguir, mostram semelhança estatística entre os valores de viscosidade para as microemulsões ME 1 para a ME 2 graças às alterações sutis na proporção de componentes dos sistemas (14,20).

Tabela 15. Resultado das viscosidades das formulações ME 1 e ME 2, na temperatura de 25°C. Valores correspondem à média de 3 repetições ± desvio padrão.

Amostra	Viscosidade (Pa.s) a 25°C
ME 1	0,39 ± 0,05
ME 2	0,33 ± 0,40

5.7. Estudo de estabilidade

A estabilidade das MEs nas temperaturas de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (temperatura geladeira e ambiente) foi favorável à manutenção das características iniciais. As formulações foram acondicionadas protegidas da luz. Não foram observadas alterações quanto à separação de fases ou precipitação, mesmo após a centrifugação das amostras. Em adição às características analisadas para a estabilidade, foi avaliada a viscosidade e a coloração, que também se mantiveram estáveis. A observação foi feita por um período de 60 dias.

5.8. Avaliação *in vitro* de permeação cutânea do resveratrol

Formulações que são administradas pela via tópica dermatológica enfrentam uma primeira barreira para a sua penetração, que é o estrato córneo. Essa barreira possui características mais lipofílicas que hidrofílicas – logo, a permeação de um ativo dependerá de características como coeficiente de partição adequado, além de uma massa molecular pequena o suficiente para garantir a sua rápida difusão pelas camadas da pele (20)24,34).

Os estudos *in vitro* de permeação cutânea das microemulsões de óleo de semente de uva enriquecido com resveratrol foi realizado em pele de orelha de suínos. A pele foi tratada com as formulações e controle por um período de 24 h. Os resultados estão apresentados na Figura 23.

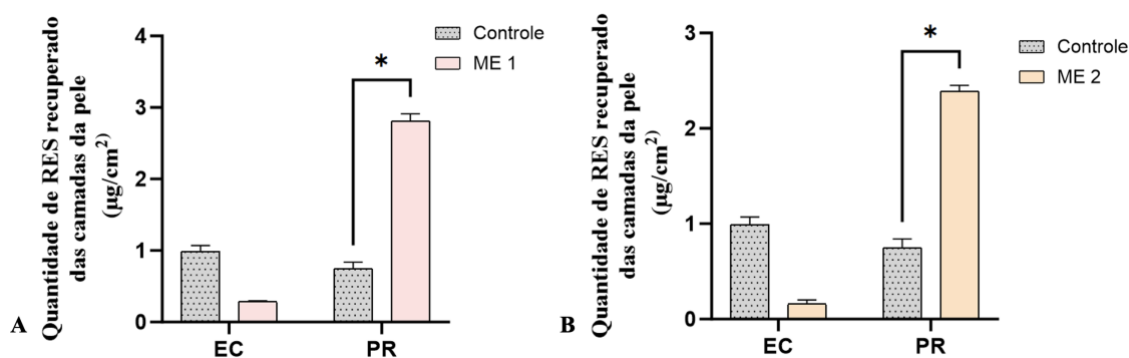


Figura 24. Quantidade de RES recuperado das camadas da pele em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. EC - Estrato Córneo; PR - Pele remanescente; RES - Resveratrol. Análise estatística por ANOVA ($*p < 0,0001$).

Verificou-se na Figura 23A, que a solução controle contendo o resveratrol teve porcentagem de ativo quantificada no estrato córneo superior (3,5 vezes) quando comparada à ME 1. Em contrapartida, a quantidade de ativo quantificada nas camadas mais profundas da pele (pele remanescente) foi 4 vezes maior se comparada à solução controle na mesma área. Para a ME 2 (Figura 23B), a quantidade de ativo no estrato córneo também foi inferior (6 vezes) em comparação à solução controle, mostrando aumento significativo na pele remanescente em relação ao controle.

Considerando que o objetivo principal do desenvolvimento das microemulsões foi garantir que quantidades significativas de ativo atingissem as camadas mais profundas da pele, os resultados obtidos aqui foram muito animadores.

Evidentemente, as microemulsões tiveram efeito promotor bastante pronunciado para a penetração do resveratrol. Resultado esse que pode ser atribuído às características da microemulsão e de seus excipientes, como por exemplo o Tween 80, que tem ação promotora na formulação. A organização do tensoativo juntamente com cotensoativo revestindo a gotícula da microemulsão proporciona maior área superficial de contato com a camada lipofílica, permitindo interação mais eficiente das moléculas com a pele, favorecendo o efeito promotor na formulação (85,86). A combinação do tensoativo com o cotensoativo nas proporções adequadas proporcionou a baixa da tensão superficial quando em contato com a pele, favorecendo a penetração (73). Outro fator importante que deve ser levado em consideração é o tamanho da gotícula, que proporcionou maior direcionamento através da difusão entre as camadas da pele. A proporção de óleo nas microemulsões também causou uma diferença entre os perfis de penetração em que a ME 1 (15%), que possuía maior concentração de óleo comparada a ME 2 (10%), promoveu maior permeação do ativo. Isso pode ser atribuído, portanto, à característica do óleo, que aumenta a hidratação da pele pelo mecanismo de emoliência, auxiliando no processo de difusão do ativo através da pele.

5.9. Avaliação *in vitro* do potencial irritativo

O método HET-CAM foi inicialmente descrito por Luepke (1985) e é uma alternativa aos testes em animais (teste de Draize) para a avaliação da irritabilidade de formulações ((62,87). Consiste na aplicação direta de amostras na membrana córneo-

alantoide de ovos fecundados e após o tempo estipulado são realizadas avaliações das principais reações resultados pela aplicação. O método descrito em 1985, inicialmente era empregado para avaliação do potencial irritativo de formulações oculares, porém devido à alta eficiência em avaliar a irritabilidade de formulações e substâncias no geral é possível usá-lo para avaliar a irritação cutânea (62,88).

Os resultados da caracterização do potencial irritativo das microemulsões em comparação aos controles positivo e negativo estão apresentados na Figura 24.

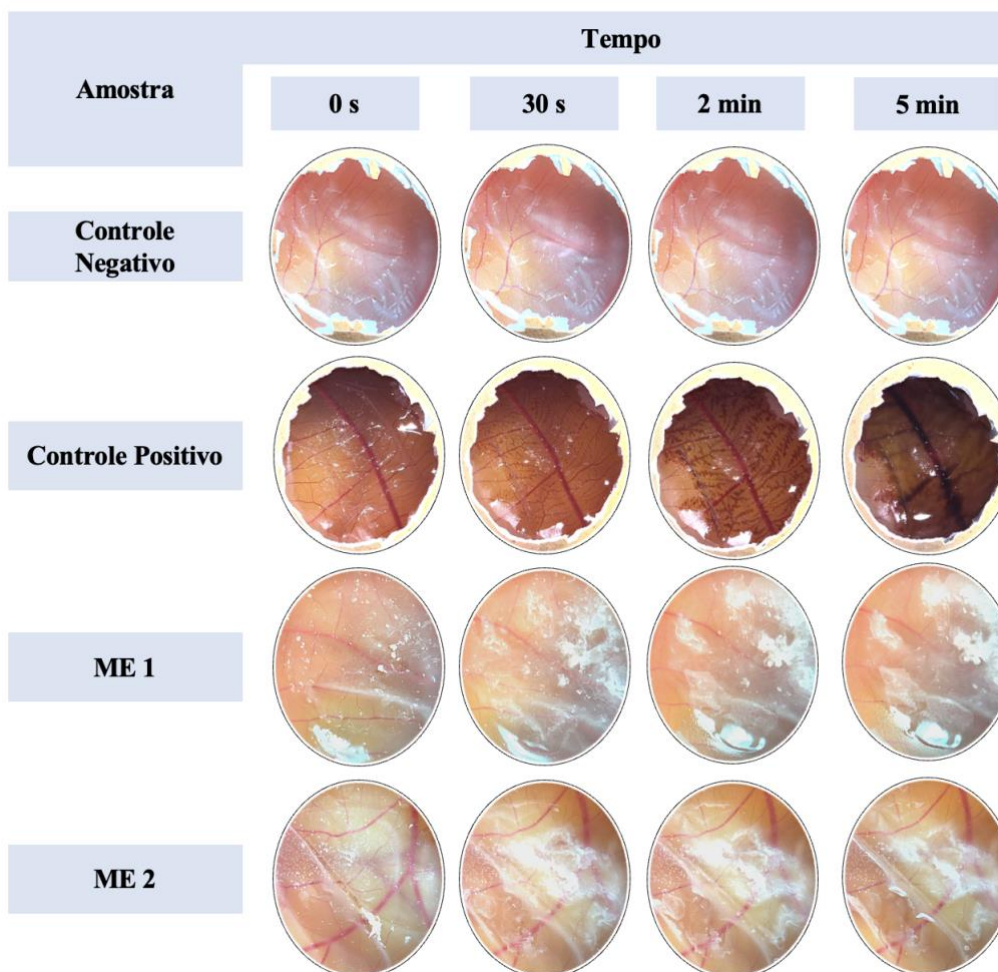


Figura 25. Sequência ilustrativa das imagens do ensaio de HET-CAM demonstrando o efeito do controle negativo (NaCl 0,9%), controle positivo (NaOH 1 mol/L), ME 1 e ME 2 na membrana cório-alantoide nos tempos 0 s, 30 s, 2 min e 5 min.

As imagens foram capturadas antes da exposição e durante 30 s, 2 min e 5 min após a exposição da membrana cório-alantoide às amostras testadas. Como é possível verificar, o controle negativo não levou à ocorrência de nenhum fenômeno desde os primeiros segundos do teste até o seu encerramento. Em contraposição, o controle positivo

proporcionou a ocorrência de diversas alterações vasculares na membrana logo nos primeiros segundos de teste, com o aumento da vascularização e calibre dos vasos, além de alteração da coloração, associada ao rompimento dos vasos e extravasamento de sangue.

Na sequência ilustrativa da Figura 24 é possível observar que as amostras da ME 1 e ME 2, ambas enriquecidas com resveratrol, apresentaram efeito semelhante ao desempenhado pelo controle negativo.

A Tabela 16, a seguir, apresenta os resultados da classificação final relacionados aos índices de irritabilidades calculados. Foram expressos com a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para os três ovos analisados em cada formulação.

Tabela 16. Classificação da irritabilidade das formulações testadas de acordo com a escala acumulativa. Valores correspondem à média de 3 repetições \pm desvio padrão.

Amostra	Índice de irritabilidade	Classificação
Controle Negativo	0,05 \pm 0,04	Não Irritante (NI)
Controle Positivo	16,34 \pm 0,82	Irritante Severo (IS)
ME 1	0,06 \pm 0,01	Não Irritante (NI)
ME 2	0,08 \pm 0,02	Não Irritante (NI)

Passados os 5 min de observação da membrana cório-alantoide, o índice de irritabilidade foi de 0,05 \pm 0,04 para o controle negativo, recebendo a classificação de “Não Irritante (NI)” e 16,34 \pm 0,82 para o controle positivo, sendo classificado como “Irritante Severo (IS)”. O resultado final para as microemulsões ME 1 e ME 2 foram 0,06 \pm 0,01 e 0,08 \pm 0,02, respectivamente.

Dessa forma, seguindo as classificações dos controles realizados, que servem de base para uma interpretação das microemulsões desenvolvidas, os resultados sugerem a classificação de “Não Irritante (NI)” para ambas as microemulsões, ME 1 e ME 2, sendo compatíveis para a aplicação tópica. O potencial irritativo de uma formulação depende da concentração de seus componentes, principalmente da proporção de tensoativo-cotensoativo, e do pH (22). Ressalta-se que nesse estudo o pH das microemulsões se mantiveram adequados para as condições da pele, levando em consideração a aplicação tópica; enquanto a proporção utilizada de Tween 80 e Span 80 não demonstraram potencial irritativo durante o teste, como já mencionado, e garantiram a estabilidade da formulação.

Os resultados obtidos são semelhantes a outros já descritos na literatura para outras microemulsões e para outras formulações contendo o resveratrol. Vibhute e seus colaboradores (2015) desenvolveram microemulsão para uso tópico contendo Tween 80 e Span 80, mesmo componentes usados nesse estudo, e realizaram avaliação do potencial irritativo, tendo como resultado “Não Irritante (NI)” (89). O potencial irritativo de tensoativo já é esperado e descrito na literatura, entretanto, dependendo das proporções usadas, não há desenvolvimento de irritação nos testes (85,90). Como foi o caso desse estudo, usando a associação de Tween 80 e Span 80, juntamente com óleo de semente de uva. Khatoon e seus colaboradores (2021) avaliaram o potencial irritativo do resveratrol no teste usando HET-CAM e o resultado obtido foi semelhante para as microemulsões contendo o ativo, sendo interpretadas e avaliadas como “Não Irritantes (NI)” (91). Logo, tanto o resveratrol quanto a microemulsão preparada se apresentam como seguros para o uso tópico.

6. CONCLUSÃO

Inicialmente, por meio de ensaios de pré-formulação, foi validado o método bioanalítico cromatográfico capaz de quantificar de maneira seletiva, linear, precisa e exata, e com sensibilidade o ativo resveratrol na presença de interferentes da pele de suíno e dos excipientes da microemulsão. Ensaios de solubilidade apontaram para o melhor meio para solubilização do resveratrol em estudos posteriores, e os ensaios de análise térmica mostraram que o resveratrol poderia ser associado ao óleo de semente de uva, Tween 80 e Span 80 (componentes selecionados para o preparo das microemulsões) sem comprometer a sua estabilidade e identidade.

Pelo diagrama de fases pseudoternário, foram desenvolvidas um total de 26 (vinte e seis) microemulsões, em que duas foram selecionadas por atenderem aos parâmetros físico-químicos esperados para a formulação, como pH e tamanho de gotícula, além da viscosidade. As duas formulações apresentaram tamanho de gotícula inferior a 25 nm, caracterizando-as como microemulsões.

O resultado dos ensaios de permeação cutânea demonstrou que ambas as microemulsões selecionadas para estudo promoveram aumento significativo da quantidade de resveratrol quantificada na camada mais profunda da pele, que é o alvo terapêutico para a rosácea, enquanto houve diminuição da quantidade de ativo quantificado no estrato córneo. A ME 1 (15% fase oleosa, 35% tensoativo, 50% fase aquosa) apresentou resultados superiores aos da ME 2 (10% fase oleosa, 30% tensoativo, 60% fase aquosa) em termos de permeação cutânea do ativo, provavelmente por ter maior conteúdo oleoso.

Além disso, as microemulsões se mantiveram estáveis por 60 dias, sob temperatura de 4 e 25°C, e os resultados do ensaio de HET-CAM mostraram que os excipientes selecionados junto ao ativo não demonstraram potencial irritante, garantindo a segurança para a aplicação tópica das microemulsões.

Desta forma, as microemulsões desenvolvidas neste estudo parecem veículos promissores para serem aplicados dermatologicamente no tratamento da rosácea, com comprovada estabilidade e segurança e, sobretudo, efeito marcante na promoção da efetiva penetração cutânea do ativo.

REFERÊNCIAS

1. Ahn CS, Huang WW. Rosacea Pathogenesis. *Dermatol Clin* [Internet]. 1º de abril de 2018 [citado 1º de novembro de 2023];36(2):81–6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29499802/>
2. M F, S D. Rosacea. *Skin Diseases in Females* [Internet]. 1º de janeiro de 2023 [citado 1º de novembro de 2023];137–51. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491506/>
3. Oliveira CMM de, Almeida LMC, Bonamigo RR, Lima CWG de, Bagatin E. Consensus on the therapeutic management of rosacea – Brazilian Society of Dermatology. *An Bras Dermatol* [Internet]. 24 de março de 2021 [citado 1º de novembro de 2023];95:53–69. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/PhP8KdVW9jrZRZsqf8q5jxF/?lang=en>
4. Juliandri J, Wang X, Liu Z, Zhang J, Xu Y, Yuan C. Global rosacea treatment guidelines and expert consensus points: The differences. *J Cosmet Dermatol* [Internet]. 1º de agosto de 2019 [citado 1º de novembro de 2023];18(4):960–5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30809947/>
5. Green C, Colquitt JL, Kirby J, Davidson P, Payne E. Clinical and cost-effectiveness of once-daily versus more frequent use of same potency topical corticosteroids for atopic eczema: a systematic review and economic evaluation HTA Health Technology Assessment NHS R&D HTA Programme. *Health Technol Assess (Rockv)* [Internet]. 2004;8(47). Disponível em: <http://www.ncchta.org>
6. Riahi RR, Bush AE, Cohen PR. Topical Retinoids: Therapeutic Mechanisms in the Treatment of Photodamaged Skin. *Am J Clin Dermatol*. 11 de junho de 2016;17(3):265–76.
7. Bacchi S, Palumbo P, Sponta A, Coppolino MF. Clinical Pharmacology of Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs: A Review. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 1º de setembro de 2012;11(1):52–64.
8. Gallo RL, Granstein RD, Kang S, Mannis M, Steinhoff M, Tan J, et al. Standard classification and pathophysiology of rosacea: The 2017 update by the National Rosacea Society Expert Committee. *J Am Acad Dermatol*. janeiro de 2018;78(1):148–55.
9. Two AM, Wu W, Gallo RL, Hata TR. Rosacea: part I. Introduction, categorization, histology, pathogenesis, and risk factors. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1º de maio de

- 2015 [citado 1º de novembro de 2023];72(5):749–58. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25890455/>
10. Meng T, Xiao D, Muhammed A, Deng J, Chen L, He J. Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. *Molecules* [Internet]. 1º de janeiro de 2021 [citado 30 de outubro de 2023];26(1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33466247/>
 11. Pentek T, Newenhouse E, O'Brien B, Singh Chauhan A. Development of a Topical Resveratrol Formulation for Commercial Applications Using Dendrimer Nanotechnology. *Molecules* [Internet]. 1º de janeiro de 2017 [citado 1º de novembro de 2023];22(1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28098828/>
 12. Silva R de C da, Teixeira JA, Nunes WDG, Zangaro GAC, Pivatto M, Caires FJ, et al. Resveratrol: A thermoanalytical study. *Food Chem.* dezembro de 2017;237:561–5.
 13. Rafe T, Shawon PA, Salem L, Chowdhury NI, Kabir F, Bin Zahur SM, et al. Preventive Role of Resveratrol Against Inflammatory Cytokines and Related Diseases. *Curr Pharm Des* [Internet]. 10 de abril de 2019 [citado 1º de novembro de 2023];25(12):1345–71. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30968773/>
 14. Nastiti C, Ponto T, Abd E, Grice J, Benson H, Roberts M. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. *Pharmaceutics*. 21 de setembro de 2017;9(4):37.
 15. Sarkar O, Li Y, Anand-Srivastava MB. Resveratrol prevents the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats through the inhibition of enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins 1. *Can J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2019 [citado 1º de novembro de 2023];97(9):872–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30925226/>
 16. Garavaglia J, Markoski MM, Oliveira A, Marcadenti A. Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. *Nutr Metab Insights*. 16 de janeiro de 2016;9:NMI.S32910.
 17. Garavaglia J, Markoski MM, Oliveira A, Marcadenti A. Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. *Nutr Metab Insights* [Internet]. 16 de agosto de 2016 [citado 30 de outubro de 2023];9:59–64. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27559299/>
 18. Baek J, Lee MG. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Report*. 3 de julho de 2016;21(4):164–9.

19. National Center for Biotechnology Information. PubChem. 2023 [citado 12 de novembro de 2023]. Compound Summary: Resveratrol. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resveratrol>.
20. Allen Jr L V., Popovich NG, Ansel HC. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 9.ed. Porto Alegre: Artmed ; 2013.
21. Alves NC. Penetração de Ativos na Pele: Revisão Bibliográfica. *Amazônia Science & Health*. 10 de dezembro de 2015;3(4):36–43.
22. Leanpolchareanchai J, Teeranachaideekul V. Topical Microemulsions: Skin Irritation Potential and Anti-Inflammatory Effects of Herbal Substances. *Pharmaceuticals* [Internet]. 1º de julho de 2023 [citado 26 de setembro de 2023];16(7). Disponível em: </pmc/articles/PMC10384732/>
23. Souto EB, Cano A, Martins-Gomes C, Coutinho TE, Zielińska A, Silva AM. Microemulsions and Nanoemulsions in Skin Drug Delivery. *Bioengineering*. 5 de abril de 2022;9(4):158.
24. Petrilli R, Lopez RFV. Physical methods for topical skin drug delivery: concepts and applications. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 8 de novembro de 2018;54(spe).
25. Gratieri T, Gelfuso GM, Lopez RFV. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Quim Nova* [Internet]. 2008 [citado 1º de novembro de 2023];31(6):1490–8. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/3FVBPdXRSWx8KCg4DntKmYm/>
26. Hecker A, Schellnegger M, Hofmann E, Luze H, Nischwitz SP, Kamolz LP, et al. The impact of resveratrol on skin wound healing, scarring, and aging. Vol. 19, *International Wound Journal*. 2022.
27. Chen M, Fu Q, Song X, Muhammad A, Jia R, Zou Y, et al. Preparation of resveratrol dry suspension and its immunomodulatory and anti-inflammatory activity in mice. *Pharm Biol*. 1º de janeiro de 2020;58(1):8–15.
28. Suktham K, Koobkokkruad T, Wutikhun T, Surassmo S. Efficiency of resveratrol-loaded sericin nanoparticles: Promising bionanocarriers for drug delivery. *Int J Pharm* [Internet]. 15 de fevereiro de 2018 [citado 1º de novembro de 2023];537(1–2):48–56. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29229512/>
29. Aluyen JK, Ton QN, Tran T, Yang AE, Gottlieb HB, Bellanger RA. Resveratrol: potential as anticancer agent. *J Diet Suppl* [Internet]. março de 2012 [citado 1º de

- novembro de 2023];9(1):45–56. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22432802/>
30. Jhaveri A, Deshpande P, Pattni B, Torchilin V. Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma. *J Control Release* [Internet]. 5 de maio de 2018 [citado 1º de novembro de 2023];277:89. Disponível em: </pmc/articles/PMC5911193/>
 31. Langcake P, Pryce RJ. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol*. 1º de julho de 1976;9(1):77–86.
 32. Sharifi-Rad J, Quispe C, Mukazhanova Z, Knut E, Turgumbayeva A, Kipchakbayeva A, et al. Resveratrol-Based Nanoformulations as an Emerging Therapeutic Strategy for Cancer. *Front Mol Biosci*. 1º de setembro de 2021;8:649395.
 33. Chauhan AS. Dendrimer nanotechnology for enhanced formulation and controlled delivery of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. agosto de 2015 [citado 1º de novembro de 2023];1348(1):134–40. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26173478>
 34. Vivero-Lopez M, Sparacino C, Quelle-Regaldie A, Sánchez L, Candal E, Barreiro-Iglesias A, et al. Pluronic®/casein micelles for ophthalmic delivery of resveratrol: In vitro, ex vivo, and in vivo tests. *Int J Pharm*. 25 de novembro de 2022;628.
 35. Lopes RM, Agostini-Costa T da S, Gimenes MA, Silveira D. Chemical Composition and Biological Activities of *Arachis* Species. *J Agric Food Chem*. 11 de maio de 2011;59(9):4321–30.
 36. Yutani R, Teraoka R, Kitagawa S. Microemulsion Using Polyoxyethylene Sorbitan Trioleate and Its Usage for Skin Delivery of Resveratrol to Protect Skin against UV-Induced Damage. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2015;63(9):741–5.
 37. Lončarević I, Petrović J, Teslić N, Nikolić I, Maravić N, Pajin B, et al. Cocoa Spread with Grape Seed Oil and Encapsulated Grape Seed Extract: Impact on Physical Properties, Sensory Characteristics and Polyphenol Content. *Foods*. 6 de setembro de 2022;11(18):2730.
 38. Pighinelli ALMT, Park KJ, Rauen AM, Bevilaqua G, Guillaumon Filho JA. Otimização da prensagem a frio de grãos de amendoim em prensa contínua tipo expeller. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. dezembro de 2008;28:66–71.

39. Michalak M. Plant-Derived Antioxidants: Significance in Skin Health and the Ageing Process. *Int J Mol Sci.* 6 de janeiro de 2022;23(2):585.
40. Davidov-Pardo G, McClements DJ. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chem.* 15 de janeiro de 2015;167:205–12.
41. Mohd Zaffarin AS, Ng SF, Ng MH, Hassan H, Alias E. <p>Pharmacology and Pharmacokinetics of Vitamin E: Nanoformulations to Enhance Bioavailability</p>. *Int J Nanomedicine.* dezembro de 2020;Volume 15:9961–74.
42. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43(4):394–405.
43. Gradzielski M. Recent developments in the characterisation of microemulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* agosto de 2008;13(4):263–9.
44. Souto EB, Fernandes AR, Martins-Gomes C, Coutinho TE, Durazzo A, Lucarini M, et al. Nanomaterials for Skin Delivery of Cosmeceuticals and Pharmaceuticals. *Applied Sciences.* 27 de fevereiro de 2020;10(5):1594.
45. López-Quintela MA. Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* junho de 2003;8(2):137–44.
46. Bullón J, Molina J, Márquez R, Véjar F, Scorzza C, Forgiarini A. Nano-emulsification of triglyceride oils for parenteral use by mean of a low-energy emulsification method. *researchgate.net* [Internet]. 2007 [citado 1º de novembro de 2023];30(1):1–9. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Ronald-Marquez-2/publication/262462628_Nano-emulsionacion_de_aceites_trigliceridos_para_uso_parenteral_mediante_un_metodo_de_baja_energia/links/5b2d4700aca2720785db163e/Nano-emulsionacion-de-aceites-trigliceridos-para-uso-parenteral-mediante-un-metodo-de-baja-energia.pdf
47. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter.* 2012;8(6):1719–29.
48. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* dezembro de 2000;45(1):89–121.
49. Förster T, Von Rybinski W, Wadle A. Influence of microemulsion phases on the preparation of fine-disperse emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 12 de julho de 1995;58(2–3):119–49.

50. Jintapattanakit A. Preparation of nanoemulsions by phase inversion temperature (PIT). *Pharmaceutical Sciences Asia*. 2018;42(1):1–12.
51. Borrin TR. Nanoemulsões produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP) para encapsulação de curcumina: parâmetros de produção, estabilidade físico-química e incorporação em sorvete. 2015.
52. Rai VK, Mishra N, Yadav KS, Yadav NP. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. Vol. 270, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V.; 2018. p. 203–25.
53. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. Vol. 252, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V.; 2017. p. 28–49.
54. Fu Y, Xiao S, Liu S, Chang Y, Ma R, Zhang Z, et al. Atomistic Insights into the Droplet Size Evolution during Self-Microemulsification. *Langmuir*. 15 de março de 2022;38(10):3129–38.
55. Ma Q, Zhong Q. Incorporation of soybean oil improves the dilutability of essential oil microemulsions. *Food Research International*. maio de 2015;71:118–25.
56. Moghimipour E, Salimi A, Leis F. Preparation and Evaluation of Tretinoin Microemulsion Based on Pseudo-Ternary Phase Diagram. *Adv Pharm Bull [Internet]*. 2012 [citado 27 de outubro de 2023];2(2):141. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC3845984/>
57. Anvisa. RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. Em Brasil; 2017.
58. ICH. Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1). Em 2005. p. 1–17. Disponível em: <http://www.emea.eu.int>
59. Teichmann A, Jacobi U, Ossadnik M, Richter H, Koch S, Sterry W, et al. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol*. agosto de 2005;125(2):264–9.
60. Oliveira PM, Sampaio TR, França LCF, Gratieri T, Cunha-Filho M, Gelfuso GM. LC–MS bioanalytical method for simultaneous determination of latanoprost and minoxidil in the skin. *J Pharm Biomed Anal*. 5 de agosto de 2020;187.
61. Granados PA, Pinho LAG, Sa-Barreto LL, Gratieri T, Gelfuso GM, Cunha-Filho M. Application of hot-melt extrusion in the complexation of naringenin with cyclodextrin

- using hydrophilic polymers. *Advanced Powder Technology*. janeiro de 2022;33(1):103380.
62. Delgado IF, Rigo L, Cordeiro G, Campos Valadares M. ATLAS DO MÉTODO HET-CAM: Protocolo ilustrado aplicado à avaliação de toxicidade ocular [Internet]. 2023. Disponível em: <https://educare.fiocruz.br/>
 63. Imre S, Laurian Vlase, Daniela-Lucia Muntean. Bioanalytical method validation. *R*. 2008;13–21.
 64. Ravikumar P, Katariya M, Patil S, Tatke P, Pillai R. Skin delivery of resveratrol encapsulated lipidic formulation for melanoma chemoprevention. *J Microencapsul*. 8 de agosto de 2019;1–17.
 65. Cao L, Li X, Zhao J, Du Q, Dun J. Skin pigmentation improvement with resveratrol microemulsion gel using polyoxyethylene hydrogenated castor oil. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2023 [citado 30 de outubro de 2023];49(2):207–16. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03639045.2023.2195508>
 66. Gartzandia O, Lasa A, Pedraz JL, Miranda J, Portillo MP, Igartua M, et al. Preparation and characterization of resveratrol loaded pectin/alginate blend gastro-resistant Microparticles. *Molecules*. 2018;23(8).
 67. Boo YC. Human skin lightening efficacy of resveratrol and its analogs: From in vitro studies to cosmetic applications. *Antioxidants*. 1º de setembro de 2019;8(9).
 68. Adjunto O CDVND e M da S. RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003. Em 2003. p. 1–11.
 69. Liu P, De Wulf O, Laru J, Heikkilä T, van Veen B, Kiesvaara J, et al. Dissolution Studies of Poorly Soluble Drug Nanosuspensions in Non-sink Conditions. *AAPS PharmSciTech*. 25 de junho de 2013;14(2):748–56.
 70. Gade S, Patel KK, Gupta C, Anjum MM, Deepika D, Agrawal AK, et al. An Ex Vivo Evaluation of Moxifloxacin Nanostructured Lipid Carrier Enriched In Situ Gel for Transcorneal Permeation on Goat Cornea. *J Pharm Sci* [Internet]. 1º de setembro de 2019 [citado 24 de setembro de 2023];108(9):2905–16. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30978345/>
 71. Lee A, Lee LT, Costa LMAS, Alves E, Zied JA, Dias DC, et al. Efeito inibitório de DMSO, Tween 80 e Triton X-100 sobre *Agaricus bisporus* e *Lecanicillium fungicola*. *Revista Brasileira de Meio Ambiente*. 2023;(11):99–112.

72. Pareek A, Pant M, Gupta MM, Kashania P, Ratan Y, Jain V, et al. Moringa oleifera: An Updated Comprehensive Review of Its Pharmacological Activities, Ethnomedicinal, Phytopharmaceutical Formulation, Clinical, Phytochemical, and Toxicological Aspects. *Int J Mol Sci.* 20 de janeiro de 2023;24(3):2098.
73. Koneva AS, Safonova EA, Kondrakhina PS, Vovk MA, Lezov AA, Chernyshev YuS, et al. Effect of water content on structural and phase behavior of water-in-oil (n-decane) microemulsion system stabilized by mixed nonionic surfactants SPAN 80/TWEEN 80. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* abril de 2017;518:273–82.
74. Bail S, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer G. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chem [Internet].* 1º de junho de 2008 [citado 1º de novembro de 2023];108(3):1122–32. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26065780/>
75. Salager JL, Marquez R, Rondón M, Bullón J, Graciaa A. Review on Some Confusion Produced by the Bicontinuous Microemulsion Terminology and Its Domains Microcurvature: A Simple Spatiotemporal Model at Optimum Formulation of Surfactant-Oil-Water Systems. Vol. 8, ACS Omega. American Chemical Society; 2023. p. 9040–57.
76. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release.* agosto de 2016;235:337–51.
77. López-Cano JJ, González-Cela-Casamayor MA, Andrés-Guerrero V, Vicario -de-la-Torre M, Benítez del Castillo JM, Herrero-Vanrell R, et al. Development of an osmoprotective microemulsion as a therapeutic platform for ocular surface protection. *Int J Pharm.* julho de 2022;623:121948.
78. Feng NP, Shen L, Zhang Y, Wang Q, Xu L. Preparation and evaluation of microemulsion-based transdermal delivery of total flavone of rhizoma arisaematis. *Int J Nanomedicine.* julho de 2014;3453.
79. Klang V, Matsko NB, Valenta C, Hofer F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron.* fevereiro de 2012;43(2–3):85–103.
80. Gratieri T, Gelfuso GM, Rocha EM, Sarmiento VH, de Freitas O, Lopez RFV. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* junho de 2010;75(2):186–93.

81. Cardoso CO, Ferreira-Nunes R, Cunha-Filho M, Gratieri T, Gelfuso GM. In situ gelling microemulsion for topical ocular delivery of moxifloxacin and betamethasone. *J Mol Liq.* agosto de 2022;360:119559.
82. Numin MS, Jumbri K, Ramli A, Borhan N. Microemulsion Rheological Analysis of Alkaline, Surfactant, and Polymer in Oil-Water Interface. 2020 [citado 27 de outubro de 2023]; Disponível em: www.mdpi.com/journal/processes
83. Kaur A, Kamalpreet, Sharma G, Verma S, Goindi S, Katare OP. Oral microemulsion of phytoconstituent found in licorice as chemopreventive against benzo(a)pyrene induced forestomach tumors in experimental mice model. *J Drug Deliv Sci Technol.* junho de 2017;39:523–30.
84. Salehi F, Inanloodoghuz M, Karami M. Rheological properties of carboxymethyl cellulose (CMC) solution: Impact of high intensity ultrasound. *Ultrason Sonochem.* dezembro de 2023;101:106655.
85. Ferreira-Nunes R, Silva SMM da, Souza PEN de, Magalhães P de O, Cunha-Filho M, Gratieri T, et al. Incorporation of *Eugenia dysenterica* extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation. *J Mol Liq.* setembro de 2018;265:408–15.
86. Harwansh RK, Patra KC, Pareta SK, Singh J, Rahman MA. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of glycyrrhizin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* dezembro de 2011;47(4):769–78.
87. Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology.* fevereiro de 1985;23(2):287–91.
88. Bernardi DS, Pereira TA, Maciel NR, Bortoloto J, Viera GS, Oliveira GC, et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: In vitro and in vivo assessments. *J Nanobiotechnology.* 28 de setembro de 2011;9.
89. Vibhute S, Kasture V, Kasture S, Kendre P, Rupnar S, Pande V. Design and characterization of *Moringa oleifera* seed oil impregnated anti-inflammatory topical micro-dispersion. *Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre* [Internet]. 2015 [citado 22 de novembro de 2023];7(3):7–16. Disponível em: www.scholarsresearchlibrary.com
90. Rocha-Filho P, Ferrari M, Maruno M, Souza O, Gumiero V. In Vitro and In Vivo Evaluation of Nanoemulsion Containing Vegetable Extracts. *Cosmetics.* 7 de setembro de 2017;4(3):32.

91. Khatoon K, Ali A, Ahmad FJ, Hafeez Z, Rizvi MMA, Akhter S, et al. Novel nanoemulsion gel containing triple natural bio-actives combination of curcumin, thymoquinone, and resveratrol improves psoriasis therapy: in vitro and in vivo studies. *Drug Deliv Transl Res.* 23 de junho de 2021;11(3):1245–60.