

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MARIA EUGÊNIA LIMA CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES VEGANAS NANOTECNOLÓGICAS
PARA VEICULAÇÃO CUTÂNEA DE RESVERATROL**

URUGUAIANA

2024

MARIA EUGÊNIA LIMA CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES VEGANAS NANOTECNOLÓGICAS PARA
VEICULAÇÃO CUTÂNEA DE RESVERATROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmácia.

Dissertação defendida e aprovada em: 03 de maio de 2024.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Letícia Marques Colomé

Orientador
UNIPAMPA

Profa. Dra. Cristiane Casagrande Denardin

UNIPAMPA

Dra. Taiane Medeiros Ciocheta

UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por **LETICIA MARQUES COLOME, PROFESSOR MAGISTÉRIO SUPERIOR**, em 09/05/2024, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **TAIANE MEDEIRO CIOCHETA, Usuário Externo**, em 09/05/2024, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **CRISTIANE CASAGRANDE DENARDIN, PROFESSOR MAGISTÉRIO SUPERIOR**, em 10/05/2024, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1435735** e o código CRC **1DA80B02**.

AGRADECIMENTO

Agradeço, primeiramente, a Deus e aos orixás por me darem forças para seguir a cada obstáculo que seguiu e energia para conseguir concluir mesmo quando parecia que não conseguiria concluir o objetivo.

À minha mãe, Margarete, me apoiando desde o início dessa jornada e me incentivou a fazer mesmo estando em dúvida se era esse mesmo o caminho, o qual gostaria de seguir. Por todos os conselhos nos momentos difíceis em que nada parecia funcionar. Assim, como a minha família, os meus tios Mara e Ricardo, minhas primas, minha madrinha, por todo apoio.

À minha orientadora, Letícia Colomé, sempre querida com todos e sempre apoiando as nossas loucuras e mesmo falando que seria difícil, muito difícil concluir esse projeto, logo no início do mestrado, deu todo o suporte para que ele fosse possível. E mesmo quando parecia que não daria certo, ela estava ali pra dar um ânimo pra gente com as palavras calmas dela.

Aos meus amigos, em especial as minhas amigas que estiveram comigo desde o início da graduação, Mylena, Luana e Bethânia, mesmo que agora longe, sempre estão presente. Em especial, ao Pedro, parceiro de laboratório e que hoje em dia, se tornou um dos meus melhores amigos, por ter estado comigo durante as longas tardes até a noite em frente ao HPLC ou no rota quando ele demorava demais.

À Nicolle, por ter estado comigo, nos momentos bons e nos ruins, quando a nano dava errado e ela me abraçava enquanto eu chorava, porque achava que nunca ia conseguir fazer aquilo, mas ao mesmo tempo que pulou comigo quando deu certo.

Ao pessoal do GBToxBio, principalmente Nathane e o Jean, pelo auxílio nos momentos de dúvidas. E aos vizinhos do laboratório, LabFar, pela ajudinha extra para aprender o HPLC.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

À Universidade Federal do Pampa, pela oportunidade e espaço para realização deste trabalho.

If I can stop one heart from breaking,
I shall not live in vain.

— Emily Dickinson

RESUMO

A indústria cosmética está continuamente buscando por inovações que estejam conectadas aos apelos dos consumidores. Estes, por sua vez, têm buscado produtos que cumpram os requisitos da denominada *Clean Beauty*, baseada na utilização de matérias-primas naturais aliada à ausência de testes em animais. Estes produtos estão divididos em três categorias - orgânicos, naturais e veganos - os quais possuem normativas distintas. No mercado cosmético existem variados impulsos para a produção e comercialização destas e de outras categorias de novos produtos cosméticos, sendo um destes a busca por minimizar os efeitos do envelhecimento cutâneo. Os ativos majoritariamente utilizados para esta finalidade são os antioxidantes, que neutralizam os radicais livres mas são sensíveis a luz, umidade ou temperaturas elevadas, acarretando degradação e perda de eficácia, aliada a dificuldade de permear a barreira cutânea. Na área cosmética existem diferentes nanossistemas capazes de transportar e proteger ativos, dentre os quais destacam-se as nanopartículas lipídicas, dada sua vantajosa biocompatibilidade com a pele. O resveratrol é um antioxidante de origem natural, geralmente encontrado na casca da uva, contudo é fotossensível. Assim, neste trabalho, foi realizado o desenvolvimento de uma nanopartícula lipídica vegana constituída por matérias-primas naturais - manteiga de cupuaçu e óleo de buriti - para encapsulamento de resveratrol. Os resultados obtidos demonstraram que as nanopartículas apresentaram tamanho nanométrico, carga superficial alta (em módulo), pH compatível com aplicação cutânea e atividade antioxidante superior ou igual ao ativo livre, demonstrando potencial para serem utilizadas na prevenção dos sinais do envelhecimento. Além disso, nas avaliações de permeação *in vitro* observou-se menor fluxo de permeação e menor quantidade permeada de ativo livre em relação ao ativo oriundo das nanopartículas, inferindo-se uma retenção do ativo no interior dos carreadores. Por fim, formulações semissólidas com adequadas características tixotrópicas foram preparadas para a veiculação das nanopartículas, permitindo futura aplicação por via tópica. Desse modo, este trabalho demonstrou a preparação de uma formulação de nanopartículas inovadoras, uma vez que seguem as normativas para cosméticos veganos, bem como o desenvolvimento de formulações semissólidas também veganas com a finalidade de facilitar a aplicação cutânea das nanopartículas.

Palavras chave: envelhecimento cutâneo; nanopartículas lipídicas; cosmético vegano.

ABSTRACT

The cosmetics industry is continually searching for innovations that are connected to consumer appeals. These, in turn, have sought products that meet the requirements of the so-called Clean Beauty, based on the use of natural raw materials combined with the absence of animal testing. These products are divided into three categories - organic, natural and vegan, which have different regulations. In the cosmetic market there are various impulses for the production and commercialization of these and other categories of new cosmetic products, one of which is the search to minimize the effects of skin aging. The active ingredients mostly used for this purpose are antioxidants, which neutralize free radicals but are sensitive to light, humidity or high temperatures, causing degradation and loss of effectiveness, combined with difficulty in permeating the skin barrier. In the cosmetic area, there are different nanosystems capable of transporting and protecting assets, among which lipid nanoparticles stand out, given their advantageous biocompatibility with the skin. Resveratrol is an antioxidant of natural origin, generally found in grape skins, however it is photosensitive. Thus, in this work, the development of a vegan lipid nanoparticle consisting of natural raw materials - cupuaçu butter and buriti oil - was carried out for encapsulating resveratrol. The results obtained demonstrated that the nanoparticles had a nanometric size, high surface charge (in modulus), pH compatible with skin application and antioxidant activity greater than or equal to the free active ingredient, demonstrating the potential to be used to prevent signs of aging. Furthermore, in in vitro permeation assessments, a lower permeation flux and a smaller permeated amount of free active ingredient were observed in relation to the active ingredient originating from the nanoparticles, inferring a retention of the active ingredient inside the carriers. Finally, semi-solid formulations with adequate thixotropic characteristics were prepared for the delivery of nanoparticles, allowing future topical application. Thus, this work demonstrated the preparation of an innovative nanoparticle formulation, as it follows the regulations for vegan cosmetics, as well as the development of semi-solid formulations that are also vegan in order to facilitate the skin application of nanoparticles.

Keywords: aging; nanoparticle; Vegan

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Demonstrativo do selo utilizado para os produtos veganos no Brasil.....	32
Figura 2. Estrutura do Resveratrol.....	34
Figura 3. Estrutura química do resveratrol (a) trans-resveratrol (b) cis-resveratrol....	35
Figura 4. Demonstração de algumas das diferentes formulações preparadas para o desenvolvimento das nanopartículas lipídicas veganas. (A) Formulação nº1; (B) Formulação nº4; (C) Formulação nº 5 (D) Formulação nº 13; (F) Formulação nº 14.	58
Figura 5. Distribuição granulométrica baseada no (A) volume e (B) número de partículas para NV-B obtidas pelo método de fusão.....	59
Figura 6. Nanopartículas lipídicas veganas NV-B (sem ativo) e NV-R (contendo resveratrol), respectivamente.....	59
Figura 7. Distribuição granulométrica baseada no (A) volume e (B) número de partículas lipídicas para NV-B obtidas pelo método de emulsificação-difusão.....	60
Figura 8. Distribuição granulométrica baseada no (A) volume e (C) número de partículas lipídicas para NV-R obtidas pelo método de emulsificação-difusão.....	60
Figura 9. Cromatograma das NV-R na concentração de 10µg/mL (amostra) e das NV-B (branco).....	63
Figura 10. Curva padrão para obtenção da equação da reta.....	64
Figura 11. Curva padrão utilizando o meio de permeação para obtenção da equação da reta.....	67
Figura 12. Representação gráfica do perfil de permeação de resveratrol livre (RES) e proveniente das nanopartículas (NV-R).....	68
Figura 13. Concentração (mg/mL) de RES livre e proveniente de NV-R recuperada na membrana (M); ou permeada/quantificada no meio de permeação (P). (*) diferença significativa entre P.RES em relação a P.NV-R.....	69
Figura 14. Distribuição granulométrica baseada no volume de partículas para lipossoma.....	70
Figura 15. Curva padrão de MDA para obtenção da equação da reta.....	70
Figura 16. Atividade antioxidante (AA%) das nanopartículas lipídicas contendo (NV-R) ou não (NV-B) resveratrol em relação ao ativo livre (RES), em diferentes concentrações, utilizando antioxidante padrão BHT: (A) AA% nos diferentes grupos a	

70 μ M de RES; (B) AA% nos diferentes grupos a 140 μ M de RES; (C) AA% nos diferentes grupos a 210 μ M de RES; (D) AA% nos diferentes grupos a 290 μ M de RES. (*) Diferença significativa da atividade antioxidante de NV-R em relação a RES. (#) Diferença significativa da atividade antioxidante das NV-B em relação às NV-R.	72
Figura 17. Atividade antioxidante (%) das partículas nanoestruturadas lipídicas contendo ou não resveratrol (NV-R e NV-B, respectivamente) em diferentes concentrações utilizando uma solução de resveratrol livre (RES) e BHT como antioxidantes padrão. Não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações utilizadas para o teste.....	73
Figura 18. Formulações utilizando o polímero Aristoflex®: (A) Gel preparado à frio, na concentração de 2% contendo NV-B (nanopartículas sem ativo); (B) Gel preparado à quente, na concentração de 2% contendo RES livre.....	75
Figura 19. Géis de Natrosol® (2%) eleitos para a veiculação de resveratrol e nanopartículas lipídicas veganas contendo ou não o ativo. (F) formulações preparadas por refrigeração (Q) formulações preparadas por aquecimento.....	76
Figura 20. Curvas de fluxo (tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento) referentes a série de formulações semissólidas.....	77
Figura 21. Curvas de viscosidade (viscosidade versus taxa de cisalhamento) referentes a série de formulações semissólidas.....	78
Figura 21. Distribuição granulométrica das formulações semissólidas neutras preparadas por resfriamento e aquecimento.....	81
Figura 22. Distribuição granulométrica das formulações semissólidas contendo resveratrol livre preparadas por resfriamento e aquecimento.....	81
Figura 23. Distribuição granulométrica dos gel-base veiculado com nanopartículas lipídicas branca pelo método de refrigeração (A) distribuição por volume do GNVB-F (B) distribuição por número do GNVB-F (C) distribuição por volume do GNVR-F (D) distribuição por número do GNVR-F.....	82
Figura 24. Distribuição granulométrica dos gel-base veiculado com nanopartículas lipídicas branca pelo método de aquecimento (A) distribuição por volume do GNVB-Q (B) distribuição por número do GNVB-Q (C) distribuição por volume do GNVR-Q (D) distribuição por número do GNVR-Q.....	83
Figura 25. Formulações de gel-base veiculado com resveratrol livre (A) formulação	

de gel com resveratrol preparado por refrigeração, dia 0; (B) formulação de gel de resveratrol preparado por aquecimento, dia 0; (C) formulação de gel de resveratrol preparado por refrigeração após 15 dias; (D) formulação de GNVR-F após 15 dias....

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Lista de materiais utilizados no desenvolvimento da nanopartícula lipídica vegana e nos ensaios relacionados à sua caracterização.....	38
Tabela 2. Equipamentos utilizados durante o desenvolvimento das nanopartículas lipídicas veganas e seus diferentes ensaios.....	39
Tabela 3. Composição quantitativa dos componentes para o teste de solubilidade..	42
Tabela 4. Composição quantitativa do NV-B e NV-R.....	43
Tabela 5. Composição quali-quantitativa dos componentes do gel base em diferentes concentrações para seleção da formulação.....	52
Tabela 6. Composição quantitativa dos componentes da formulação do gel antioxidante contendo nanopartículas lipídicas vegana de resveratrol.....	53
Quadro 1. Modificações realizadas na formulação/método zero e características organolépticas e/ou físico químicas das formulações lipídicas veganas obtidas pelo método da fusão sem solvente.....	55
Tabela 7. Distribuição granulométrica das nanopartículas obtida pela técnica de difração a laser baseado no número de partículas, onde (") representa as nanopartículas lipídicas veganas obtidas pela técnica de fusão e (*) representas as nanopartículas lipídicas veganas obtidas pela técnica de emulsificação-difusão (os valores representam a média \pm desvio padrão de dois lotes para NV-B e NV-R).....	60
Tabela 8. Valores obtidos através da avaliação de potencial elétrico (zeta), pH das partículas NV-B e NVR, e valores obtidos da determinação do teor e da eficiência de encapsulação das partículas NV-R (os valores representam a média \pm desvio padrão de dois lotes para NV-B e NV-R). Não houve diferença significativa nos testes avaliados.....	62
Tabela 9. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do RES através de CLAE.....	64
Tabela 10. Valores de precisão para ensaio de repetibilidade (intra-dia) e de precisão intermediária (inter-dia) para a quantificação de RES nas nanopartículas lipídicas por CLAE (os valores representam a média \pm desvio padrão). Não houve diferença significativa entre os valores obtidos entre os diferentes dias.....	65
Tabela 11. Índices de confiança obtidos para os modelos matemáticos característicos	

de comportamentos não-newtonianos.....	80
Tabela 12. Valores de pH das formulações semissólidas \pm o desvio padrão.....	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA%	Atividade antioxidante em percentual
ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	Butilhidroxitolueno
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de fotodiodo
Cosmos	Cosmetic Organic Standard
d(0,1)	Tamanho da partícula abaixo 10% da amostra na curva de distribuição de tamanho
d(0,5)	Tamanho da partícula abaixo/acima de 50% da amostra na curva de distribuição de tamanho
d(0,9)	Tamanho da partícula abaixo 90% da amostra na curva de distribuição de tamanho
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EE%	Eficiência de encapsulação
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fase aquosa
FeSO ₄	Sulfato de Ferro II
FO	Fase Orgânica
GN-Q	Gel neutro à quente

GN-F	Gel neutro à frio
GR-Q	Gel contendo resveratrol à quente
GR-F	Gel contendo resveratrol à frio
GNVB-Q	Gel contendo nanopartículas lipídicas vegana branca à quente
GNVB-F	Gel contendo nanopartículas lipídicas vegana branca à frio
GNVR-Q	Gel contendo nanopartículas lipídicas vegana de resveratrol à quente
GNVR-F	Gel contendo nanopartículas lipídicas vegana de resveratrol à frio
IBD	Instituto biodinâmico de desenvolvimento rural
ICH	International Council for Harmonisation
LD	Limite de detecção
Lipoid® S45	Lecitina de soja
Lipoid® S75	Lecitina de soja
LQ	Limite de quantificação
MDA	Malondialdeído
NV	Nanopartícula lipídica vegana
NV-B	Nanopartícula lipídica vegana branca
NV-R	Nanopartícula lipídica vegana contendo resveratrol
OVB	Óleo vegetal de buriti
PETA	People for the Ethical Treatment of Animals
pH	Potencial de hidrogênio
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RES	Resveratrol
SPAN	Índice de polidispersão

SVB	Sociedade vegetariana brasileira
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Tris-HCL	Tris-(hidroximetil)-aminometano-HCL
Tween® 80	Polissorbato 80
UV	Raio ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1 Pele como mecanismo de barreira.....	24
3.2 Envelhecimento Cutâneo.....	25
3.3.1 Envelhecimento Intrínseco.....	26
3.3.2 Envelhecimento Extrínseco.....	26
3.3.3 Ação dos cosméticos no envelhecimento.....	28
3.3 Indústria cosmética e a produção de cosméticos limpos - Clean Beauty.	29
3.3.1 Cosméticos Orgânicos.....	29
3.3.2 Cosméticos Naturais.....	30
3.3.3 Cosméticos Veganos.....	30
3.4 Utilização de matéria-prima de origem natural e ativos antioxidantes para a prevenção do envelhecimento cutâneo.....	32
3.4.1 Manteiga de Cupuaçu.....	32
3.4.2 Óleo de Buriti.....	32
3.4.3 Resveratrol.....	33
3.5 Nanotecnologia como alternativa de veiculação de ativos cosméticos.....	34
4 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E MÉTODOS.....	37
4.1 Materiais.....	37
4.2 Equipamentos.....	38
4.3 Métodos.....	39
4.3.1 Estudo de pré-formulação.....	39
4.3.1.1 Escolha das matérias-primas.....	39
4.3.1.2 Teste de miscibilidade dos componentes.....	40
4.4 Desenvolvimento de nanopartícula lipídica vegana por diferentes métodos de	

preparação.....	41
4.4.1 Desenvolvimento de nanopartícula lipídica vegana pelo método de fusão sem adição de solvente orgânico.....	41
4.4.2 Desenvolvimento da nanopartícula lipídica vegana contendo resveratrol pelo método de emulsificação-difusão.....	42
4.5 Caracterização físico-química da Nanopartícula Lipídica Vegana contendo Resveratrol.....	43
4.5.1 Determinação do diâmetro da partícula.....	43
4.5.2 Determinação de pH.....	43
4.5.3 Determinação do Potencial Zeta.....	44
4.5.4 Doseamento e eficiência de encapsulação do resveratrol nas nanopartículas lipídicas veganas.....	44
4.6 Validação da metodologia analítica por CLAE para quantificação de resveratrol em nanopartículas lipídicas veganas.....	44
4.6.1 Linearidade.....	45
4.6.2 Seletividade.....	45
4.6.3 Precisão.....	46
4.6.4 Exatidão.....	46
4.6.5 Limite de detecção e limite de quantificação.....	46
4.7 Avaliação da Permeação Cutânea in vitro.....	47
4.7.1 Avaliação da Condição Sink.....	47
4.7.2 Avaliação da permeação in vitro.....	47
4.8 Avaliação da atividade antioxidante in vitro das nanopartículas lipídicas veganas contendo resveratrol.....	48
4.8.1 Preparação dos lipossomas pelo método de injeção de etanol.....	49
4.8.2 Avaliação contra a peroxidação lipídica.....	49
4.9 Preparação e caracterização de base semissólida contendo nanopartículas lipídicas veganas de resveratrol.....	50
4.9.1 Preparação de base semissólida contendo nanopartículas lipídicas veganas de resveratrol.....	50

4.9.2 Caracterização da base semissólida contendo nanopartículas lipídicas vegnas de resveratrol.....	52
4.10 Análise estatística.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Preparação das nanopartículas lipídicas veganas por dois métodos de preparação e avaliação do diâmetro médio como parâmetro de escolha.....	53
5.2 Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas veganas contendo resveratrol: Determinação do potencial zeta, avaliação do pH, teor e eficiência de encapsulação.....	60
5.3 Validação da metodologia analítica por CLAE para quantificação de nanopartículas lipídicas veganas contendo resveratrol.....	61
5.3.1 Seletividade.....	61
5.3.2 Linearidade e limites de detecção e quantificação.....	62
5.3.3 Precisão Intermediária, repetibilidade e exatidão.....	63
5.4 Avaliação da permeação in vitro das nanopartículas.....	65
5.5 Avaliação da Atividade Antioxidante in vitro das Nanopartículas Lipídicas Veganas contendo Resveratrol.....	68
5.6 Preparação da formulação semissólida para veiculação de nanopartículas lipídicas vegana contendo resveratrol.....	73
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
7 REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

Os cosméticos estão presentes na vida do ser humano desde os tempos antigos. Acredita-se que a utilização de produtos que destacam a beleza e façam parte da higiene começou no Egito antigo, evoluindo de acordo com a necessidade dos seus consumidores. Atualmente, existe um apelo em relação a cosméticos de origem natural, os quais buscam vantagens em relação aos seus ingredientes e a sua produção, aliado ao fato de que não sejam testados em animais (Amberg; Fogarassy, 2019). Considerando que esta é uma preocupação tanto para indústria cosmética quanto para os consumidores, no Brasil está em vigor a RDC nº 58, de 24 de Fevereiro de 2023 a qual proíbe a utilização de animais para fins controle de qualidade e produção de cosméticos e produtos de higiene pessoal, em consonância com outros países que possuem resoluções semelhantes (Costa; Santos, 2017; Brasil, 2023).

Especificamente para os cosméticos de origem natural, os selos expostos nos produtos são a principal indicação sobre os ingredientes utilizados e os testes realizados, sendo garantidos por agências certificadoras não governamentais, como o Instituto Biodinâmico de Desenvolvimento Rural (IBD) e a Ecocert, que representa o referencial mundial da Cosmetic Organic Standard (COSMOS) no Brasil. Estes órgão são responsáveis pela certificação e emissão de selos aos produtos orgânicos, naturais e veganos que seguem adequadamente suas requisições (Magalhães, 2018). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), corrobora com orientações e normas para cosméticos, todavia não há uma regulamentação concreta para cosméticos que fazem parte do nicho da *clean beauty*, ou seja, cosméticos “limpos” em termos de produção e avaliação de produtos (Franca, 2020).

A biodiversidade brasileira é rica e a utilização de matérias-primas provenientes de biomas específicos pela indústria cosmética, como a floresta amazônica, vêm aumentando, atentando para maior aproveitamento das espécies nativas aliado à responsabilidade de preservação da natureza. O óleo de buriti e a manteiga de cupuaçu são produzidos a partir dos seus frutos. O óleo é extraído da polpa da palmeira de buriti (*Mauritia flexuosa*), enquanto a manteiga de cupuaçu é produzida das amêndoas do fruto de cupuaçu oriundo do cupuaçuzeiro (*Theobroma*

grandiflorum) (Belfort, 2023; IBIAPINA *et al.*, 2021). São formados por componentes que promovem atributos terapêuticos importantes, como umectação, hidratação, retenção de água e ação antioxidante pela presença de constituintes específicos como os carotenóides (Nonato, 2020).

Ainda considerando as potencialidades da biodiversidade, destacam-se os ativos provenientes da reutilização de frações de alguns frutos como a casca da uva, as quais por muito tempo eram resíduos da vitivinicultura. Da casca da uva pode ser isolado o resveratrol, um antioxidante natural utilizado para diferentes finalidades (antiinflamatório e prevenção de doenças cardiovasculares) e já empregado na indústria cosmética para o desenvolvimento de produtos voltados para saúde da pele e redução dos sinais do envelhecimento cutâneo (Paladini, *et al.*, 2020).

O envelhecimento cutâneo é um fator que movimenta esforços no desenvolvimento de produtos pela indústria cosmética, os denominados *anti-aging*s. Atualmente o novo termo para referir-se aos cosméticos voltados a esse nicho é *well-aging* ou “bem envelhecer”, reconhecido como um termo mais adequado e menos etarista (Tollenaere, 2020). Ainda assim, a indústria cosmética segue na intensa busca por produtos que auxiliem na redução dos sinais do envelhecimento, sejam estes causados por fatores intrínsecos (cronológico e genético) ou extrínsecos (exposição aos raios ultravioletas e relacionados ao estilo de vida). Estes produtos apoiam-se extensamente nos agentes antioxidantes, os quais agem combatendo os efeitos dos radicais livres, auxiliando sua neutralização. Apesar dos benefícios que os antioxidantes possam trazer para a saúde cutânea, estes componentes são muito sensíveis e podem ser facilmente degradados devido a suas características, uma vez que são fotossensíveis, termossensíveis ou higroscópicos, fazendo com que seus efeitos sejam facilmente afetados pelas condições ambientais.

Sendo assim, pode-se buscar alternativas para a estabilização de substâncias lábeis como os antioxidantes, a exemplo da utilização de sistemas nanoestruturados, que auxiliam no transporte cutâneo e na proteção dos ativos, mantendo-os protegidos da exposição aos fatores do ambiente (temperatura, luz, etc). Para tanto, podem ser utilizadas nanocápsulas ou nanoesferas poliméricas, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos

nanoestruturados, entre outras partículas voltadas para área cosmética (Bocheva *et al.*, 2021; Kurtmann *et al.*, 2021; CAO *et al.*, 2020; Silva; Muniz, 2020). Nesse contexto, podemos destacar o uso das nanopartículas lipídicas como uma vantagem para a obtenção de carreadores biodegradáveis e capazes de modificar a permeação do ativo na pele devido a compatibilidade dos materiais utilizados, permitindo adequada adesão à camada cutânea e liberação do ativo (Graces, 2018; Kalita, 2019).

Assim, o presente trabalho têm por objetivo desenvolver nanopartículas lipídicas veganas contendo resveratrol, utilizando como matérias primas vegetais a manteiga de cupuaçu e o óleo de buriti, de modo a constituir uma formulação destinada à prevenção dos sinais do envelhecimento, visando o crescimento dos cosméticos veganos na indústria e o desenvolvimento de produtos inovadores, para acompanhar as novidades do mercado e atender solicitações de consumidores, um novo produto pode mostrar-se promissor. Planejou-se ainda a veiculação das nanopartículas lipídicas veganas contendo resveratrol em uma base semissólida, constituindo um produto final *Well-aging*. As suspensões de nanopartículas foram avaliadas segundo as suas características físico-químicas, bem como sua ação antioxidante e permeação cutânea *in vitro*, respeitando as características e normas estabelecidas pelas agências certificadoras relacionadas a cosméticos veganos. Já as formulações semissólidas foram avaliadas quanto às suas características físico-químicas, também respeitando os preceitos dos cosméticos veganos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de formulações cosméticas veganas de base nanotecnológica com a finalidade de veicular resveratrol como ativo antioxidante para a prevenção do envelhecimento cutâneo.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar um estudo de pré-formulação utilizando diferentes matérias-primas de modo a selecioná-las de acordo com as diretrizes das agências certificadoras de produtos veganos no Brasil;
- Desenvolver nanopartículas lipídicas utilizando matérias-primas de origem vegetal previamente selecionadas atendendo aos parâmetros veganos por dois diferentes métodos de preparação;
- Caracterizar as suspensões de nanopartículas de acordo com parâmetros físico-químicos como tamanho de partícula, distribuição de tamanho, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação;
- Realizar ensaios *in vitro* para avaliar a capacidade antioxidante das nanopartículas lipídicas veganas;
- Realizar ensaio de permeação *in vitro* do resveratrol contido nas nanopartículas lipídicas veganas de modo comparativo ao ativo livre;
- Preparar formulações semissólidas para veiculação das nanopartículas lipídicas veganas, a fim de obter uma preparação de fácil utilização por via tópica;
- Caracterizar as formulações semissólidas por método de refrigeração e aquecimento contendo nanopartículas lipídicas veganas em termos de distribuição de tamanho, pH e viscosidade.

3 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Pele como mecanismo de barreira

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, compondo 16% do peso corporal e desempenhando algumas funções como regulação do calor, sensibilidade e proteção do organismo ao meio ambiente (Walter; Roberts, 2002; Junqueira; Carneiro *et al*, 2018). É composta por três camadas que podem ser classificadas como: epiderme (camada externa), derme (camada intermediária) e hipoderme (camada profunda) (Andrade, 2017). Na epiderme são encontradas células como queratinócitos, células de Merkel, melanócitos e células de Langerhans.

A epiderme está subdividida em quatro camadas - basal, espinhosa, granulosa e córnea. A camada mais superficial (camada córnea) é formada por células corneificadas, anucleadas e planas (os corneócitos) que se diferenciam a partir da camada granulosa e formam uma barreira à permeabilidade (Cheong; Mcgrath, 2017). Os corneócitos presentes na camada córnea são responsáveis pela manutenção da água e dos eletrólitos e sua composição possui cerca de 15% de líquido (Draelos, 2015). Já a camada granulosa é responsável pela formação da bicamada de lipídeos presente entre as fileiras de células cornificadas, tendo como função formar uma barreira protetora e fornecer resistência à absorção percutânea, além de atuar na fixação das células queratinizadas. Os lipídios das bicamadas que envolvem os corneócitos são compostos por uma mistura de colesterol, ceramidas e ácidos graxos livres (Yousef, 2017). A camada espinhosa, por sua vez, encontra-se acima da camada basal sendo composta por fileiras de células (o queratinócito espinhoso) com grande quantidade de tonofibrilas e filamentos intermediários de citoqueratina que abrangem todo o citoplasma chegando às placas de desmossomas, responsáveis pela adesão das fileiras de células presentes nesta camada (Almeida, 2020).

Por fim, a camada basal fica localizada próxima a derme, onde observa-se uma membrana formada por lâmina lúcida (menos eletrodensa e mais próxima à membrana citoplasmática) e outra membrana mais densa (formada por colágeno tipo IV), sendo caracterizada por originar outras camadas. As células presentes nesta porção são responsáveis pela produção de queratina que formam a barreira

epidérmica de água. Quando ocorre a ativação dos precursores de colesterol por luz UVB que formam vitamina D, os queratinócitos regulam a absorção de cálcio. Além disso, são encontrados complexos juncionais que proporcionam a fixação dos queratinócitos basais à membrana basal, chamados de hemidesmossomas (Blair, 2020).

A derme, camada intermediária, está localizada logo abaixo da epiderme e ambas estão conectadas por uma junção derme-epidérmica. É responsável pela resistência e elasticidade cutânea, sendo constituída por fibroblastos que secretam os constituintes da matriz extracelular (MEC), como colágeno, elastina e glicosaminoglicanas. O colágeno e a elastina são considerados proteínas estruturais e, juntamente a matriz extracelular, dão sustentação ao tecido cutâneo, sendo visivelmente afetada pelo envelhecimento. Nesta camada ocorre ainda transporte e apresentação de antígenos para as células do sistema imunológico, como macrófagos, linfócitos e mastócitos. Na camada dérmica pode-se encontrar vasos sanguíneos e linfáticos, sendo fundamental para a proteção e nutrição das camadas epidérmicas (Arda, *et al.*, 2014; Gu, *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2023).

Por fim, encontra-se a hipoderme ou camada subcutânea, sendo considerada a camada mais profunda da pele humana, constituída de tecido conjuntivo frouxo, adipócitos e fibrócitos, ricos em vascularização e inervação. É uma camada mais maleável, servindo de conexão entre a derme e as estruturas móveis (músculos e tendões). É utilizada ainda como reserva lipídica e proteção do organismo contra variações de temperatura (Fernandes *et al.*, 2023; Alves *et al.*, 2016).

3.2 Envelhecimento Cutâneo

O envelhecimento é um processo natural do organismo decorrente de fatores genéticos individuais de cada ser humano, podendo ser classificado, de acordo com suas causas, em envelhecimento intrínseco ou extrínseco. O envelhecimento intrínseco ou cronológico é aquele ocasionado pelo tempo, resultando em marcas tais como linhas de expressão e perda de elasticidade. Já o envelhecimento extrínseco é causado por fatores externos como a exposição ao sol, poluição do meio ambiente, dieta e estilo de vida dos indivíduos, o quais podem acelerar os

processos de envelhecimento natural do organismo, tanto os externos (mais facilmente visíveis) quanto os internos (Bocheva *et al.*, 2021; Simão, 2019; Ruivo, 2014).

3.3.1 Envelhecimento Intrínseco

O envelhecimento natural do organismo ocorre de maneira cronológica, ou seja, com passar dos anos de um indivíduo, Tobin (2017) relata que as características da pele envelhecida observadas são manchas, palidez, pele seca e menos elástica e com rugas finas. As alterações podem ocorrer por diferentes fatores, sendo o mecanismo hormonal um dos principais, normalmente ligado aos fatores de crescimento e coordenação de hormônios. Com o avanço da idade é comum uma redução da produção de estrogênio, testosterona, melatonina, insulina, cortisol, tiroxina e hormônio do crescimento. Em mulheres na pós-menopausa pode ocorrer o hipoestrogenismo, podendo levar a danos cutâneos como pele mais fina e menos hidratada (Sharma *et al.*, 2022).

Ainda relacionado ao envelhecimento intrínseco, a produção celular de energia, gerada pela cadeia de transporte de elétrons do metabolismo aeróbio das mitocôndrias resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que estão associadas ao estresse oxidativo, levando a danos no DNA mitocondrial e degeneração celular, resultando (visivelmente) em uma perda de elasticidade cutânea (Birch-Machin; Bowman, 2016). Adicionalmente, os telômeros (que são pontas terminais dos cromossomos constituídas de nucleoproteínas com função de estabilização e proteção da degradação) estão relacionados ao envelhecimento. No processo de envelhecimento ocorre um encurtamento dos telômeros a cada divisão celular, o que leva a alterações no DNA resultando em senescência ou morte celular de células epidérmicas e, conseqüentemente, nos sinais aparentes da idade (Tuner; Vasu *et al.*, 2019; Gu; Han *et al.*, 2020; Zhang; Duan, 2018).

3.3.2 Envelhecimento Extrínseco

O envelhecimento extrínseco está relacionado com fatores externos ao organismo. O fotoenvelhecimento, ocasionado pela exposição à radiação UV é um dos principais fatores que aceleram o processo natural, sendo responsável por cerca de 80% do envelhecimento facial (Ferraz *et al.*, 2021). Além disso, Zhang e

colaboradores (2018) descrevem sobre a diminuição da expressão de colágeno tipo VII nos queratinócitos causada pela exposição à radiação. Este tipo de colágeno constitui-se em fibrilas de ancoragem na junção dermo-epidérmica, e sua diminuição ocasiona um enfraquecimento na adesão entre as camadas da pele, mais precisamente entre epiderme e derme, culminado com o aparecimento de rugas.

Considerando os seus diferentes comprimentos de onda, os raios UV podem ser classificados em três tipos: o UVA (320-400 nm), o qual representa cerca de 90-95% do espectro ultravioleta terrestre, o UVB (290-320 nm), presente entre 5-10% do espectro, e o UVC (200-290 nm), que devido ao seu comprimento de onda inferior a 290 nm, praticamente não atinge a superfície terrestre, todavia necessita de cuidados quando ocorre exposição por fontes artificiais, podendo causar lesões mutagênicas no DNA e aumento do risco de câncer de pele. A radiação UVA, presente de maneira abundante no espectro e de exposição diária, pode ainda ser subdividida em dois tipos: UVA-1 (340-400 nm) e UVA-2 (320-340 nm). Assim, é a radiação que penetra mais profundamente na pele, entre a epiderme e a derme, afetando a produção de melanina e gerando hiperpigmentação aparente, interagindo e alterando bases de DNA e potencializando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) podendo levar ao estresse oxidativo. A radiação UVB, por sua vez, apesar de estar presente na atmosfera terrestre, pode ocasionar danos devidos a sua absorção pelas proteínas epidérmicas, sendo principalmente absorvida pelos aminoácidos triptofano, tirosina e cistina, resultando na formação direta de radicais livres que ocasionam o estresse oxidativo. A formação de EROs pela exposição aos raios UV pode gerar o encurtamento dos telômeros que levam à senescência e morte celular (CAO *et al.*, 2020). Além disso, os raios UVB estão associados a queimaduras cutâneas (Kammeyer; Luiten, 2015; Kurtmann *et al.*, 2021).

Sabe-se que nem todos os efeitos da radiação são nocivos à saúde da pele. Uma exposição de pouca duração pode ser benéfica na biossíntese de vitamina D₃, uma vez que o 7-desidrocolesterol, o qual é um intermediário na biossíntese de colesterol, ao absorver raios UVB converte-se parcialmente em vitamina D₃ (Berridge, 2015), sendo sua deficiência relacionada a danos, como doenças cardiovasculares, neurológicas e autoimunes. Mostatafa e colaboradores (2015) citam que a 1,25 di-hidroxitamina D₃, que é a forma ativa, após a transformação nos rins, pode estar associada a fotoproteção, induzindo a expressão de

metalotioneína, a qual protege de danos oxidativos ocasionados pelos radicais livres. O processo de envelhecimento também pode ser agravado pelo aumento da poluição terrestre, que ocasiona um aumento de radiação diária, além de comportamentos relacionados ao estilo de vida dos indivíduos como o uso de cigarro, estresse diário e dieta inadequada (Tobin, 2017). A fumaça do cigarro, além de ser nociva à saúde do organismo em geral, mostra-se bastante danosa à pele dos indivíduos, gerando um envelhecimento precoce com sinais aparentes como rugas e linhas finas, principalmente na região da boca, além de coloração irregular com aparecimento de manchas e opacidade da pele (em tom que pode variar entre laranja ou cinza), além de contribuir para a geração de EROs (Puri *et al.*, 2017). Deficiências nutricionais, privação de sono e efeitos da temperatura são alguns fatores adicionais que são estudados em relação ao envelhecimento extrínseco, podendo ocorrer falta de nutrientes e aumento na produção de radicais livres que aumentam o estresse oxidativo e acentuam os sinais do envelhecimento (Krutmann *et al.*, 2017).

3.3.3 Ação dos cosméticos no envelhecimento

Os cosméticos abrangem diversas classes, como produtos de higiene pessoal e dermocosméticos dedicados à saúde da pele. Nesse contexto, destacam-se os cosméticos constituídos por ativos antioxidantes capazes de evitar o processo de oxidação de componentes celulares por ação dos radicais, agindo para prevenção do envelhecimento extrínseco, sendo chamados de “antienvelhecimento” ou no inglês “anti-aging”. Todavia esse termo vem caindo em desuso, sendo rejeitado pelo público alvo desses cosméticos, que estão passando a substituí-lo por “bem envelhecer” ou “envelhecimento saudável”, ou no inglês “well-aging” (Tollenaere, 2020). Estes cosméticos são baseados em ativos antioxidantes, uma vez que apesar de nosso organismo sintetizar antioxidantes endógenos, em certos casos estes não são suficientes, sendo necessário recorrer a ativos sintéticos ou naturais, como o resveratrol (Vinardell, 2015).

Os cosméticos well-aging podem ainda conter filtros solares que atuam como uma barreira de proteção contra raios UV e luz azul, os quais respondem pelo fotoenvelhecimento. Estes produtos podem ser encontrados em diferentes tipos de

formulações, sendo os mais comuns os cremes e sérums (Silva, 2021). Embora a utilização de diferentes tipos de ativos cosméticos sabidamente efetivos em sua ação antioxidante, a pele íntegra representa uma barreira à penetração do ativo, o que muitas vezes impede que se obtenha o resultado esperado para os cosméticos utilizados na prevenção ou tratamento dos sinais do envelhecimento. Sendo assim, diversos produtos atualmente empregam a nanotecnologia de modo a permitir adequada veiculação e permeação cutânea dos ativos (Silva *et al.*, 2020).

3.3 Indústria cosmética e a produção de cosméticos limpos - *Clean Beauty*

Nos últimos anos, têm-se observado uma crescente busca por produtos cosméticos mais sustentáveis que auxiliam na diminuição da poluição ambiental e evitam testes em animais. Há que se considerar também a busca do consumidor pela eficácia cosmética atrelada ao uso de matérias primas que, em contato com a pele, possam ser menos prejudiciais que certos ingredientes sintéticos sabidamente nocivos com o uso constante. Essa demanda crescente, estimulada pela adesão aos hábitos mais naturais, aponta para uma amplificação do mercado cosmético de modo a garantir maior variedade de produtos que possam suprir as expectativas dos consumidores (Reis, 2019).

Diante dessa necessidade, o mercado observa o surgimento e crescimento dos produtos naturais, orgânicos e veganos. Além da diferença em relação aos cosméticos convencionais, os cosméticos naturais, orgânicos e veganos possuem distinções entre si, o que torna o conhecimento sobre eles importante não apenas para o consumidor, mas para a indústria que irá investir. Entretanto, não há uma legislação referente a esses cosméticos segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de forma que são seguidas as normas instituídas por órgãos não governamentais como o Instituto Biodinâmico de Desenvolvimento Rural (IBD) e a Ecocert, que representa o referencial mundial da Cosmetic Organic Standard (COSMOS) no Brasil, órgãos que certificam e emitem selos aos produtos orgânicos, naturais e veganos que seguem adequadamente suas requisições (Magalhães, 2018).

3.3.1 Cosméticos Orgânicos

Os cosméticos orgânicos devem ser constituídos de pelo menos 95% de matéria-prima orgânica obtidas de origem natural através de processos certificados, seguindo os passos de extração, produção e processamento. Os 5% restantes dos materiais devem ser compostos de água e matéria-prima natural (Caiado, 2020). Os cosméticos orgânicos podem ser considerados cosméticos naturais, entretanto não ocorre a definição ao contrário. De acordo com as normas estabelecidas pelas agências certificadoras, não podem ser utilizados conservantes sintéticos, deve-se utilizar majoritariamente ingredientes biocompatíveis e a embalagem dos produtos deve conter informações específicas, incluindo as matérias-primas utilizadas para a fabricação (Dubois, 2019).

3.3.2 Cosméticos Naturais

Os cosméticos naturais são caracterizados pela presença de matérias-primas de origem natural. Podem conter ingredientes de origem sintética, entretanto existem restrições a materiais previamente aprovados para que o produto final seja considerado como natural. Para exemplificar, fragrâncias, corantes sintéticos, silicones, polietilenoglicóis e conservantes tradicionais (fenoxietanol, metilisotiazolinona) são proibidos segundo as certificadoras Cosmos e IBD (Flor, 2019). Os ingredientes naturais podem ser obtidos a partir de plantas, animais, microorganismos e minerais, incluindo plantas geneticamente modificadas. Considerando as definições estabelecidas, os cosméticos naturais possuem percentuais de cosméticos orgânicos, todavia não podem ser considerados como tal. Além disso, as embalagens devem ser cuidadosamente escolhidas pois precisam ser recicláveis e os produtos não podem passar por testes em animais (Romero, 2018).

3.3.3 Cosméticos Veganos

Os cosméticos veganos são caracterizados por não possuírem matérias-primas procedentes de origem animal e, assim como seus ingredientes, sua formulação final não pode ter passado por testes em animais. Outro fator importante é que as embalagens devem ser cuidadosamente elaboradas considerando as regras estabelecidas de materiais que não sejam poluentes.

Considerando a posição das organizações não governamentais de especificações para o produto, é permitido que em sua formulação contenha ingredientes de origem sintética, o que difere dos outros cosméticos (Bertoluci, 2020). No Brasil pode-se obter a certificação de produto vegano e livre de testes em animais. Produtos que seguem as atribuições da Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB) e da People for Ethical Treatment of Animals (PETA), esta última reconhecida em vários países, podem receber dois selos: o Cruelty Free e o Approved Vegan (Flor, 2019). Na figura 1, pode-se observar o selo concedido pela SVB (2023).

Figura 1. Demonstrativo do selo utilizado para os produtos veganos no Brasil.



Fonte: Sociedade Vegetariana Brasileira, 2023

3.4 Utilização de matéria-prima de origem natural e ativos antioxidantes para a prevenção do envelhecimento cutâneo

3.4.1 Manteiga de Cupuaçu

O cupuaçu é oriundo do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), presente na região amazônica. A polpa do fruto é bastante consumida na alimentação, podendo ser utilizada de muitas formas (sucos, sorvetes, geléias, vinhos, licores, tortas e bolos). Já a semente é utilizada para produção da manteiga de cupuaçu, empregada pela indústria cosmética. A manteiga de cupuaçu é um triglicerídeo composto por ácidos graxos saturados e insaturados que apresenta-se em estado sólido a 30°C. Suas propriedades anti-inflamatória, hidratante, antioxidante e emoliente são benéficas para a utilização em produtos de beleza e higiene pessoal como hidratante, batons e produtos capilares (Sano *et al.*, 2018; Dos Santos, 2023; Backer *et al.*, 2023). Pode atuar como um favorável aditivo para o desenvolvimento de sabonetes à base da manteiga, devido a suas características hidratantes, emolientes e ainda umectantes. Além disso, devido à diversidade de triglicerídeos em sua composição, demonstra-se como uma opção vantajosa para o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (Gomes *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2022).

3.4.2 Óleo de Buriti

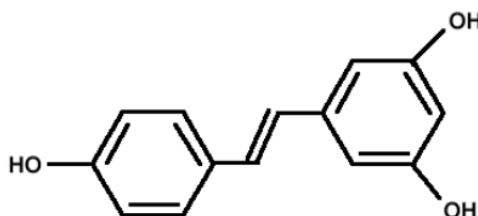
O óleo vegetal de buriti (OVV) é extraído da polpa do fruto da palmeira do buriti (*Mauritia flexuosa*), espécie nativa da flora brasileira, sendo comumente encontrado em regiões do Centro-Oeste, Norte, Nordeste e Sudeste (Belfort, 2023). Devido a sua composição rica em ácidos graxos monoinsaturados e presença de carotenos que são responsáveis pela coloração avermelhada, é um óleo de interesse para diferentes aplicações na indústria farmacêutica e cosmética (Nonato, 2020). Abreu-Naranjo e colaboradores (2020) realizaram a caracterização do extrato da polpa do fruto de buriti e a avaliação da atividade antioxidante, sinalizando a presença de β -caroteno e relacionando-o com sua atividade antioxidante por diferentes ensaios (TBARS, Frap e DPPH). Quanto ao aspecto da toxicidade, Mansour e colaboradores (2020), realizaram a avaliação de fototoxicidade em uma

nanoemulsão contendo o óleo de buriti, demonstrando resultados satisfatórios neste quesito e confirmando a segurança do produto final para a indústria.

3.4.3 Resveratrol

O resveratrol (RES) é um antioxidante natural que possui uma estrutura polifenólica (Figura 2), sendo geralmente encontrado na casca da uva. Apresenta ação anti-inflamatória, sendo utilizado como tratamento complementar para pacientes com problemas cardíacos. Apresenta também atividade antioxidante, que protege contra os radicais livres. Na pele estimula a proliferação dos fibroblastos por meio da proteção contra as reações de oxidação das espécies reativas. Outro benefício do resveratrol como antioxidante está ligado a afinidade com o receptor de estrogênio, relacionada a síntese de colágeno I e II, contribuindo para impedir que ocorram situações pós estresses oxidativos desencadeados pela liberação de interleucinas-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral, que poderiam gerar lesões na pele devido a degradação do colágeno, ácido hialurônico e elastina, além dos processos de oxidação lipídica (Paladini, *et al.*, 2020).

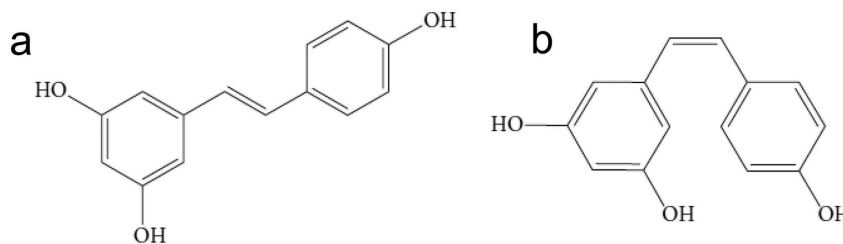
Figura 2. Estrutura do Resveratrol.



Fonte: Henz *et al*, 2020.

O resveratrol é fotossensível e sob a luz ultravioleta é possível observar duas isoformas, trans e cis (Figura 3). Devido a isoforma trans ser mais ativa, a indústria cosmética utiliza esta para o preparo das formulações, incluindo as nanotecnológicas. Encontra-se o trans-resveratrol, geralmente associado a óleos vegetais que possuem características que auxiliam na proteção contra as espécies reativas (Ücker; Rigo, 2019).

Figura 3. Estrutura química do resveratrol (a) trans-resveratrol (b) cis-resveratrol.



Fonte: Riccio *et al.*, 2020.

Estudos demonstraram a eficácia do resveratrol como antioxidante, Coradini e colaboradores (2014) avaliaram o efeito antioxidante do resveratrol co-encapsulado com a curcumina por meio da geração artificial de radical hidroxila e exposição a luz UV, esses resultados foram satisfatórios em relação a ação antioxidante do resveratrol. Em outro estudo, Sharma e colaboradores (2019) avaliaram o potencial do resveratrol em reduzir o radical DPPH, obtendo um resultado positivo.

3.5 Nanotecnologia como alternativa de veiculação de ativos cosméticos

A nanotecnologia é o estudo de partículas manipuladas em escala atômica e molecular com tamanho entre 1 e 999 nm. O termo foi introduzido por Eric Drexler em 1986 em seu livro “Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology” onde o engenheiro buscou explicar a visão do físico norte-americano Richard Feynman, considerado o pai da nanotecnologia. Em 1959 durante uma palestra Richard Feynman, citou a frase “Há muito espaço lá embaixo”, dando a ideia da minimização de estruturas, o que acabou tornando-se um artigo no início da década de 1960. A escala nanométrica atualmente é utilizada para muitas áreas de pesquisa e na indústria, visa explorar as diversas aplicações e funcionalidades das partículas nanométricas (Rolim; Feitosa, 2021). No âmbito cosmético, o termo nanocosméticos define formulações cosméticas responsáveis por carrear ativos ou outros ingredientes em nanoestruturas (Fronza *et al.*, 2007).

Devido ao seu pequeno tamanho e grande área superficial, as nanopartículas podem proporcionar alterações nas características físico-químicas dos compostos carregados, como mudanças na absorção e liberação do ativo, podendo aumentar a sua permeabilidade e garantir sua presença em camadas mais profundas da pele

(Cornier *et al.*, 2020). Além disso, as nanopartículas podem promover estabilidade do ativo encapsulado, aperfeiçoar o desempenho do ativo e evitar irritação dérmica (Silveira *et al.*, 2018). Na indústria cosmética, as nanopartículas são utilizadas atualmente para a fabricação de shampoos, cremes, maquiagens e protetores solares (De Jesus Leopoldo *et al.*, 2020).

Podem ser encontradas diferentes nanopartículas para a veiculação de ativos cosméticos como:

- Os lipossomas são vesículas lipídicas com núcleo aquoso envolto por uma bicamada lipídica, mantendo a porção polar voltada para o interior e o exterior, devido a sua afinidade com a água. Podem ser classificados de acordo com o tamanho e número de bicamadas, sendo classificados como unilamelar (uma camada) ou multilamelar (várias camadas concêntricas). Devido aos fosfolipídios constituintes dos lipossomas serem semelhantes aos fosfolipídeos constituintes das membranas celulares, estes carreadores possuem biocompatibilidade com o organismo, sendo ainda estáveis e seguros para o transporte de fármacos e ativos cosméticos (Gonçalves, 2014; Batista, *et al.*, 2007; Matos, 2015).
- As nanoemulsões são um sistema disperso simples formado a partir de líquidos imiscíveis como óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). Possuem três fases – oleosa, interface e aquosa – sendo sua separação garantida com a utilização de agentes emulsificantes para formação da interface, geralmente constituída de matérias de origem natural (lecitina de soja) ou semissintética (diestearilfosfatidilcolina - DSPC). Na área cosmética são vantajosos para o produto final, devido a suas características estruturais e sua capacidade de transportar ativos. São estáveis e possuem um sensorial agradável aos consumidores (Bruxel *et al.*, 2012; Selbach, 2016; Garcia, 2020).
- As nanopartículas poliméricas (NP's) são constituídas de polímeros, podendo ser naturais ou sintéticos. Podem ser classificados de duas formas - as nanoesferas que possuem uma matriz polimérica em formato esférico, sem núcleo; e nanocápsulas, que são compostas por um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica de espessura

fina, formando um sistema reservatório. A vantagem das NP's na área cosmética está relacionada às suas características que permitem carrear substâncias lipofílicas, proteger substâncias fotossensíveis e termosensíveis, além de mascarar odores de ativos cosméticos (Guterres *et al.*, 2003; Salvioni *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2017).

- As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são carreadores formados por materiais lipídicos naturais ou semissintéticos suspensos em uma fase aquosa utilizando tensoativos que auxiliam na estabilização das partículas (Kalita, 2019; Ahmad, 2021; Zielinska; Nowak 2016). De um modo geral, as NLS são constituídas de lipídios sólidos, a exemplo de ácidos graxos, ceras, glicerídeos e triglicerídeos, enquanto CLN utilizam lipídeos sólidos e líquidos em sua constituição. Possuem características vantajosas para a veiculação de ativos cosméticos, como capacidade de oclusão, promoção de hidratação cutânea e liberação controlada do ativo encapsulado (Cardoza *et al.*, 2022; Sohail *et al.*, 2023).

Destacando as partículas lipídicas, El-Telbany e colaboradores (2021) realizaram um estudo de permeação utilizando NLS e demonstraram que os lipídios do nanocarreador possuem afinidade com os lipídios da pele, facilitando a permeação do ativo. Em relação à potencialidade de encapsulamento, CLN, são considerados a segunda geração das NLS, uma vez que a composição com lipídeos sólidos e líquidos torna o carreador menos cristalina em relação à NLS e permite melhor encapsulamento. No CLN o núcleo oleoso constitui-se como uma estrutura amorfa desordenada da matriz, melhorando a característica de encapsulamento-empulsão do ativo apresentada pelas NLS (Galvão, 2015; Masiero *et al.*, 2021). De maneira geral, NLS e CLN mostram-se adequados e vantajosos para encapsulação de ativos cosméticos, devido a compatibilidade de seus componentes com os tecidos dérmicos, além da proteção que oferecem contra a degradação do ativo (Ahmad; Ahsan, 2020).

4 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Tabela 1. Lista de materiais utilizados no desenvolvimento da nanopartícula lipídica vegana e nos ensaios relacionados à sua caracterização.

	Características	Fornecedor
Resveratrol	Sólido (pó), branco; PF = 256,2 °C; MM = 228,23 g/mol; GP: 99,8%	Galena Farmacêutica®
Manteiga de cupuaçu	Sólido, branco para bege, $\rho = 0,934$	Amazon Oil
Óleo de buriti	Líquido avermelhado; $\rho = 0,9445$; PF = 28°C	Amazon Oil
Lecitina de soja Lipoid® S45	Sólido, contendo 45% de fosfadilcolina	Lipid Ingredients
Fosfolídeos Lipoid® S75	Sólido; contendo 70% de fosfatidilcolina	Lipid Ingredients
Decil poliglucosídeo Plantaren® 2000	Líquido turvo amarelado; Tensoativo	BASF Personal Care
Óleo de oliva PEG-7 esters Olivem® 300	Tensoativo	Hallstar
Cetil fosfato de potássio Amphisol K®	Sólido (pó) branco	DSM-Firmenich Personal Care
Hidroxietilcelulose Natrosol®	Sólido (pó) branco	Ashland

Continua.

Conclusão.

Ácido Ascórbico	Sólido (pó cristalino) branco	Sigma Aldrich
Sulfato de Ferro II	FeSO ₄ , sólido	Sigma Aldrich
Tris-(hidroximetil)-aminom etano-HCL	TRIS-HCL	Synth
Água Ultra-purificada Milli Q®	Líquido	Millipore
Acetato de Etila	Líquido, solvente grau PA	Dinâmica
Acetonitrila	Líquido, solvente grau HPLC	Tedia
Álcool Metílico - Metanol	Líquido, solvente grau HPLC	Tedia
Álcool Etilico - Etanol	Líquido, solvente grau PA	Labsynth

PF - ponto de fusão; MM - massa molar; GP - grau de pureza; ρ - densidade; PA - padrão analítico; HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência.

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

4.2 Equipamentos

Tabela 2. Equipamentos utilizados durante o desenvolvimento das nanopartículas lipídicas veganas e seus diferentes ensaios.

Equipamento	Modelo	Marca
Balança analítica	AY 220	Shimadzu
Banho termostaticado	EH4	Labsynth IKA
Evaporador rotatório	R-210/215	Buchi
Homogeneizador	Ultra-turrax T25	IKA

Continua.

Conclusão.

Agitador de hélice	RW20 Digital	IKA
Banho ultrassônico	1400 A	Unique USC
Potencial zeta	NanoBrook 90Plus Zeta	Brookhaven Instruments
Granulômetro a laser	Mastersizer 2000	Malvern Instruments
Centrífuga	5415 R	Eppendorf
Cromatógrafo (CLAE)	Prominence	Shimadzu
Potenciômetro	pH 21 pH/mV meter	Hanna Instruments
Espectrofotômetro	SpectraMax® M Series	Molecular Devices
Reômetro	LVDV II+	Brookfield

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

4.3 Métodos

A nanopartícula lipídica vegana (NV) foi desenvolvida a partir de estudos de pré-formulação com a finalidade de selecionar possíveis matérias primas para adequar o método de preparação, levando em consideração suas características organolépticas e físico-químicas. Após a seleção da formulação e método de preparação, importantes parâmetros foram avaliados, tais como doseamento do ativo, eficiência de encapsulação do resveratrol na nanopartícula e pH. Além disso foram avaliadas a permeação *in vitro* e a atividade antioxidante *in vitro*.

4.3.1 Estudo de pré-formulação

4.3.1.1 Escolha das matérias-primas

Para a seleção das matérias-primas, primeiramente foi realizada pesquisa sobre os materiais aceitos pelas agências de certificação de produtos veganos internacionais e nacionais tais como Instituto Biodinâmico de Desenvolvimento Rural (IBD), Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB) e Ecocert, sendo que esta última

representa o referencial da Cosmetic Organic Standard (COSMOS) no Brasil. É importante ressaltar que a busca pelas agências certificadoras como diretriz deve-se à falta de regulamentação nacional para produtos veganos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Levando em consideração as normas instituídas por estes órgãos não-governamentais, foram escolhidas matérias-primas de origem vegetal e seleção de tensoativos permitidos para serem utilizados em produtos veganos. A manteiga de cupuaçu e o óleo de buriti utilizados (cedidas pela empresa Amazon Oil®) constituem-se em materiais vegetais liberados para uso vegano. Os tensoativos selecionados foram a lecitina de soja (Lipoid S45®) e o decil poliglucosídeo (Plantaren 2000®), obtido de fontes renováveis e representando alternativa ao comumente usado monooleato de sorbitano etoxilado 80 (Tween 80®). Como solventes foram escolhidos o acetato de etila e a água. O ativo selecionado para este estudo foi o resveratrol, antioxidante geralmente encontrado na casca da uva, dada sua origem natural e sua lipofilicidade (Log P 3,14) compatível com os materiais lipídios que constituem a formulação em desenvolvimento neste trabalho.

4.3.1.2 Teste de miscibilidade dos componentes

O teste foi realizado para verificar a miscibilidade dos componentes sem a adição de um solvente orgânico. Foram utilizados três tubos de ensaio (20 mL) onde em cada foi adicionado quantidades diferentes de produtos planejados para a fase orgânica (FO), exceto manteiga de cupuaçu, mantendo as proporções da fase aquosa (FA) (Tabela 3). Primeiramente os componentes da FO - óleo de buriti ou açai, lecitina de soja, cetil fosfato de potássio - foram pesados e levados ao vórtex por dois minutos. Posteriormente a FA foi vertida sobre FO e novamente levados ao vórtex por 8 minutos. Ao final, a formulação que apresentou uma melhor miscibilidade e menor separação das fases foi selecionada para o preparo da formulação do estudo.

Tabela 3. Composição quantitativa dos componentes para o teste de solubilidade.

Componentes	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Óleo de vegetal de açaí	0,2 g	0,15 g	0,1 g
Lecitina de soja (Lipoid S45®)	0,2 g	0,15 g	0,1 g
Cetil fosfato de potássio (Amphisol K®)	0,05 g	0,0375 g	0,02 g
Decil poliglucosídeo (Plantaren 2000®)	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Água ultrapura (MilliQ®)	20 mL	20 mL	20 mL

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

4.4 Desenvolvimento de nanopartícula lipídica vegana por diferentes métodos de preparação

Para a preparação da nanopartícula lipídica vegana foram empregados dois métodos de preparação, adaptando-os à necessidade dos componentes escolhidos, visando a formação de um carreador nanoestruturado para veicular o ativo antioxidante (resveratrol). Posteriormente, foi escolhido o método mais adequado para a formulação, levando em consideração as características físico-químicas do nanossistema obtido. Foram preparadas formulações contendo ou não resveratrol (NV-R e NV-B, respectivamente), sendo estas últimas utilizadas como controle.

4.4.1 Desenvolvimento de nanopartícula lipídica vegana pelo método de fusão sem adição de solvente orgânico

Para a preparação de nanopartículas lipídicas vegana foi empregado o método de fusão, desenvolvido a partir da adaptação da técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado, descrita por Fessi e colaboradores (1988). Os componentes oleosos - manteiga de cupuaçu, óleo de buriti, Lipoid S45® e Amphisol K® - foram aquecidos/fundidos em banho-maria a 40°C e homogeneizados em Ultra-turrax a 8.000 rpm por 2 minutos, mantendo-se aquecimento sem utilização de solvente orgânico. A fase aquosa - Plantaren 2000® e água - foi vertida ainda sob cisalhamento sobre a fase oleosa e homogeneizada por 8 minutos. A mistura foi

levada ao ultrassom com aquecimento durante 15 minutos e por fim, submetida ao banho de gelo por 1 hora, para que ocorresse a precipitação das nanopartículas por resfriamento.

4.4.2 Desenvolvimento da nanopartícula lipídica vegana contendo resveratrol pelo método de emulsificação-difusão

Para a preparação da nanopartícula lipídica vegana foi empregado o método de emulsificação-difusão descrito por Quintanar-Guerrero e colaboradores (1998) utilizando solventes imiscíveis. Foram utilizados água e acetato de etila previamente saturados um no outro (contato por 10 minutos para entrarem em equilíbrio). Os componentes da fase orgânica - manteiga de cupuaçu, óleo de buriti, Lipoid S45® e resveratrol - foram pesados e solubilizados no acetato de etila saturado e o componente da fase aquosa - Plantaren 2000® - foi pesado e solubilizado em água ultrapura saturada (Tabela 4). Ambas as fases foram preparadas em banho-maria a 50°C em agitação magnética por 1 hora. Posteriormente a fase orgânica foi vertida na fase aquosa e a mistura foi mantida em homogeneizador Ultra-turrax a 9.000 rpm por 7 minutos. Após o cisalhamento, a mistura foi transferida para agitador em hélice, sendo mantida por 7 minutos a 300 rpm, com adição de um excesso de água (200 mL) para que ocorra a “fuga” do solvente orgânico e a formação do nanossistema. Ao final a suspensão formada foi levada ao evaporador rotatório para a remoção do solvente orgânico e do excesso de água, resultando em uma formulação com volume final de 10 mL. Além disso, foi preparada uma formulação sem a adição de resveratrol (NV-B), seguindo o mesmo processo descrito.

Tabela 4. Composição quantitativa do NV-B e NV-R.

Componentes	NV-B	NV-R
Manteiga de cupuaçu	0,3 g	0,3 g
Óleo de buriti	0,2 g	0,2 g

Continua.

Conclusão.

Resveratrol	-	0,01 g
Lecitina de soja (Lipoid S45®)	0,4 g	0,4 g
Acetato de etila saturado	20 mL	20 mL
Decil poliglucosideo (Plantaren 2000®)	0,6 g	0,6 g
Água ultrapura (MilliQ®) saturada	40 mL	40 mL
Água ultrapura (MilliQ®)	200 mL	200 mL

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

4.5 Caracterização físico-química da Nanopartícula Lipídica Vegana contendo Resveratrol

4.5.1 Determinação do diâmetro da partícula

A avaliação do tamanho de partícula foi realizada através da técnica de difratometria de laser, a qual faz o uso do equipamento Mastersizer® 2000 (Malvern Instruments). Os dados obtidos pela difração de laser foram avaliados utilizando o diâmetro médio, que baseia-se no volume da partícula, e os valores da distribuição de 10% (d10%), 50% (d50%) e 90% (d90%), que indicam a porcentagem de partículas de diâmetro igual ou inferior ao valor indicado. Para avaliar a polidispersão do sistema, foi utilizado o valor de Span, determinado pela equação 1.

$$Span = \frac{(D_{0,9} - D_{0,1})}{D_{0,5}} \quad (\text{eq. 1})$$

4.5.2 Determinação de pH

O pH da nanopartícula lipídica vegana foi determinado utilizando potenciômetro Hanna® previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

4.5.3 Determinação do Potencial Zeta

A carga superficial das nanopartículas (Potencial Zeta) foi determinada por mobilidade eletroforética utilizando equipamento Nanobrook® 90 plus Zeta - Brookhaven Instruments. Este método determina o potencial elétrico na fronteira da partícula, podendo ser um indicativo das características de estabilidade física das formulações. A determinação foi realizada após a diluição de 1000 vezes (v/v) das suspensões de nanopartículas lipídicas veganas em solução aquosa de NaCl 0,1 mmol/L⁻¹. Os resultados foram obtidos pela média das triplicatas determinadas pelo equipamento.

4.5.4 Doseamento e eficiência de encapsulação do resveratrol nas nanopartículas lipídicas veganas

As nanopartículas veganas foram avaliadas quanto ao teor de resveratrol e eficiência de encapsulação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para avaliação do teor, as formulações foram tratadas com DMSO e acetonitrila, o qual é capaz de ocasionar a desorganização da nanopartícula (dissolução parcial do lipídio) e levadas ao ultrassom por 15 minutos em aquecimento, sendo retirada uma alíquota, filtrada em membrana 0,45 µm e avaliada por CLAE. A eficiência de encapsulação (EE%), por sua vez, foi determinada pelo método de ultrafiltração-centrifugação (Microcon®), onde quantifica-se o ativo na parte aquosa da formulação (quantidade não encapsulada). Calcula-se então a diferença entre a concentração total na formulação (teor) e a concentração livre presente na fase aquosa, multiplicada por 100 para obter-se a porcentagem encapsulada do ativo.

4.6 Validação da metodologia analítica por CLAE para quantificação de resveratrol em nanopartículas lipídicas veganas

Para a quantificação de resveratrol contido nas nanopartículas veganas, foi considerada a RDC N° 166, de 24 Julho de 2017, que descreve sobre a validação de métodos analíticos e parâmetros a serem avaliados para obtenção de resultados confiáveis que possam auxiliar na caracterização de amostras (ANVISA, 2017). Além disso, foram consideradas as especificações, da International Conference on

Harmonization (ICH, 2023) e uma adaptação do método descrito por Linder e colaboradores (2013). As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Prominence (Shimadzu®), utilizando o detector ultravioleta em 307 nm, coluna de fase reversa C-18 (Waters®, 150 x 4,6 mm, 150 mm, 5 µm), ligada a uma pré-coluna (C18 4 x 3,0 mm), e fase móvel constituída de metanol (51%) e água ultrapura (49%), em sistema isocrático a um fluxo de 1 mL por minuto e volume de injeção de 10 µL. Para a validação foram preparadas soluções de resveratrol e foram utilizadas as formulações NV-R e NV-B, que tem sua composição descrita em tabela já apresentada (Tabela 2). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

4.6.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade foram preparadas soluções em diferentes concentrações a partir de uma solução padrão preparada com 0,01 g de resveratrol em 10 mL de acetonitrila, para obtenção de um concentração final de 1 mg/mL, sendo a mesma concentração de RES presente na NV-R. A linearidade foi obtida pela construção de três curvas contendo sete concentrações diferentes, seguindo as exigências da RDC nº 166 (ANVISA, 2017). As soluções foram preparadas em concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 17,5 µg/mL, a partir da solução padrão (solução-mãe) e previamente filtradas utilizando uma membrana de 0,45 µM (Millipore®) para serem avaliadas por CLAE. As curvas foram obtidas a partir da construção de gráficos de concentração versus área do pico, sendo a equação da reta determinada por regressão linear (y em x), pelo método dos mínimos quadrados.

4.6.2 Seletividade

Para avaliação da seletividade foram utilizadas amostras de NV-R e NV-B, onde a primeira continha resveratrol e a segunda não apresentava o ativo. Uma alíquota de 100 µL foi retirada das amostras e colocada em balão de 10 mL previamente identificado. Foi utilizado 1 mL de DMSO e, em seguida, acetonitrila para completar o volume dos balões, sendo levados ao banho de ultrassom por 15

minutos para que ocorresse o rompimento das nanopartículas lipídicas e a extração do resveratrol (no caso de NV-R). Alíquotas das duas amostras foram retiradas dos balões e filtradas em membrana de 0,45 μM sendo acondicionadas em vials para serem avaliadas por CLAE, de modo comparativo.

4.6.3 Precisão

Para determinar a precisão foram realizados ensaios de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). Na avaliação da repetibilidade foram usadas 6 (seis) amostras com a concentração intermediária da curva da linearidade (10 $\mu\text{g/mL}$). No primeiro dia de análise, as amostras foram preparadas utilizando 100 μL de NV-R adicionados em balões volumétricos de 10 mL previamente identificados para cada amostra ($n=6$), adicionando 1 mL de DMSO e completado o volume do balão com acetonitrila. As amostras foram levadas ao banho ultrassônico durante 15 minutos e filtradas com membrana de 0,45 μM , acondicionadas em vials, e avaliada por CLAE. O procedimento foi repetido no segundo dia de análise, com outras 6 amostras. Os valores foram expressos pela média e o desvio padrão relativo ao conteúdo de resveratrol em cada um dos ensaios, observando os valores de cada dia individual para avaliar a repetibilidade e os valores obtidos em dias distintos para avaliar a precisão intermediária.

4.6.4 Exatidão

Segundo os parâmetros descritos pela International Conference on Harmonization no guia para validação de método analítico (ICH, 2023, p 11), a exatidão pode ser inferida, no caso de haver precisão estabelecida.

4.6.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram avaliados a partir dos resultados obtidos das curvas de calibração feitas com a solução padrão de resveratrol (1 mg/mL), sendo calculadas pelas equações 2 e 3:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{a} \quad (\text{eq. 2})$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{a} \quad (\text{eq. 3})$$

Onde:

σ = Desvio padrão do intercepto do eixo y de três curvas de calibração

a = coeficiente angular da curva analítica

4.7 Avaliação da Permeação Cutânea *in vitro*

4.7.1 Avaliação da Condição *Sink*

A condição *sink* é avaliada para evitar a saturação do meio durante o ensaio de permeação. É descrito no Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Similares ou Novos como sendo, no mínimo, três vezes o volume de meio de dissolução necessário para obter uma solução saturada do ativo (ANVISA, 2018. p. 12). Para avaliar a solubilidade do resveratrol no meio de dissolução (permeação) proposto para este ensaio, o resveratrol foi adicionado em excesso no meio etanol:água (30:70) (1,5 mL, em eppendorf) e agitado no vórtex por 1 min. A mistura resultante foi mantida em repouso por 12 horas, protegido da luz devido a fotossensibilidade do resveratrol. Após esse período a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos e uma alíquota de 200 μ L do sobrenadante solubilizado foi retirada para análise em espectrofotômetro UV. Para viabilizar a avaliação do resveratrol no sobrenadante foi construída uma curva analítica utilizando 0,01 g em 10 mL de meio etanol:água (30:70) nas mesmas concentrações utilizadas para a avaliação da linearidade, sendo analisada no mesmo espectrofotômetro UV do restante do ensaio.

4.7.2 Avaliação da permeação *in vitro*

Para a avaliação da permeação cutânea *in vitro* das NV-R, os ensaios foram realizados em células de difusão de Franz utilizando membrana sintética (acetato de celulose) (12.000-14.000 Da) (Sigma Aldrich®). O meio escolhido foi adaptado de Davies e colaboradores (2021). Inicialmente, a membrana foi hidratada em água destilada por 12 horas e recortada de modo a manter-se sobre o compartimento

receptor da célula, já preenchida com o meio. No compartimento doador, sobre a membrana, foram adicionados 400 μ L de NV-R ou 400 μ L de solução de RES (1 mg/mL, preparada com solução etanólica (etanol:água 30:70, v/v). As células foram mantidas em banho maria a temperatura de 32°C e agitação magnética. As amostras NV-R e RES foram analisadas em triplicata. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas com o auxílio de um cateter intravenoso (Solidor®), nos tempos pré determinados de 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 8; 12 e 24 horas, sendo repostos o mesmo volume de meio repositivo que foi previamente preparado e mantido em banho-maria na mesma temperatura das amostras. Após serem coletadas, as alíquotas foram pipetadas em uma microplaca de leitura UV e avaliadas por espectrofotometria UV-visível no comprimento de onda de 307 nm.

Os valores foram expressos como concentração de RES em cada tempo de coleta e avaliados em termos de fluxo do ativo através da membrana de permeação, concentração de ativo acumulada na membrana e concentração do ativo detectada no meio de permeação (permeado).

4.8 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das nanopartículas lipídicas veganas contendo resveratrol

A avaliação da ação antioxidante das nanopartículas veganas foi realizada medindo a atividade contra peroxidação lipídica *in vitro* pelo método de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Species) descrito por Schaffazick e colaboradores (2005), utilizando lipossomas como substrato da reação de lipoperoxidação. Nos ensaios descritos a seguir, as análises por espectrofotometria foram adaptadas para a utilização de nanopartículas, uma vez que as mesmas apresentam-se como suspensões (opacas) que causam espalhamento de luz. Cada alíquota analisada contou com um controle de nanopartículas na mesma concentração que a utilizada no meio reacional.

4.8.1 Preparação dos lipossomas pelo método de injeção de etanol

Os lipossomas foram preparados pelo método de injeção de etanol (adaptado) descrito por Fessi e colaboradores (2010). Para a preparação, lecitina de soja (Lipoid® S-75, 1 g) foi dissolvida em etanol (80 mL) à 40°C em banho-maria, sob agitação magnética, constituindo a fase orgânica. Após a preparação, a fase orgânica foi vertida sob a fase aquosa (água ultrapura MilliQ®, 20 mL) sob agitação magnética, com o auxílio de um funil estreito. Foi mantido em descanso por 10 minutos e levado ao evaporador rotatório (40°C) para retirada do solvente orgânico.

4.8.2 Avaliação contra a peroxidação lipídica

As nanopartículas veganas contendo resveratrol (NV-R) nas concentrações de 70, 140, 210 e 290 µM foram avaliadas quanto ao potencial de evitar a peroxidação lipídica. Além da NV-R, foram consideradas de modo comparativo as nanopartículas sem o ativo (NV-B), resveratrol livre (RES) e um antioxidante padrão (butilhidroxitolueno - BHT). A solução de RES (1 mg/mL) foi preparada em solução etanólica (etanol:água 30:70, v/v), enquanto a solução de BHT (1 mg/mL) foi preparada em etanol, ambas mantendo concentração semelhante a do resveratrol presente nas nanopartículas. As amostras de nanopartículas NV-B e NV-R foram utilizadas de modo semelhante (em volume) durante todo o ensaio.

O meio reacional foi composto pelo substrato de peroxidação (35 µL de lipossoma em 25 µL de tampão HCl-Tris 0,1M) sendo adicionadas alíquotas das amostras antioxidantes (NV-R, NV-B, RES e BHT). A reação de peroxidação foi iniciada pela adição de 250 µM de sulfato de ferro II (FeSO₄) e 500 µM de ácido ascórbico e levadas ao banho-maria a 37°C por 60 minutos. Após o tempo determinado na primeira etapa de incubação, foram adicionadas soluções de ácido tricloroacético a 10% e ácido tiobarbitúrico a 0,8%, sendo incubados novamente a 100 °C durante 30 minutos. Um controle positivo, sem a presença dos antioxidantes (amostra totalmente oxidada) e um controle negativo, sem a presença dos agentes oxidantes sendo apenas o meio reacional, também foram preparados e submetidos às mesmas condições experimentais. Após os períodos de incubação, as amostras foram resfriadas e centrifugadas (10.000 rpm, 10 minutos) e uma alíquota do

sobrenadante foi retirada para análise por espectrofotometria (leitor de microplacas SpectraMax® M Series) em 535 nm.

As análises foram realizadas em duplicata. Uma curva analítica de malondialdeído (MDA) foi preparada, com concentrações entre 0,5 e 3,0 nm de MDA, para calcular a concentração de MDA (nmol) das amostras. O percentual da atividade antioxidante foi calculado a partir da Equação 4, de acordo com Kùlkamp e colaboradores (2011), onde $C_{amostra}$ é a concentração de MDA em nmol presente nas amostras dos antioxidantes e a $C_{controle}$ é a concentração de MDA em nmol presente na amostra oxidada (controle positivo).

$$AA\% = \frac{C_{amostra}}{C_{controle}} \times 100 \quad (\text{eq. 4})$$

4.9 Preparação e caracterização de base semissólida contendo nanopartículas lipídicas veganas de resveratrol

4.9.1 Preparação de base semissólida contendo nanopartículas lipídicas veganas de resveratrol

Para a preparação do gel base foi utilizado o polímero sintético Aristoflex® AVC (co-polímero do ácido sulfônico acriloldimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado), de característica aniônica, ou Natrosol® (hidroxietilcelulose) com característica não-iônica. Para escolha da concentração dos polímeros a ser utilizada para o preparo do gel base foram preparadas quatro diferentes formulações contendo 1%; 1,5% e 2%, para Aristoflex® e 1%, 1,5%, 2% e 2,5% para hidroxietilcelulose, como demonstrado na Tabela 5. Em todas as formulações, foi utilizado o conservante benzoato de sódio. Todos os componentes planejados para obtenção de gel base obedeceram os preceitos dos cosméticos veganos. Além de diferentes concentrações de polímeros, foram testados dois métodos de preparo distintos, empregando refrigeração ou aquecimento.

Para o preparo pelo método de refrigeração, o polímero foi pesado em um vidro de relógio e adicionado em gral de porcelana; o conservante foi pesado e

misturado na quantidade de água suficiente para a formulação, sendo esta solução adicionada sobre o polímero, sem misturar, e levada à refrigeração por 2 horas, realizando após esse tempo a homogeneização completa dos componentes. No preparo pelo método de aquecimento, a mistura de água e conservante foi levada ao banho-maria (80°C) e o polímero foi polvilhado aos poucos, homogeneizando a mistura delicadamente até a formação do gel. Em ambos os métodos, foi utilizado um emoliente vegetal - Olivem® 300 (óleo de oliva PEG-7-esters) - para obtenção de um gel com adequado sensorial, suave e transparente. Os métodos foram utilizados de maneira semelhante para as formulações utilizando Aristoflex® ou hidroxietilcelulose.

Tabela 5. Composição quali-quantitativa dos componentes do gel base em diferentes concentrações para seleção da formulação

Componente	%			
Aristoflex® AVC	0,5	1	1,2	1,5
Hidroxietilcelulose	1	1,5	2	2,5
Benzoato de Sódio	0,2	0,2	0,2	0,2
Água qsp	100	100	100	100
Olivem 300 qsp	-	-	-	-

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

A partir das escolhas, uma formulação base foi preparada para a adição dos ativos RES, NV-R e NV-B, um gel base sem ativos também foi separado para a comparação. Os géis foram preparados na composição demonstrada pela tabela 6, para o gel contendo nanopartículas contendo ou não resveratrol (GNVR e GNVB, respectivamente) foram adicionadas e homogeneizadas com cuidado para manter as características suaves do gel escolhido, enquanto para a preparação do gel de resveratrol (GR), o resveratrol foi pesado e levado em uma mistura de água e tensoativo, formando uma pasta, para ser adicionada ao gel-base. Uma formulação neutra (GN) foi preparada, sem conter ativo livre ou nanopartículas para a comparação com os outros.

Tabela 6. Composição quantitativa dos componentes da formulação do gel antioxidante contendo nanopartículas lipídicas vegana de resveratrol.

Componente	GNVR	GNVB	GNVR	GN
NV-R	0,8 mL	-	-	
NV-B	-	0,8 mL	-	
RES	-	-	0,2 g	
Plantaren 2000	-	-	0,1 g	
Água	-	-	0,8 mL	
Gel base	qsp 20	qsp 20	qsp 20	qsp 20

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

4.9.2 Caracterização da base semissólida contendo nanopartículas lipídicas veganas de resveratrol

As bases semissólidas contendo nanopartículas foram avaliadas por difratometria de laser, de acordo com a técnica descrita no item 4.5.1. A avaliação do pH foi realizada utilizando potenciômetro Hanna, como descrito no item 4.5.2. A viscosidade dos géis foi avaliada utilizando viscosímetro rotacional DV-III+ Pro (Brookfield) com *spindle* SC4-27. As velocidades de rotação do *spindle* foram selecionadas respeitando os limites de torques (superiores a 10% e inferiores a 100%). Foram avaliadas formulações preparadas por ambos os métodos - aquecimento (Q) ou resfriamento (F) - incluindo géis base (neutros) (GN-Q/F), géis contendo o resveratrol livre (GR-Q/F) e géis contendo as nanopartículas com ou sem o ativo (GVNR-Q/F e GNVB-Q/F, respectivamente).

As curvas de fluxo e de viscosidade foram obtidas a partir da determinação da tensão de cisalhamento e da viscosidade em função da taxa de cisalhamento, respectivamente. O ajuste foi realizado utilizando o software Rheocalc V3.2 (Brookfield®) para o modelo Ostwald-de-Waele (ou de Lei das Potências) (Equação 5), Casson (Equação 6), e Plástico de Bingham (Equação 7).

$$\eta = k \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (\text{eq. 5})$$

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{eq. 6})$$

$$\tau^{0,5} = k_0 + k(\dot{\gamma})^{0,5} \quad (\text{eq. 7})$$

Onde n é o índice de escoamento, k é o índice de consistência, k_0 é a constante do modelo, η a viscosidade (Pa.s), $\dot{\gamma}$ taxa de deformação (1/s) e τ a tensão de cisalhamento.

4.10 Análise estatística

Para a análise dos dados estatísticos foi utilizado o software GraphPad Prism 8, utilizando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias considerando $p < 0,05$ como valor significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação das nanopartículas lipídicas veganas por dois métodos de preparação e avaliação do diâmetro médio como parâmetro de escolha

A adaptação do método de deposição interfacial de polímero pré-formado (Fessi *et al*, 1988) foi o ponto inicial para o desenvolvimento das NV, sendo planejada uma formulação inicial (chamada de formulação zero) realizando pequenas alterações nesta formulação ou em parâmetros relacionados ao método de preparação (Quadro 1), visando obter uma formulação adequada para veiculação de resveratrol para aplicação cutânea. Muitas formulações obtidas apresentavam características não desejadas como pode-se observar na figura 4, principalmente devido a separação das fases. Em algumas situações era possível obter uma formulação homogênea por poucos minutos, logo surgindo pequenas gotículas de óleo, representando instabilidade do sistema. Assim, as modificações foram fazendo-se necessárias para obtenção de uma suspensão de nanopartículas homogênea e com aspectos característicos de formulações coloidais obtidas por nanoprecipitação (Nascimento, 2023).

Quadro 1. Modificações realizadas na formulação/método zero e características organolépticas e/ou físico químicas das formulações lipídicas veganas obtidas pelo método da fusão sem solvente.

Formulação	Modificação	Resultado
nº 1	Formulação inicial, sem modificações	Separação de fases; hipótese: quantidade insuficiente de tensoativo
nº 2	Aumento da quantidade de tensoativo da fase oleosa: 0,077 g de lecitina para 0,2 g.	Separação de fases; hipótese: quantidade insuficiente de tensoativo.
nº 3	Aumento da quantidade de tensoativo de ambas fases - FO: 0,2 g para 0,3 g de lecitina; FA: 0,077 g para 0,3 g de Plantaren.	Separação de fases; hipóteses: quantidade insuficiente de tensoativo; incompatibilidade da manteiga com o óleo vegetal.
nº 4	Aumento na quantidade de tensoativo da FO de 0,3 para 0,4 de lecitina e diminuição da FA de 0,3 g para 0,2 g de Plantaren.	Separação de fases; hipóteses: quantidade insuficiente de tensoativo, dado o aparecimento de gotículas de gordura durante a homogeneização.
nº 5	Diminuição da quantidade de óleo (0,5 g para 0,3 g) e aumento da quantidade de manteiga (0,5 g para 0,7 g) tentativa de empregar etanol.	Gotículas lipídicas visíveis na suspensão; hipóteses: quantidade insuficiente de tensoativo; etanol não auxiliou na estabilização dos componentes oleosos.

Continua.

Continuação

nº 6	Substituição da manteiga de cupuaçu pela manteiga de tucumã.	Nenhum dos componentes obteve uma boa fusão; pode-se observar que a manteiga de tucumã não foi compatível com os componentes da formulação inicial.
nº 7	Utilização de quantidades iguais dos lipídios empregados (0,5 g manteiga de cupuaçu e 0,5 g de óleo de açaí)	Formulação mostrou-se estável por pouco tempo, observando-se em seguida separação de fases. Presença de uma população nanométrica na avaliação por difratometria de laser.
nº 8	Aumento no tempo de ultrassom em aquecimento de 15 minutos por 30 minutos com menor quantidade de óleo (0,5 g para 0,2 g)	Formulação homogênea, porém instável. A leitura por difratometria de laser demonstrou presença de uma população nanométrica e outra micrométrica (em maior número)
nº 9	Adição de Amphisol K a 1%, como co-emulsionante	Formulação manteve-se homogênea por maior tempo; população micrométrica em número consideravelmente maior que a nanométrica
nº 10	Aumento no tempo de cisalhamento ultra-turrax) de 5 para 6 min.	Formulação macroscopicamente homogênea; polidispersão (Span) com menor valor, mas ainda demonstrava população micrométrica superior em volume

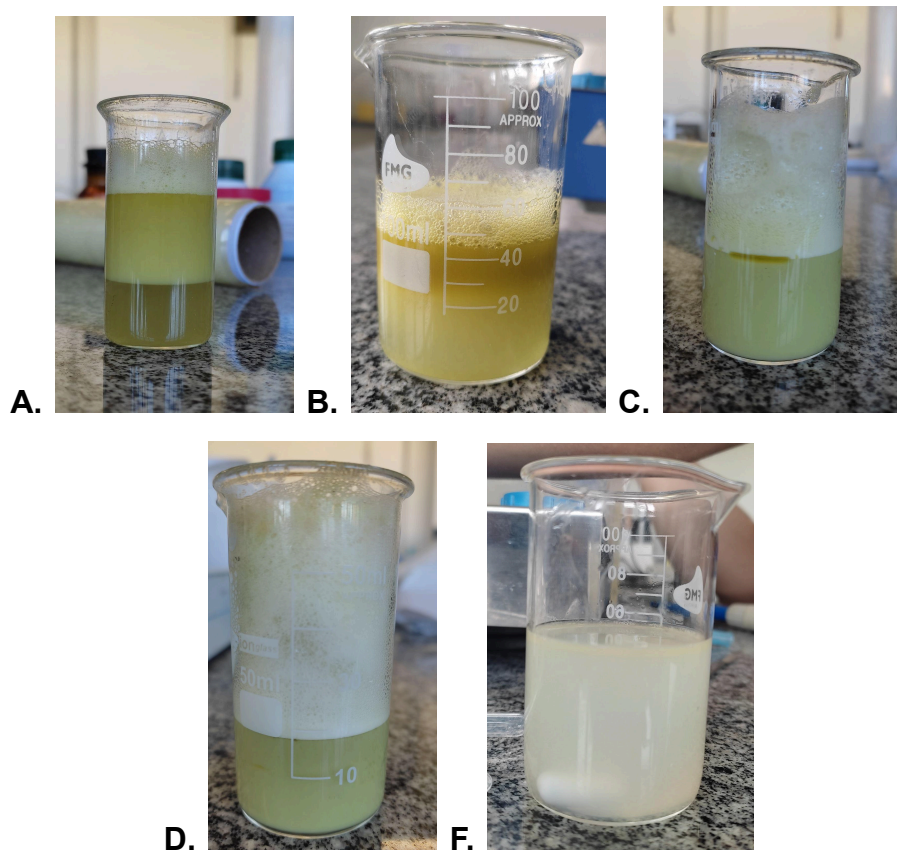
Continua.

Conclusão.

nº 11	Sem adição de óleo vegetal na formulação	Separação instantânea das fases.
nº 12	Sem adição de manteiga na formulação	Menor polidispersão (SPAN), ocorrência de desestabilização
nº 13	Aumento no tempo do banho de gelo de 30 para 60 minutos	Considerável redução da polidispersão, formulação instável, posterior aparecimento de gotículas lipídicas.
nº 14	Substituição dos agentes tensoativos: Plantaren 2000 por Olivem.	Formulação instável, separação instantânea das fases.
nº 15	Troca do óleo de açaí por óleo de buriti.	Formulação homogênea, porém com o aparecimento de gotículas lipídicas.
nº 16	Aumento do óleo (0,2 g para 0,6 g) e diminuição da manteiga (0,7 g para 0,4 g).	Formulação homogênea, sem gotículas lipídicas visíveis, pouco estável.
nº 17	Troca do óleo de açaí pelo óleo de buriti. Empregando os valores de 0,9 para a manteiga e 0,3 para o óleo.	Formulação homogênea, sem gotículas lipídicas visíveis; polidispersão não adequada, considerável população micrométrica

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

Figura 4. Demonstração de algumas das diferentes formulações preparadas para o desenvolvimento das nanopartículas lipídicas veganas. (A) Formulação nº1; (B) Formulação nº4; (C) Formulação nº 5 (D) Formulação nº 13; (F) Formulação nº 14

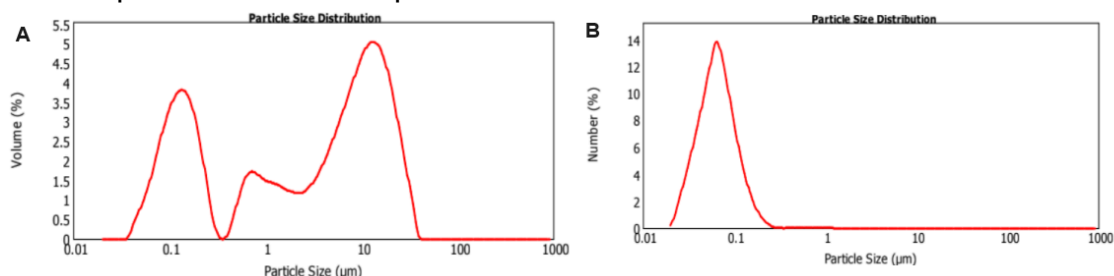


Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

Todavia a avaliação do diâmetro de partícula foi o parâmetro determinante para a escolha da formulação mais adequada. Algumas formulações não obtiveram resultados satisfatórios quando submetidas à avaliação por difração a laser baseada no volume de partículas, com distribuição bimodal (população nanométrica e micrométrica). Porém, quando a análise foi baseada no número de partículas foi possível observar uma distribuição unimodal nanométrica, indicando que a população micrométrica estava em um número bastante reduzido (insignificante em relação à população nanométrica) (Figura 5). Considerando o caráter inovador do método empregado, os resultados mostram que é válido considerá-lo como promissor para o desenvolvimento de futuras formulações de nanopartículas com um viés mais limpo, sem a utilização de solventes orgânicos, que podem ser nocivos à saúde. Contudo, a técnica pode exigir modificações visando utilizá-la de acordo

com os componentes presentes na formulação, de modo a obter tamanho e polidispersão adequados.

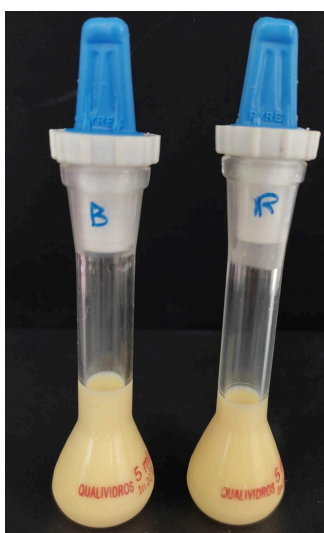
Figura 5. Distribuição granulométrica baseada no (A) volume e (B) número de partículas para NV-B obtidas pelo método de fusão.



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

As nanopartículas preparadas pelo método de emulsificação-difusão adaptadas do método descrito por Quintanar-Guerrero e colaboradores (1998) obtiveram resultados satisfatórios quanto às suas características organolépticas. Na Figura 6 pode-se observar uma formação homogênea, de aspecto leitoso e cor amarelo claro, proveniente da mistura da manteiga de cupuaçu e do óleo de buriti.

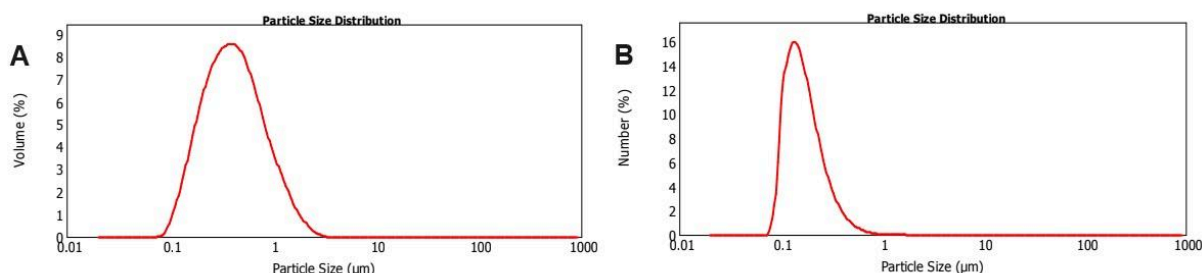
Figura 6. Nanopartículas lipídicas veganas NV-B (sem ativo) e NV-R (contendo resveratrol), respectivamente.



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

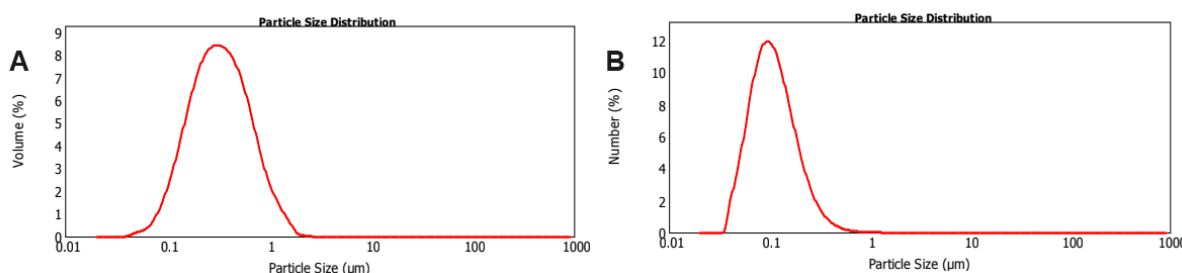
Nas Figuras 7 e 8 e Tabela 7 pode-se observar a distribuição granulométrica apresentada pelas NV-B e NV-R preparadas por emulsificação difusão, as quais demonstram uma característica monomodal nanométrica.

Figura 7. Distribuição granulométrica baseada no (A) volume e (B) número de partículas lipídicas para NV-B obtidas pelo método de emulsificação-difusão



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

Figura 8. Distribuição granulométrica baseada no (A) volume e (C) número de partículas lipídicas para NV-R obtidas pelo método de emulsificação-difusão.



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

Tabela 7. Distribuição granulométrica das nanopartículas obtida pela técnica de difração a laser baseado no número de partículas, onde (") representa as nanopartículas lipídicas veganas obtidas pela técnica de fusão e (*) representas as nanopartículas lipídicas veganas obtidas pela técnica de emulsificação-difusão (os valores representam a média \pm desvio padrão de dois lotes para NV-B e NV-R).

Amostra	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[4,3] (nm)	Span
NV-B"	35,5 \pm 0,5	64,5 \pm 0,5	118,5 \pm 0,5	338,5 \pm 15,5	1.292,5 \pm 2,5
NV-B*	104,5 \pm 0,5	157,5 \pm 0,5	293,5 \pm 1,5	468 \pm 28	1.200,5 \pm 4,5
NV-R*	53 \pm 5	100,5 \pm 3,5	209,5 \pm 4,5	404 \pm 5	1.469 \pm 31,5

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024.

Dutta e colaboradores (2024) avaliaram a preparação de uma NLS, e constataram que a concentração de lipídio e de tensoativo pode influenciar no

tamanho de partícula, onde uma maior concentração de lipídios levou a um aumento no tamanho de partículas, entretanto uma baixa concentração de tensoativos levou a uma suspensão instável. O diâmetro médio de partículas das suspensões de NV ficaram de acordo com o encontrado na literatura. Onugwu e colaboradores (2022) obtiveram valores variados em relação ao tamanho de partículas entre 142 a 328 nm, demonstrando que uma maior concentração de tensoativo foi capaz de diminuir o diâmetro das partículas.

5.2 Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas veganas contendo resveratrol: Determinação do potencial zeta, avaliação do pH, teor e eficiência de encapsulação

O potencial zeta é considerado a carga superficial das partículas, sendo indiretamente uma medida de estabilidade, considerando que os valores de ± 30 mV apresentam uma boa estabilidade física. O potencial elétrico das partículas é medido através dos íons presente na solução onde as nanopartículas são colocadas, sendo as correntes elétricas formadas entre as cargas medidas através de eletrodos (Raval *et al*, 2023). Ao serem avaliadas por seu potencial elétrico, as NV demonstram carga negativa (Tabela 9). Segundo Souza e colaboradores (2023) os valores negativos do potencial elétrico podem estar associados a presença de lipídios líquidos que são compostos por grupos funcionais ácidos. O estudo de Kumar e colaboradores (2018) demonstram valores de potencial zeta entre - 56 mV a - 21 mV, corroborando com os dados apresentados neste estudo.

Outro fator que influencia na estabilidade das formulações é o pH, sendo um parâmetro importante em partículas destinadas à aplicação biológica. Considerando a aplicação cutânea, o pH normal de uma pele saudável está entre 4,0 e 6,5, considerado assim ligeiramente ácido (Mansur, 2020), portanto as formulações de uso tópico devem estar dentro da faixa aceitável para evitar danos causados por excessiva acidez ou alcalinidade, os quais alteram o pH normal da pele (Araujo, 2022). Na tabela 8, pode-se observar que os valores de pH das formulações de NV-B e NV-R apresentaram-se adequados, considerando a finalidade de aplicação por via tópica.

O teor e a eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas (tabela 8) foram avaliadas por CLAE, demonstrando uma capacidade de encapsulação próxima a 100%. Foudah e colaboradores (2024) avaliam que a presença de lipídios sólidos e líquidos beneficiam a EE%, devido a capacidade de aprisionar os ativos. Em outro estudo, Chantaburanan (2023) demonstrou que o ibuprofeno ficou quase inteiramente aprisionado nas SNL, corroborando com o presente estudo onde o resveratrol teve um teor de 96,89% nas suspensões de NV com desvio padrão de $\pm 0,14$.

Tabela 8. Valores obtidos através da avaliação de potencial elétrico (zeta), pH das partículas NV-B e NVR, e valores obtidos da determinação do teor e da eficiência de encapsulação das partículas NV-R (os valores representam a média \pm desvio padrão de dois lotes para NV-B e NV-R).

Amostra	Potencial Zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)	EE (%)
NV-B	-47,46 \pm 1,39	5,06 \pm 0,012	-	-
NV-R	-46,52 \pm 1,18	5,25 \pm 0,016	96,89 \pm 0,14	99,65 \pm 0,05

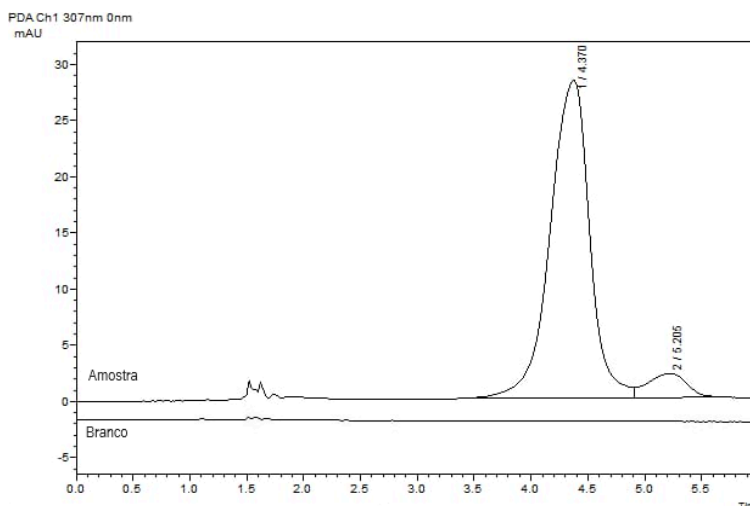
Fonte: Desenvolvida pelo próprio autor, 2024.

5.3 Validação da metodologia analítica por CLAE para quantificação de nanopartículas lipídicas veganas contendo resveratrol

5.3.1 Seletividade

Segundo a RDC nº 166/2017, a seletividade do método deve ser demonstrada por meio da capacidade de identificação ou quantificação do analito de interesse, de forma evidente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (ANVISA, 2017). A Figura 9, demonstra os cromatogramas apresentados pelas NV, onde o pico atribuído ao resveratrol aparece em 4 minutos na NV-R, estando ausente no cromatograma da NV-B, não sendo detectada a presença de interferentes. Sendo assim, o método analítico apresentou-se seletivo para a análise do resveratrol nas NV, estando de acordo com as normas exigidas pelos órgãos reguladores.

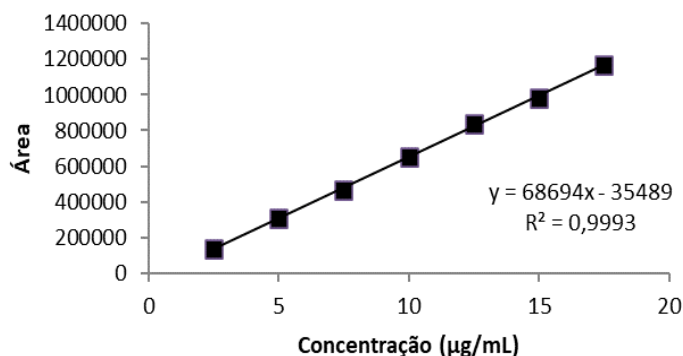
Figura 9. Cromatograma das NV-R na concentração de 10µg/mL (amostra) e das NV-B (branco).



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

5.3.2 Linearidade e limites de detecção e quantificação

A RDC nº 166/2017 descreve a linearidade de um método como a capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (ANVISA, 2017). Com isso, para esta análise foram preparadas três curvas de concentração do resveratrol em função da área do pico obtida por CLAE, utilizando uma solução padrão de resveratrol em acetonitrila, posteriormente diluída de modo a obter diferentes concentrações (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 17,5 µg/mL). A regressão linear da curva média de concentração de RES e suas respectivas áreas resultou na equação da reta $y = 68694x - 35489$ (Figura 10), apresentando coeficiente de correlação (r) de 0,9993, o qual atende à exigência da RDC nº 166, que determina que o valor de r seja superior a 0,990, demonstrando a linearidade do método entre as concentrações de 2,5 a 17,5 µg/mL.

Figura 10. Curva padrão para obtenção da equação da reta

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

Os dados da regressão linear foram avaliados por análise de variância (ANOVA) (Tabela 9), segundo a qual a regressão linear mostrou-se significativa ($P < 0,05$) e o desvio da linearidade mostrou-se não significativo, atendendo as exigências nacionais para validação de método analítico.

Tabela 9. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do RES através de CLAE

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Estatística F	Valor de P
Tratamento	2479190713897	6	413198452316	(6, 12) = 351,4	P<0,0001
Resíduo	14111532984	12	1175961082		
Total	2493302246881				

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir das equações descritas no item 4.3.5, sendo obtidos os valores de 0,42 µg/mL e de 1,27 µg/mL para LD e LQ, respectivamente.

5.3.3 Precisão Intermediária, repetibilidade e exatidão

No ensaio de repetibilidade foram avaliadas 6 amostras de NV-R na mesma concentração (10 µg/mL) por CLAE, em um único dia. Já na precisão intermediária foram analisadas 6 amostras de NV-R, por dois dias, de forma que obteve-se uma

precisão inter-dia entre as análises. Os resultados obtidos, demonstram que a precisão foi confirmada pela proximidade dos valores (Tabela 10), de modo que o método mostrou-se preciso e com repetibilidade adequada, uma vez que os valores de DPR foram menores que 5% como previamente estabelecido pela ANVISA (Brasil, 2017).

Tabela 10. Valores de precisão para ensaio de repetibilidade (intra-dia) e de precisão intermediária (inter-dia) para a quantificação de RES nas nanopartículas lipídicas por CLAE (os valores representam a média \pm desvio padrão). Não houve diferença significativa entre os valores obtidos entre os diferentes dias.

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	Média (%) \pm DP (intra-dia)
Dia 1	9,20	92,09	99,58 \pm 4,92
	9,89	98,90	
	10,46	104,64	
	9,49	94,96	
	10,10	101,03	
	10,58	105,87	
Dia 2	9,98	99,81	97,52 \pm 2,32
	9,27	92,74	
	9,91	99,18	
	9,76	97,67	
	9,71	97,11	
Média (%) \pm DP (inter-dia)			98,55 \pm 3,98

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

De acordo com o ICH (2023) a exatidão pode ser inferida quando a precisão, seletividade e linearidade são estabelecidas. A RDC nº 166/2017 descreve a

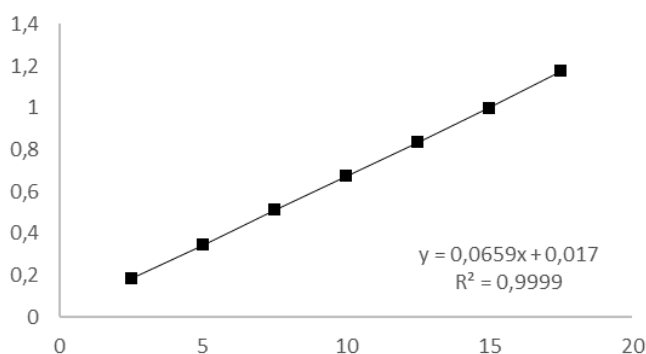
exatidão como estabelecida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em relação aos valores aceitos como verdadeiros (Brasil, 2017). Sendo assim, ao considerarmos os parâmetros descritos, temos que o método é exato para a quantificação de RES nas NV, considerando os valores obtidos pela precisão (n= 12) os valores reais apresentaram-se entre 92,10% e 105,88%, ou seja, próximos a 100%.

5.4 Avaliação da permeação *in vitro* das nanopartículas

A avaliação da permeação cutânea é uma análise importante para verificar a capacidade de penetração de ativos presente nas formulações cosméticas (Pulsoni *et al.*, 2022). Neste estudo, o ensaio de permeação foi precedido pela avaliação da condição *sink*. Para isso foi preparada uma curva analítica utilizando o meio de permeação etanol:água (30:70), a qual resultou na equação da reta $y = 0,0659x + 0,017$ ($r > 0,9999$) quando empregada regressão linear (Figura 11). A curva foi utilizada para quantificar o RES na avaliação da condição *sink* e no ensaio de permeação. Como resultado, a concentração de saturação de resveratrol no meio etanol:água (30:70) foi de 4,49 mg/mL.

Considerando as condições experimentais do ensaio de permeação - quantidade de resveratrol presente no compartimento doador da célula de Franz (0,066 mg) e volume de meio no compartimento receptor (6 mL) - a concentração máxima teórica que poderia ser alcançada em um alíquota do ensaio de permeação seria de 0,066 mg/mL (68 vezes menor que a concentração de saturação), o que garante com elevada margem de segurança a manutenção da condição *sink* durante todo o ensaio. Como visto anteriormente, a ANVISA (2018) determina para a manutenção desta condição é necessário no mínimo três vezes o volume de meio de dissolução necessário para obter uma solução saturada do ativo, ou seja, o ativo deve estar em concentração três vezes menor, pelo menos, que sua concentração de saturação no meio. Dessa forma pode-se afirmar que o meio de liberação escolhido para o ensaio é adequado para a avaliação da permeação cutânea *in vitro* do resveratrol.

Figura 11. Curva padrão utilizando o meio de permeação para obtenção da equação da reta.



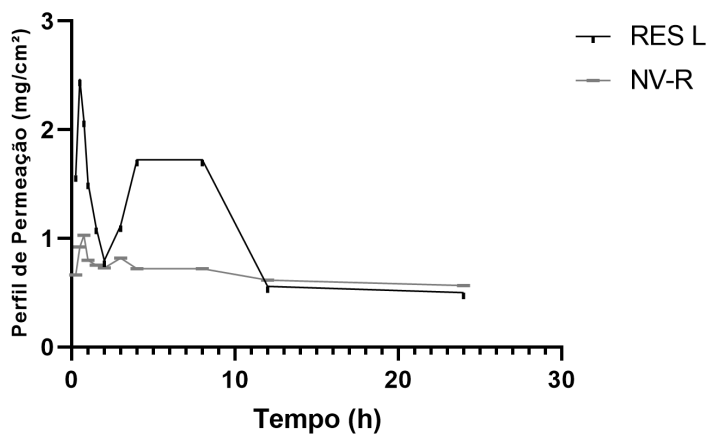
Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

Considerando o objetivo de produzir uma nanopartícula vegana, os ensaios para caracterizá-la deveriam seguir as especificações das instituições certificadoras de produtos veganos. Assim, não sendo possível utilizar insumos provenientes de origem animal para a avaliação da permeação das NV, foi eleita uma membrana de acetato de celulose que, embora não seja uma membrana biológica, apresenta características semelhantes em relação a resistência à permeabilidade (Kirk, 2022). Por outro ponto de vista, Haq e colaboradores (2018) avaliaram a pele humana em relação a membranas sintéticas (Strat-M™ e acetato de celulose) utilizando diferentes fármacos e demonstraram que a limitação do acetato de celulose é o tamanho de seus poros em comparação à pele, os quais podem indicar uma maior permeabilidade em relação a membranas naturais.

No presente estudo, o perfil de permeação baseado no fluxo de RES através da membrana (Figura 12), demonstra que NV-R apresentaram menor fluxo de permeação em relação ao ativo livre, apresentando uma diferença significativa ($P < 0,0001$). Este resultado deve ser observado conjuntamente com a concentração de ativo recuperada na membrana ou quantificada no meio de permeação (Figura 13). Os resultados são coerentes com os apresentados na Figura 12, uma vez que evidenciam menor concentração permeada do ativo oriundo das nanopartículas (P.NR-V) em relação ao ativo livre (P.RES). O menor fluxo de permeação e menor quantidade permeada podem ser devido à retenção do ativo no interior das nanopartículas, corroborando com os resultados de eficiência de encapsulação (item

5.2, Tabela 8) que demonstraram que praticamente a totalidade do RES encontra-se associado à nanoestrutura.

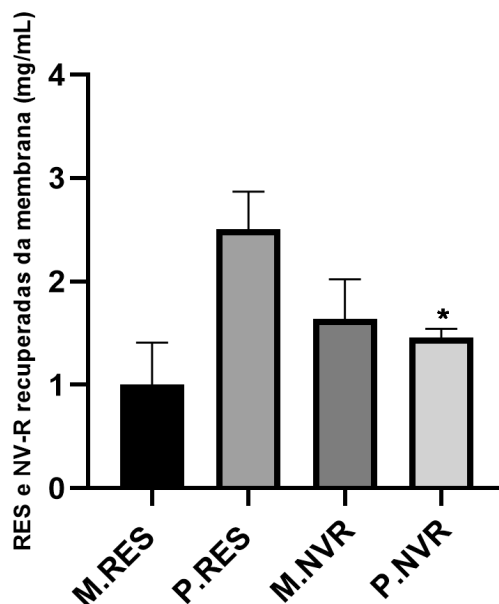
Figura 12. Representação gráfica do perfil de permeação de resveratrol livre (RES) e proveniente das nanopartículas (NV-R).



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

Soldati e colaboradores (2018) demonstraram que nanopartículas lipídicas sólidas foram capazes de aumentar a concentração de RES retida na pele, em relação ao ativo livre. O estudo referenciado utilizou pele humana para avaliação, entretanto, corrobora com o resultado obtido no presente estudo, visto que o RES livre foi encontrado em maior quantidade no meio receptor da célula de Franz, enquanto a NV-R estava em menor concentração.

Figura 13. Concentração (mg/mL) de RES livre e proveniente de NV-R recuperada na membrana (M); ou permeada/quantificada no meio de permeação (P). (*) diferença significativa entre P.RES em relação a P.NV-R.

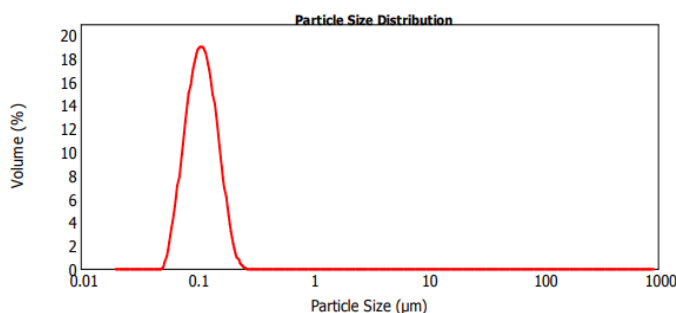


Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024.

5.5 Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro* das Nanopartículas Lipídicas Veganas contendo Resveratrol

O método de TBARS foi utilizado para a avaliação da atividade antioxidante de RES contido nas NV. Esta técnica *in vitro* tem como finalidade detectar o produto da peroxidação lipídica MDA. A reação de formação de MDA ocorre em meio ácido sob aquecimento, formando um complexo de coloração rosada com absorvância entre 532 e 535 nm (Libardoni, 2017). Nesse estudo os lipossomas, vesículas lipídicas com fases hidrofílicas e hidrofóbicas, foram utilizados como substrato de lipoperoxidação, devido a semelhança das vesículas lipossomais com as membranas celulares (Neves, 2021). O substrato foi preparado pelo método de injeção de etanol descrito por Fessi e colaboradores (2010), obtendo uma suspensão nanométrica (166 nm) com baixa polidispersão (Span 0,8) (Figura 14).

Figura 14. Distribuição granulométrica baseada no volume de partículas para lipossoma.

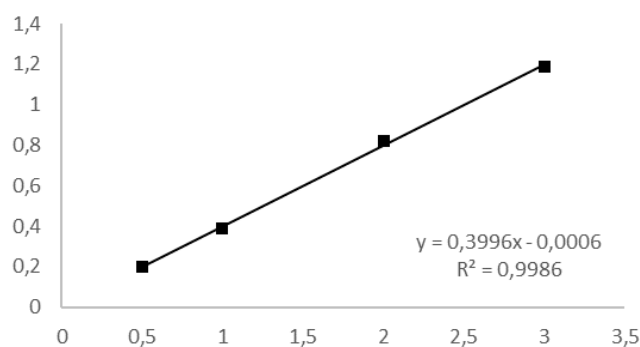


Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

O processo de peroxidação lipídica é um processo natural do organismo levando a ativação dos antioxidantes endógenos, que podem ser enzimáticos, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, ou não enzimáticos, formando o sistema de defesa do organismo. Quando não são suficientes para a proteção à peroxidação, são necessários os representantes exógenos, que podem ser sintéticos ou naturais (Jadon *et al.*, 2017). A fim de mimetizar esta ocorrência, os lipossomas no ensaio *in vitro* sofrem oxidação a partir da adição FeSO_4 e ácido ascórbico, sob aquecimento; Fe^{2+} oxida-se em Fe^{3+} e reage com ascorbato formando o produto de oxidação, ascorbil, radical livre que inicia o processo de oxidação do lipossoma produzindo o MDA.

A fim de avaliar a concentração de MDA produzida pelas amostras no ensaio, uma curva analítica de MDA (expressa em nmol/mL) foi preparada, resultando na equação de reta ($y = 0,3996x - 0,0006$; $r > 0,99$) apresentada na Figura 15.

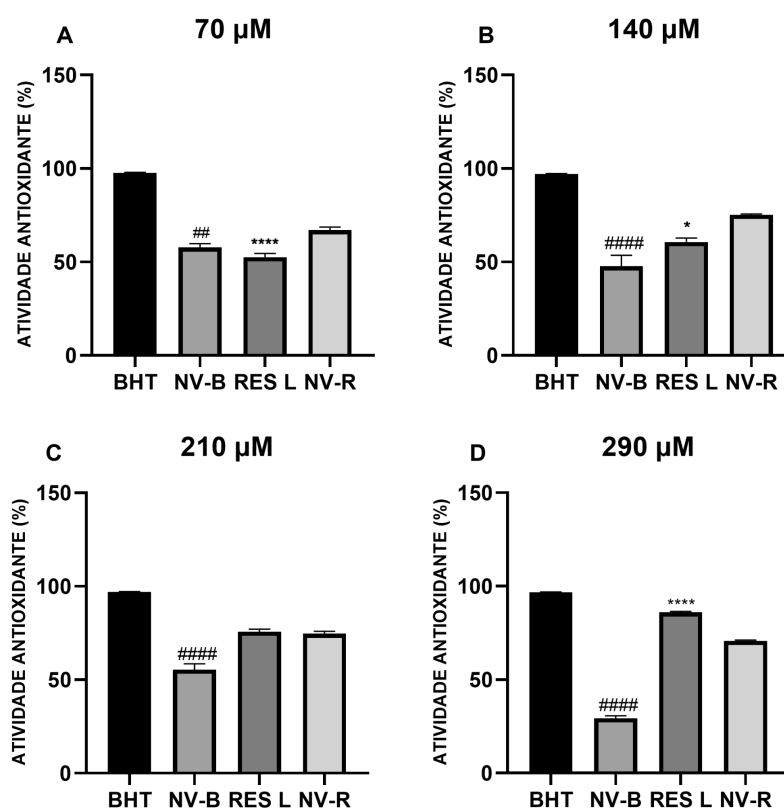
Figura 15. Curva padrão de MDA para obtenção da equação da reta



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

A atividade antioxidante das nanopartículas lipídicas veganas foi avaliada a partir da concentração de MDA formada em cada amostra onde administrou-se diferentes concentrações de resveratrol (70, 140, 210 e 290 μM). Para a avaliação das nanopartículas foi necessário a preparação de um controle sem reação, de modo a considerar a absorvância relativa ao espalhamento de luz ocasionado pela presença de partículas nanométricas (Otanicar, 2016) e descontando esse valor da absorvância relativa à concentração de MDA encontrada na amostra. Uma substância com reconhecida atividade antioxidante (butilhidroxitolueno - BHT) foi utilizada como controle para o teste. Assim, pode-se observar na representação gráfica (Figura 16) que em todas as concentrações testadas o RES apresentou atividade, entretanto comparando as nanopartículas com o ativo livre, percebe-se diferenças de resposta.

Figura 16. Atividade antioxidante (AA%) das nanopartículas lipídicas contendo (NV-R) ou não (NV-B) resveratrol em relação ao ativo livre (RES), em diferentes concentrações, utilizando antioxidante padrão BHT: (A) AA% nos diferentes grupos a 70 μM de RES; (B) AA% nos diferentes grupos a 140 μM de RES; (C) AA% nos diferentes grupos a 210 μM de RES; (D) AA% nos diferentes grupos a 290 μM de RES. (*) Diferença significativa da atividade antioxidante de NV-R em relação a RES. (#) Diferença significativa da atividade antioxidante das NV-B em relação às NV-R.

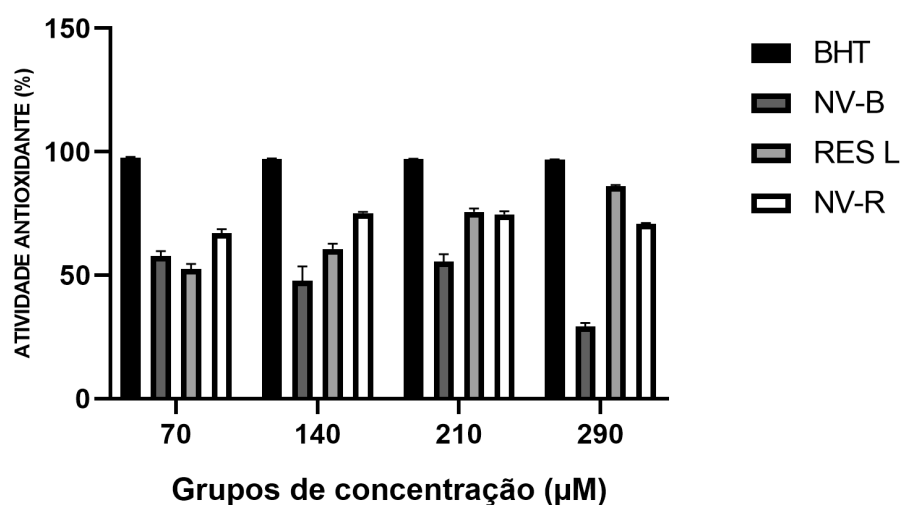


Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

As NV-R nas menores concentrações testadas (70 e 140 μM) demonstraram maior atividade em relação ao RES livre, sendo estatisticamente significante, assim como quando comparada com nanopartículas sem a presença do ativo (brancas, NV-B). Destaca-se que potencial antioxidante demonstrado na nanopartícula branca, pode estar relacionado aos componentes da formulação. Ayala e colaboradores (2022) descrevem sobre a presença de carotenóides no óleo de buriti, o que indica uma possível atividade. Além disso, alguns estudos relatam a presença de constituintes (polifenóis) na manteiga de cupuaçu que possam ser responsáveis por esta atividade (Becker *et al.*, 2023; Marronato *et al.*, 2016).

Observando os resultados obtidos para a atividade antioxidante na concentração de 210 μM , NV-R e RES não demonstram diferença significativa entre si, o que é demonstrado apenas para NV-R em relação a NV-B. Já na concentração mais alta (290 μM) é possível observar diferença significativa em relação às NV-B e o RES. Uma hipótese para esta ocorrência é que em concentrações mais elevadas os lipídios formadores das nanopartículas possam tornar-se substrato de oxidação. Em uma representação gráfica adicional (Figura 17) demonstra-se uma ampla comparação dos resultados obtidos entre os diferentes grupos e diferentes concentrações testadas. Quando comparadas neste modo abrangente, não se observou diferença significativa entre os grupos.

Figura 17. Atividade antioxidante (%) das partículas nanoestruturadas lipídicas contendo ou não resveratrol (NV-R e NV-B, respectivamente) em diferentes concentrações utilizando uma solução de resveratrol livre (RES) e BHT como antioxidantes padrão. Não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações utilizadas para o teste.



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024

Estudos anteriores demonstram que as características antioxidantes do resveratrol podem ser potencializadas quando encapsulado por carreadores nanoestruturados. Huang e colaboradores (2017) desenvolveram uma suspensão de nanopartículas poliméricas de zeína-pectina a fim facilitar a aplicação de resveratrol em alimentos e produtos farmacêuticos. Assim, os autores demonstraram pelos métodos de ABTS e DPPH que em ambos ensaios o resveratrol teve seu potencial antioxidante significativamente aumentado. Os dados corroboram com os resultados

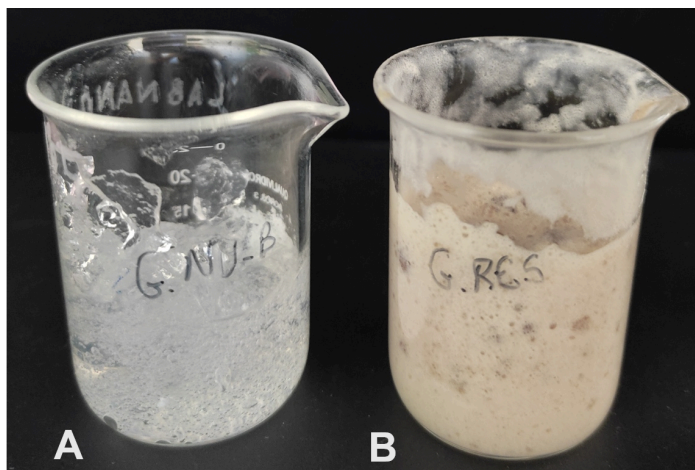
obtidos nas concentrações de 70 e 140 μM do presente estudo. De modo diferente, Pauluk e colaboradores (2019) descrevem que a velocidade de liberação (liberação controlada) do resveratrol encapsulado em sistemas nanométricos pode contribuir para uma baixa atividade antioxidante, o que aparece como uma tendência nos resultados obtidos nas concentrações de 210 e 290 μM do presente estudo.

5.6 Preparação da formulação semissólida para veiculação de nanopartículas lipídicas vegana contendo resveratrol

Suspensões de nanopartículas lipídicas, de um modo geral, apresentam viscosidade semelhante à da água. Assim, quando planeja-se a aplicação cutânea destes sistemas, a preparação de formulações semissólidas com adequado sensorial pode ser uma estratégia interessante para veicular adequadamente as nanopartículas. Neste trabalho, a forma cosmética escolhida para veiculação das nanopartículas veganas foi o gel, dado o seu sensorial agradável, pouca oleosidade, sendo uma formulação apreciada para o uso diário (Shirata, 2016).

Dentre os diferentes polímeros formadores de gel, escolhemos os de caráter aniônico ou não-iônico, evitando qualquer possível interação com as cargas superficiais das nanopartículas, observando ainda sua adequabilidade para utilização em formulações veganas. Assim, foram eleitos para esta proposta o Aristoflex® AVC (co-polímero do ácido sulfônico acriloldimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado) e o Natrosol® (hidroxietilcelulose). Com a utilização de Aristoflex® nas diferentes concentrações (1%; 1,5% e 2%) foram obtidas formulações semissólidas com presença excessiva de grumos (Figura 18), independente da concentração de polímero ou do método de preparação utilizado, não permitindo a obtenção de um gel fluído e límpido como o desejado. Assim, os géis de Aristoflex® foram desconsiderados para a continuidade do estudo.

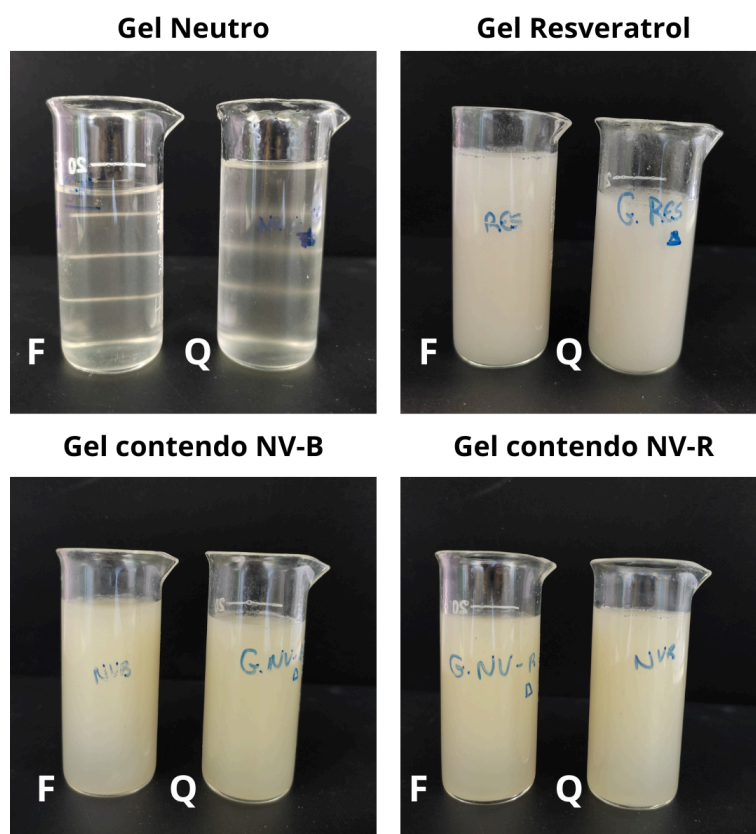
Figura 18. Formulações utilizando o polímero Aristoflex®: (A) Gel preparado à frio, na concentração de 2% contendo NV-B (nanopartículas sem ativo); (B) Gel preparado à quente, na concentração de 2% contendo RES livre.



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024.

Em relação às formulações de Natrosol® preparadas por diferentes métodos (quente e refrigeração), todas as concentrações avaliadas (1%; 1,5%; 2% e 2,5%) formaram géis satisfatórios do ponto de vista macroscópico, sem a formação de grumos. Baseada na aparência visual e sensorial dos géis, a formulação preparada com 2% de polímero foi escolhida para a veiculação do resveratrol e das nanopartículas (Figura 19).

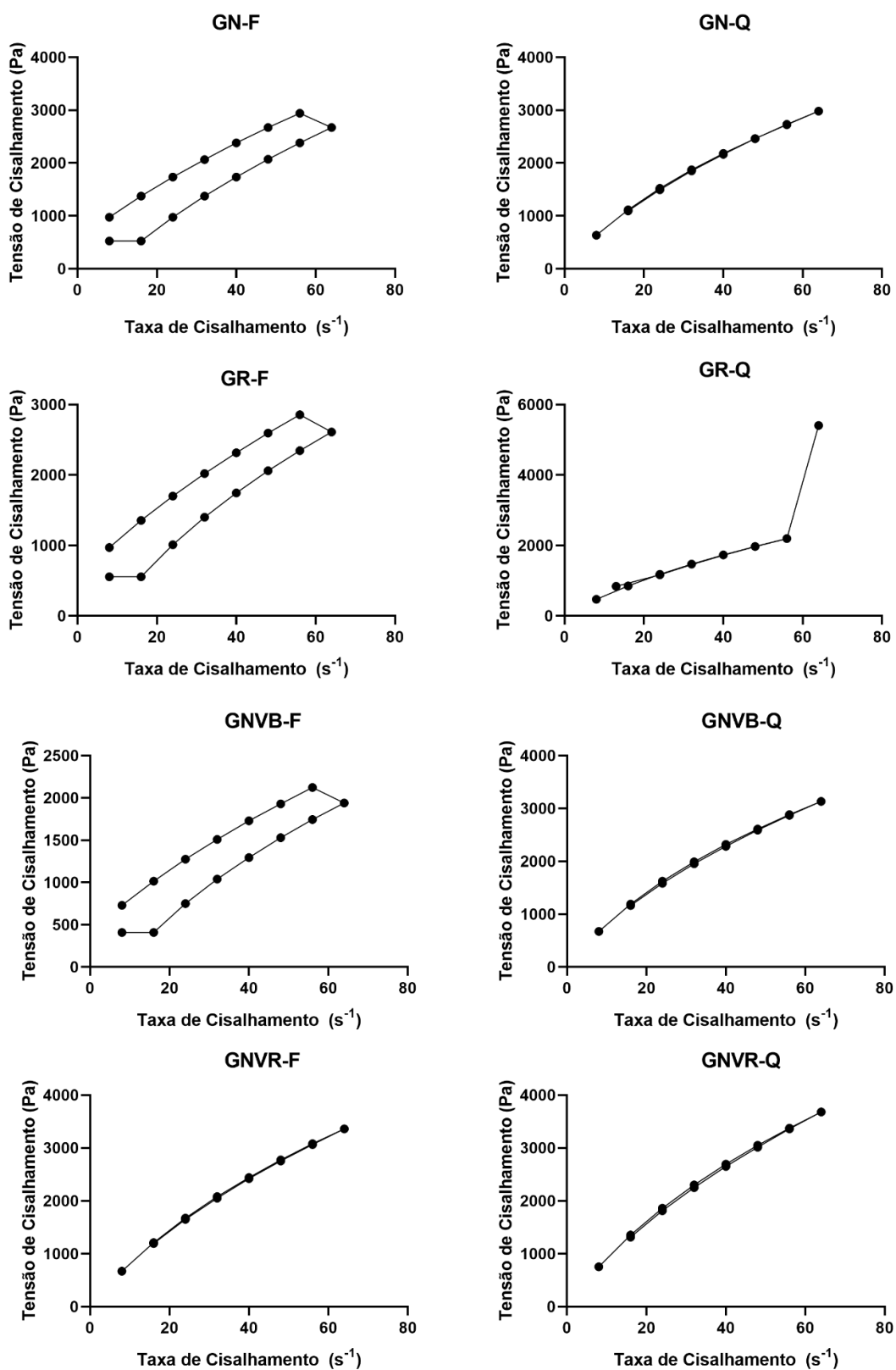
Figura 19. Géis de Natrosol® (2%) eleitos para a veiculação de resveratrol e nanopartículas lipídicas veganas contendo ou não o ativo. (F) formulações preparadas por refrigeração (Q) formulações preparadas por aquecimento



Fonte: Desenvolvida pelo próprio autor, 2024.

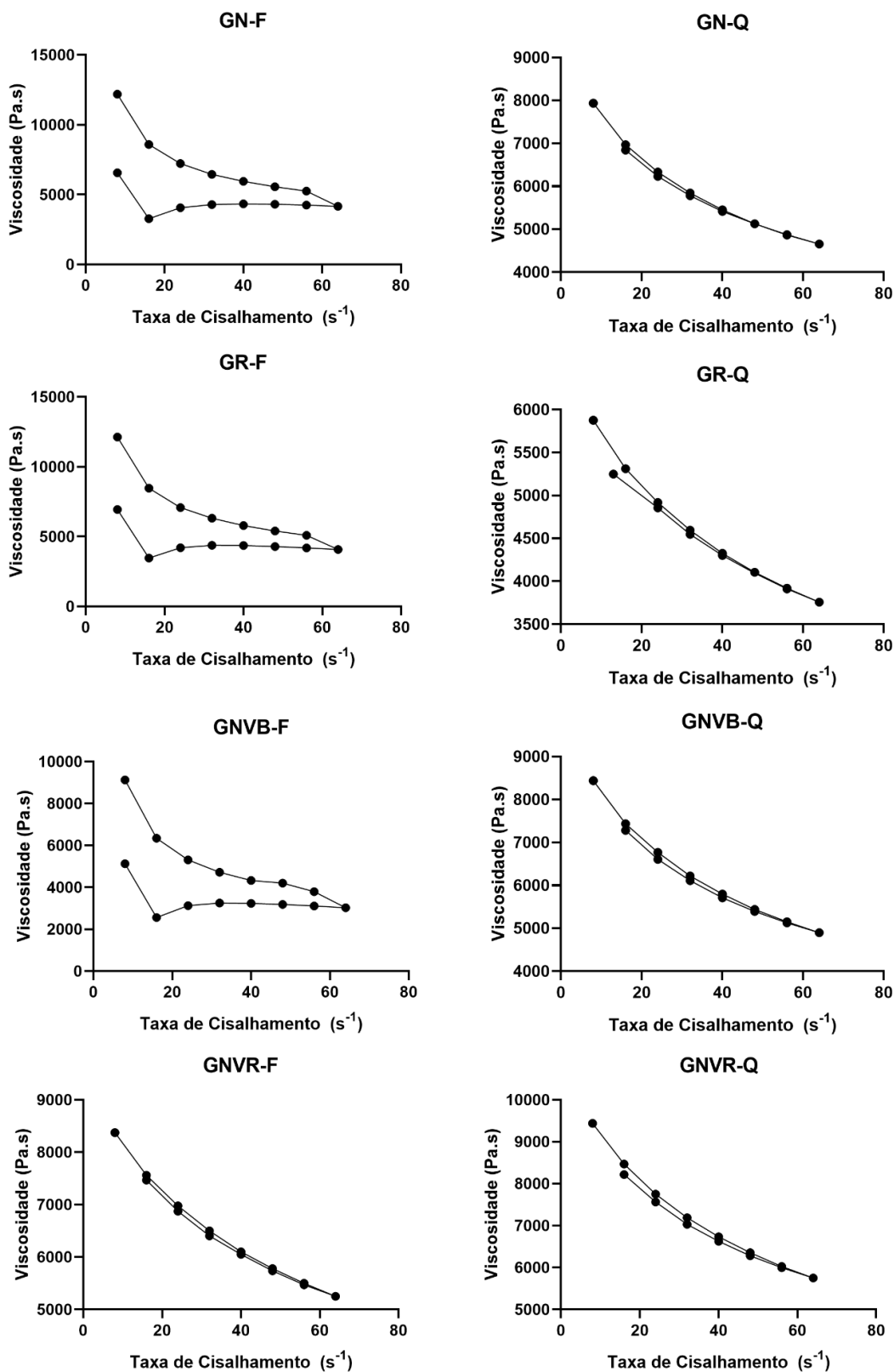
A avaliação da reologia é um parâmetro importante para o desenvolvimento de produtos cosméticos, sendo um dos fatores de escolha para a formulação semissólida de nanopartículas lipídicas veganas. A viscosidade pode classificar um produto como um fluido newtoniano, onde a viscosidade é independente do cisalhamento, ou não-newtonianos com viscosidade dependente do cisalhamento (Hosen *et al.*, 2024). Para a avaliação da viscosidade dos géis selecionados, os grupos foram separados de acordo com o método de preparação à frio ou à quente, obtendo-se dois grupos (F ou Q) com quatro formulações de géis: gel base (neutro, GN), contendo resveratrol (GR), contendo NV-B (GNVB) e contendo NV-R (GNVR). Desta forma, estas formulações foram submetidas a avaliação da viscosidade em viscosímetro rotacional. As Figuras 20 e 21 apresentam as curvas de fluxo e de viscosidade para os diferentes géis preparados neste estudo.

Figura 20. Curvas de fluxo (tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento) referentes a série de formulações semissólidas.



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024.

Figura 21. Curvas de viscosidade (viscosidade versus taxa de cisalhamento) referentes a série de formulações semissólidas.



Os resultados demonstram o comportamento não-newtoniano pseudoplástico, pois houve diminuição da viscosidade em função do aumento da taxa de cisalhamento aplicada. Os géis preparados por refrigeração apresentaram características reopéxicas, sendo eles GN-F, GR-F e GNVB-F, entretanto o GNVR-F apresentou características tixotrópicas, assim como os géis preparados por aquecimento (GN-Q; GR-Q; GNVB-Q e GNVR-Q).

A tixotropia apresentada por fluidos como os géis caracteriza-se pela capacidade de reorganização da estrutura quando a substância é deixada em repouso por um extenso período de tempo. Em fluidos não-newtonianos, a curva de fluxo plotada em um processo consecutivo de aumento e redução uniforme da taxa de cisalhamento (curvas de subida e descida) apresenta uma tendência super-posta, de tal forma que no topo elas se comportam como se estivéssemos vendo uma só curva, o que é característico de estrutura em rede tri-dimensional dos géis. Nesta estrutura as ligações entre as partículas (ponte de hidrogênio ou ligações iônicas) são relativamente fracas, rompendo-se, fazendo com que a dispersão seja subjetiva ao cisalhamento sobre um período de tempo extenso. Desta forma, quando a rede é desestruturada, a viscosidade cai com o tempo de cisalhamento, até que ela assintoticamente alcance o menor nível possível para uma dada taxa de cisalhamento constante (Santos, 2020; Silva *et al.*, 2019).

Já o comportamento de fluxo reopéxico (também conhecido como antitixotrópico) é caracterizado por um aumento de viscosidade relacionado com a duração do cisalhamento. Isto também pode ser visto no sentido da curva de histerese, isto é, quando a curva de subida é posicionada em relação à curva de descida. Fluidos reopéxicos apresentam um sentido anti-horário: a curva de descida volta acima da curva de subida. A tixotropia é um comportamento muito comum para muitos líquidos, entretanto um comportamento de fluxo realmente reopéxico é muito raro de ser encontrado (Santos, 2020; Su *et al.*, 2017).

Shrotriya e colaboradores (2017) avaliaram a viscosidade de um gel-base de Carbopol contendo NLS de resveratrol, demonstrando que a viscosidade do gel aumentou com a incorporação de NLS, o que foi atribuído a formação de uma rede coloidal que se alinha na direção do cisalhamento. O aumento da viscosidade pela

inserção de um nanocarreador também ocorreu no presente trabalho. Já com a utilização de Natrosol®, Benyounes e colaboradores (2018) avaliaram diferentes soluções contendo o polímero, não obtendo características tixotrópicas em todas as amostras, fato que ocorreu no presente trabalho com o géis de Natrosol® preparado a frio (exceto GNVR-F). Celebi e colaboradores (2015) avaliaram a viscosidade de formulações de terbinafina em Natrosol® e os hidrogéis demonstraram comportamento pseudoplástico, relacionado a uma diminuição na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. A hidroxietilcelulose (Natrosol®) possui características de sistemas não-newtonianos viscoelásticos e tal comportamento pode ser atribuído à propriedade do polímero ser um doador de viscosidade (Costa *et al.*, 2021).

A modelagem matemática das curvas de fluxo obtidas foram avaliados poelo modelos de Bingham, Casson e Ostwald (Lei da Potência). Na Tabela 11, são apresentados os índices de confiança expressos pelos modelos referentes às amostras de gel avaliadas

Tabela 11. Índices de confiança obtidos para os modelos matemáticos característicos de comportamentos não-newtonianos.

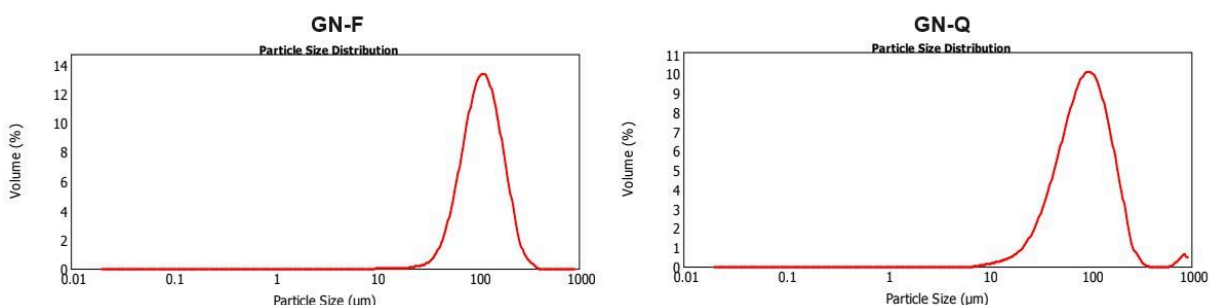
Formulação	Bingham	Casson	Lei das Potências
GN-F	74,9	88,3	76,2
GN-Q	94,8	98,4	94,4
GR-F	77,3	89,3	78,4
GR-Q	95,0	98,4	98,3
GNVB-F	76,8	89,1	77,9
GNVB-Q	94,6	98,3	98,2
GNVR-F	94,8	98,2	98,2
GNVR-Q	94,7	98,4	98,3

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024.

Observando os dados da tabela, pode-se selecionar o modelo de Casson como aquele que melhor descreve as curvas de fluxo dos géis avaliados neste estudo.

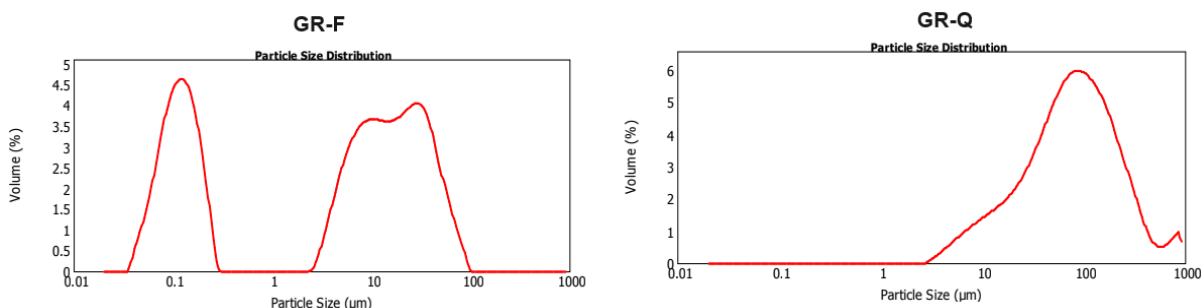
Os géis também foram avaliados em termos de distribuição granulométrica, pretendendo-se com esta análise detectar na rede tridimensional do gel a presença das nanopartículas. A Figura 21, apresenta as distribuições granulométricas dos géis neutros (GN-F e GN-Q) que demonstram a predominância de partículas micrométricas de diâmetro médio 120 μm e 106 μm respectivamente. Já na Figura 22, pode-se observar que ao ser adicionado resveratrol livre, a formulação apresenta alteração na distribuição granulométrica quando utilizado o método por refrigeração, obtendo uma aparência bimodal (dois picos), com alteração no diâmetro médio da formulação de 120 μm (GN-F) para 14 μm (gel contendo RES) e de 106 μm (GN-Q) para 120 μm (gel contendo RES).

Figura 21. Distribuição granulométrica das formulações semissólidas neutras preparadas por resfriamento e aquecimento.



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024.

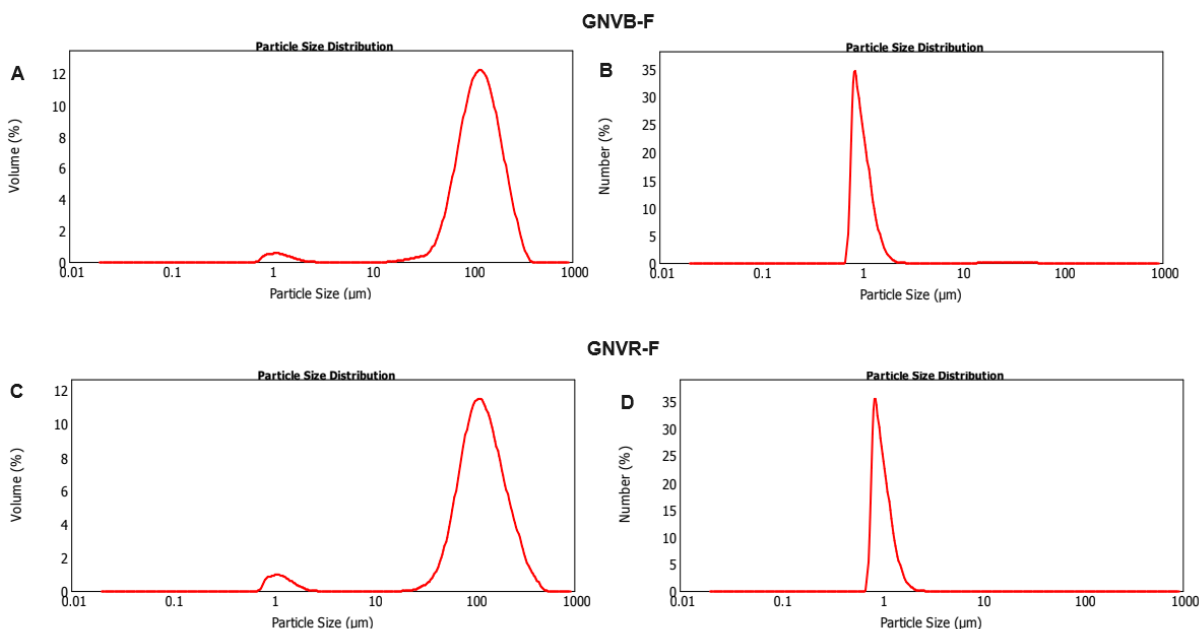
Figura 22. Distribuição granulométrica das formulações semissólidas contendo resveratrol livre preparadas por resfriamento e aquecimento.



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024.

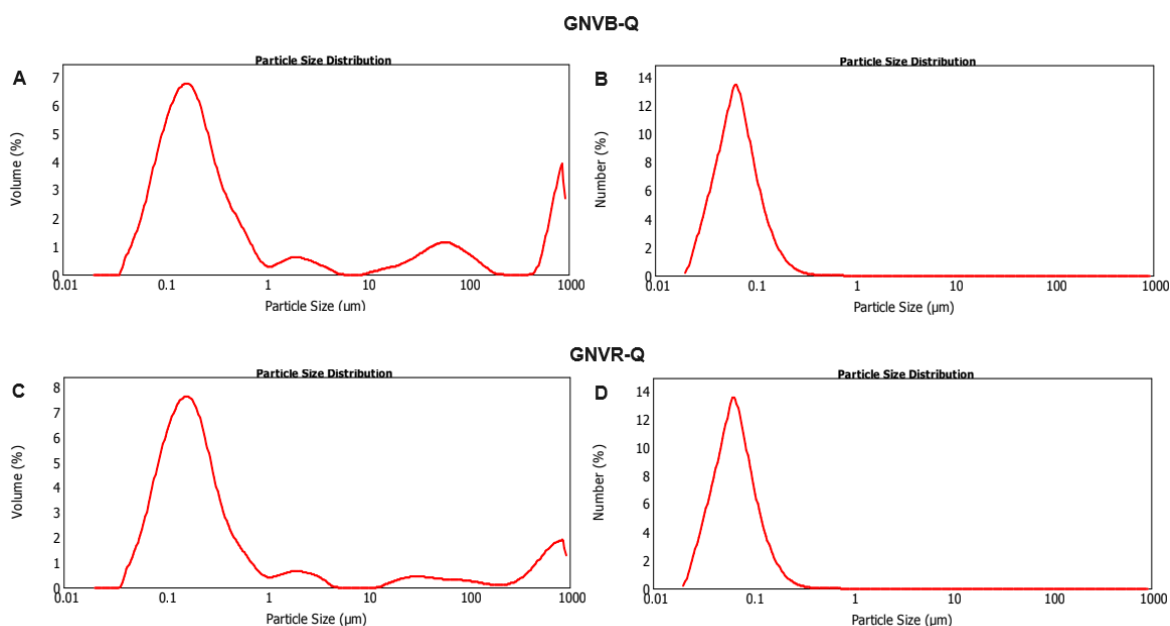
As figuras 23 e 24 demonstram a distribuição granulométrica das formulações semissólidas contendo NV-B e NV-R por ambos os métodos de preparação. Ao observarmos o gel preparado pelo método de refrigeração, não foram detectados picos em escala nanométrica, apesar de demonstrar redução considerável no tamanho, de 120 μM (gel neutro) para 48,5 μM (gel contendo NVB) e de 106 μM (gel neutro) para 1.236 μM (gel contendo NVR). O gel preparado por aquecimento, demonstrou picos nanométricos de diâmetro médio entre 219 nm (GNVB-Q) e 208 nm (GNVR-Q), sendo que o pico micrométrico presente pode estar atribuído a presença da hidroxietilcelulose para a formação do gel-base (Lucca *et al.*, 2018). É possível considerar que a formulação por preparação em aquecimento resultou em melhor homogeneização com a suspensão de nanopartículas, o que pode ser observado na comparação da distribuição granulométrica por volume e por número de partículas.

Figura 23. Distribuição granulométrica dos gel-base veiculado com nanopartículas lipídicas branca pelo método de refrigeração (A) distribuição por volume do GNVB-F (B) distribuição por número do GNVB-F (C) distribuição por volume do GNVR-F (D) distribuição por número do GNVR-F.



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024.

Figura 24. Distribuição granulométrica dos gel-base veiculado com nanopartículas lipídicas branca pelo método de aquecimento (A) distribuição por volume do GNVB-Q (B) distribuição por número do GNVB-Q (C) distribuição por volume do GNVR-Q (D) distribuição por número do GNVR-Q.



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024.

O pH das formulações foi avaliado considerando a importância desta característica para aplicação tópica, sendo que o valor ideal está entre 4,0 e 6,5 (Mansur, 2020). Os géis preparados exibiram valores entre 5,78 e 7,34, ou seja, dentro da faixa de neutralidade, como demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de pH das formulações semissólidas \pm o desvio padrão.

Amostra	pH \pm DP
GN-F	6,16 \pm 0,08
GN-Q	6,52 \pm 0,04
GR-F	7,34 \pm 0,12
GR-Q	7,23 \pm 0,02
GNVB-F	5,78 \pm 0,03
GNVB-Q	6,27 \pm 0,02
GNVR-F	7,18 \pm 0,10

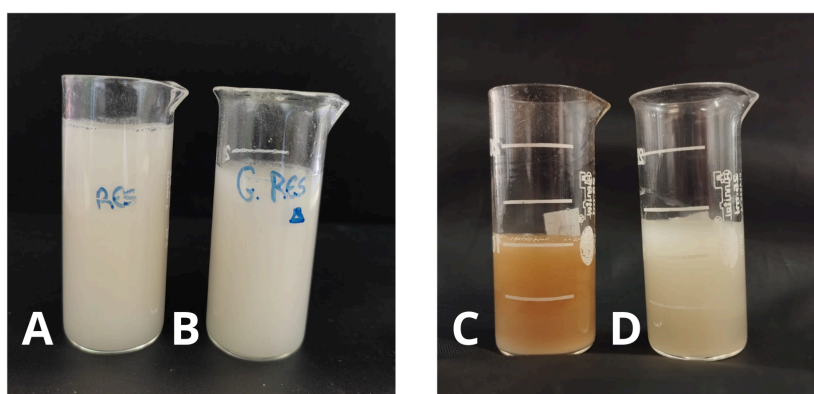
GNVR-Q

6,93 ± 0,02

Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024.

O resveratrol é um antioxidante que possui características conhecidas, sendo degradado quando exposto à luz, ou seja fotossensível (Plachta, 2024). No decorrer do estudo de reologia observou-se uma alteração na coloração do resveratrol, o qual foi mantido em um béquer transparente por 15 dias, sugerindo que ocorreu uma oxidação do ativo, devido à luz natural a qual foi submetido durante o experimento. Na Figura 25, pode-se observar as formulações contendo resveratrol livre no dia de seu preparo (a e b) e no décimo quinto dia de experimento (c), ao lado do gel contendo nanopartículas lipídicas veganas contendo resveratrol (d). Esta observação levanta a hipótese que quando o ativo encontra-se carregado nas nanopartículas encontra-se protegido da oxidação. Sharkawy e colaboradores (2020) avaliaram a fotoestabilidade do resveratrol, demonstrando que o ativo é facilmente degradado, mas quando protegido por um carreador mantém-se estável. Em nosso estudo, faz-se necessário ainda a comprovação da proteção à fotossensibilidade, através de ensaio de fotodegradação e avaliação do teor de resveratrol presente no gel. Entretanto as características macroscópicas, como a alteração na coloração, fortalece a hipótese de proteção pelas NV.

Figura 25. Formulações de gel-base veiculado com resveratrol livre (A) formulação de gel com resveratrol preparado por refrigeração, dia 0; (B) formulação de gel de resveratrol preparado por aquecimento, dia 0; (C) formulação de gel de resveratrol preparado por refrigeração após 15 dias; (D) formulação de GNVR-F após 15 dias.



Fonte: Desenvolvido pelo próprio autor, 2024.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final do desenvolvimento do trabalho, da análise dos resultados obtidos por meio dos ensaios propostos e, considerando os objetivos do estudo, é possível obter algumas conclusões:

- Os estudos pré-formulação foram determinantes para a escolha das matérias-primas, sendo possível observar a compatibilidade dos componentes da formulação e as concentrações ideais para a utilização;
- O desenvolvimento de nanopartículas lipídicas veganas pelo método adaptado de fusão/resfriamento mostrou que esta pode ser uma técnica promissora, contudo necessita de otimização de seus parâmetros para ser considerada viável. Por outro lado, o método de fusão-difusão mostrou-se viável para obtenção de suspensões de nanopartículas lipídicas veganas, utilizando matérias-primas de origem natural;
- A caracterização físico-química das nanopartículas preparadas pelo método eleito apresentou resultados dentro do desejado para a aplicação pretendida, tais como tamanho nanométrico, carga superficial alta (em módulo) e pH compatível com aplicação cutânea, mantendo as características de um produto vegano e portanto apresentando-se como uma partícula inovadora;
- As nanopartículas veganas contendo resveratrol apresentam atividade antioxidante superior ou igual, a depender da concentração testada, em relação ao ativo livre, demonstrando potencial para serem utilizadas na prevenção dos sinais do envelhecimento;
- Em relação a permeação cutânea, houve menor fluxo de permeação e menor quantidade permeada de ativo livre em relação ao ativo oriundo das nanopartículas, inferindo-se uma retenção do ativo no interior dos carreadores e, em uma futura aplicação biológica, um possível efeito de liberação controlada na pele.
- As formulações semissólidas planejadas para a veiculação de nanopartículas lipídicas veganas foram adequadamente preparadas utilizando um derivado celulósico permitido para produtos veganos. Dentre os dois métodos testados para a preparação, a técnica que empregou aquecimento resultou em géis

com características tixotrópicas, o que é desejado para aplicação por via tópica.

A partir dos resultados obtidos, tem-se como perspectiva futura a continuidade dos experimentos visando a realização de ensaios de permeação cutânea utilizando modelos alternativos ao uso de animais. Além disso, pretende-se realizar novos ensaios antioxidantes utilizando diferentes métodos com finalidade de comparação com os dados obtidos pelo TBARS. Também planeja-se a avaliação da morfologia das nanopartículas por microscopia de força atômica e alguns estudos descritos na regulamentação da ANVISA para cosméticos, utilizando diferentes formas semissólidas para veicular as nanopartículas.

7 REFERÊNCIAS

ABIHPEC. Caderno de Tendências 2019-2020. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/caderno-de-tendencias-2019-2020/>. Acesso em: 28 de Abril de 2024.

ABREU-NARANJO, Reinier et al. Bioactive compounds, phenolic profile, antioxidant capacity and effectiveness against lipid peroxidation of cell membranes of *Mauritia flexuosa* L. fruit extracts from three biomes in the Ecuadorian Amazon. **Heliyon**, v. 6, n. 10, 2020.

AHMAD, Anas; AHSAN, Haseeb. Lipid-based formulations in cosmeceuticals and biopharmaceuticals. **Biomedical Dermatology**, v. 4, p. 1-10, 2020.

AHMAD, Javed. Lipid nanoparticles based cosmetics with potential application in alleviating skin disorders. **Cosmetics**, v. 8, n. 3, p. 84, 2021.

AMBERG, Nora; FOGARASSY, Csaba. Green consumer behavior in the cosmetics market. **Resources**, v. 8, n. 3, p. 137, 2019.

ARAUJO, Beatriz *et al.* pH de cosméticos e sua analogia com o pH biológico: uma abordagem investigativa no ensino de química. **Pesquisa em foco**, v. 27, n. 2, 2022.

AYALA, Juliana Marciano. Desenvolvimento de bigéis e nanocápsulas contendo óleo de buriti para uso cosmético. Campus UFRJ-Macaé, Macaé, 2022.

BACKER, Beatriz Silveira; FAILLACE, Luisa Silveira Andrade; MACHADO, Karina. Manteiga de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) um potencial ativo na prevenção do envelhecimento, v. 42, n. 01, 2023.

BELFORT, Marcia Guelma Santos *et al.* Análise microbiológica em formulação cosmética de um sérum a base do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para uso geriátrico. **Revista Foco**, v. 16, n. 3, p. e1232-e1232, 2023.

BENYOUNES, K.; REMLI, S.; BENMOUNAH, A. Rheological behavior of hydroxyethylcellulose (HEC) solutions. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2018. p. 012008.

BERRIDGE, Michael J. Vitamin D cell signalling in health and disease. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 460, n. 1, p. 53-71, 2015.

BERTOLUCI, Raquel Silveira et al. Cosméticos Veganos. Anna Karynna Alves de Alencar Rocha (Doutorado) Docente da Uninassau - João Pessoa. Giane Dantas de Macêdo Freitas (Doutorado) Coordenadora de curso e docente da Uninassau-João Pessoa. *Temas em Saúde*, UNINASSAU p. 45, 2020.

BOCHEVA, Georgeta; SLOMINSKI, Radomir M.; SLOMINSKI, Andrzej T. The impact of vitamin D on skin aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 9097, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, Brasília, DF, 24 de Julho 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 752, de 19 de setembro de 2022, dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, Brasília, DF, 19 de setembro de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de dissolução aplicável e medicamentos genéricos, novos e similares – Guia nº 14/2018 – Versão 2 p. 12

CAIADO, Ana Laura; VIEIRA, Tatiana Reis. *Cosméticos veganos, naturais e orgânicos*. 2020.

CAO, Changwei et al. Diet and skin aging — From the perspective of food nutrition. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 870, 2020.

CARDOZA, Clive et al. Emerging applications of nanotechnology in cosmeceutical health science: Latest updates. **Health Sciences Review**, v. 4, p. 100051, 2022.

CELEBI, Nevin; ERMIŞ, Seda; ÖZKAN, Semiha. Development of topical hydrogels of terbinafine hydrochloride and evaluation of their antifungal activity. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 41, n. 4, p. 631-639, 2015.

CHANTABURANAN, Thitirat et al. Enhanced stability and skin permeation of ibuprofen-loaded solid lipid nanoparticles based binary solid lipid matrix: Effect of surfactant and lipid compositions. **International Journal of Pharmaceutics: X**, v. 6, p. 100205, 2023.

CORADINI, K. et al. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 178-185, 2014.

CORNIER, Jean; KECK, Cornelia M.; VAN DE VOORDE, Marcel (Ed.). Nanocosmetics: From Ideas to Products. **Elsevier**, 2020.

DA COSTA, Russany Silva; COSTA, Roseane Maria Ribeiro; JÚNIOR, José Otávio Carréra Silva. Comportamento reológico e atividade antimicrobiana de uma formulação tópica contendo extrato de *Heliotropium indicum* L. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e32310515068-e32310515068, 2021.

DA SILVA, Celiane Mendes et al. Caracterização reológica de fluidos não newtonianos e sua aplicabilidade na indústria. **Caderno de Graduação-Ciências Exatas e Tecnológicas-UNIT-ALAGOAS**, v. 5, n. 2, p. 285-285, 2019.

DAVIES, Samuel et al. Simultaneous nanoencapsulation of lipoic acid and resveratrol with improved antioxidant properties for the skin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 192, p. 111023, 2020.

DE JESUS LEOPOLDO, Claudemir; DEL VECHIO, Gustavo Henrique. Nanotecnologia e suas aplicações: uma revisão quanto aos seus conceitos, potencial de uso, riscos e tendências. **Revista Interface Tecnológica**, v. 17, n. 2, p. 144-154, 2020.

DE TOLLENAERE, Morgane et al. Well-aging: A new strategy for skin homeostasis under multi-stressed conditions. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 19, n. 2, p. 444-455, 2020.

DUBOIS, Twiany Cruz et al. Cosméticos naturais e orgânicos: definições, legislação no mundo e certificações. 2019.

DUTTA, Rajat Subhra et al. Enhanced efficacy of β -carotene loaded solid lipid nanoparticles optimized and developed via central composite design on breast cancer cell lines. **Heliyon**, 2024.

EL-TELBANY, Dalia Farag A. et al. Formulation and assessment of hydroxyzine HCL solid lipid nanoparticles by dual emulsification technique for transdermal delivery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112130, 2021.

FESSI, H. et al. Method of formation of colloidal nanoparticles. **French Patent**, v. 2, n. 608, p. 988, 1988.

FIOD RICCIO, Bruno Vincenzo et al. Characteristics, biological properties and analytical methods of trans-resveratrol: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 50, n. 4, p. 339-358, 2020.

FLOR, Juliana; MAZIN, Mariana Ruiz; FERREIRA, Lara Arruda. Cosméticos naturais, orgânicos e veganos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 31, p. 31-36, 2019.

FOUDAH, Ahmed I. et al. Preparation and evaluation of antidiabetic activity of mangiferin-loaded solid lipid nanoparticles. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p. 103946, 2024.

FRANCA, Camilla Custoias Vila; UENO, Helene Mariko. Green cosmetics: perspectives and challenges in the context of green chemistry. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 53, p. 133-150, 2020.

FRONZA, Tassiana et al. Nanocosméticos: em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios. Porto Alegre: **Gráfica da UFRGS**, v. 64, 2007.

GOMES, Graziela VL et al. Physico-chemical stability and in vitro digestibility of beta-carotene-loaded lipid nanoparticles of cupuacu butter (*Theobroma grandiflorum*) produced by the phase inversion temperature (PIT) method. **Journal of food engineering**, v. 192, p. 93-102, 2017.

GU, Yanpei et al. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. **Ageing research reviews**, v. 59, p. 101036, 2020.

HAQ, Anika et al. Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. **International journal of pharmaceutics**, v. 539, n. 1-2, p. 58-64, 2018.

HAWKINS, Stacy; DASGUPTA, Bivash R.; ANANTHAPADMANABHAN, Kavssery P. Role of pH in skin cleansing. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 43, n. 4, p. 474-483, 2021.

HENZ, Tainara et al. Nanotecnologias aplicadas a cosméticos e síntese do resveratrol: uma revisão. 2020.

HOSEN, Hauna Fathmadinda et al. Dynamics of a single bubble in Newtonian and non-Newtonian fluids: Experimental and simulation approaches. **International Journal of Multiphase Flow**, v. 174, p. 104789, 2024.

HUANG, Xulin et al. Resveratrol encapsulation in core-shell biopolymer nanoparticles: Impact on antioxidant and anticancer activities. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 157-165, 2017.

ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; Validation of Analytical Procedures Q2(R2), 2023.

JADON, Nimisha *et al.* Monitoring of Endogenous Antioxidants: An Electroanalytical Approach. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 164, n. 4, p. H266, 2017.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing research reviews**, v. 21, p. 16-29, 2015.

KIRK, Riley D. et al. Evaluations of Skin Permeability of Cannabidiol and Its Topical Formulations by Skin Membrane-Based Parallel Artificial Membrane Permeability Assay and Franz Cell Diffusion Assay. **Medical Cannabis and Cannabinoids**, v. 5, n. 1, p. 129-137, 2022.

KRUTMANN, Jean et al. Environmentally-induced (extrinsic) skin aging: Exposomal factors and underlying mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 4, p. 1096-1103, 2021.

KRUTMANN, Jean et al. The skin aging exposome. **Journal of dermatological science**, v. 85, n. 3, p. 152-161, 2017.

KUMAR, Raj et al. Solid lipid nanoparticles for the controlled delivery of poorly water soluble non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 40, p. 686-696, 2018.

LUCCA, Letícia G. et al. Anti-inflammatory effect from a hydrogel containing nanoemulsified copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). **AAPS PharmSciTech**, v. 19, p. 522-530, 2018.

MAGALHÃES, Lorena Severiano de. *Cosméticos orgânicos: uma tendência crescente no mercado ainda pouco conhecida*. 2018.

MANSUR, Maria Cristina Pinheiro Pereira Reis *et al.* Photoprotective nanoemulsions containing microbial carotenoids and buriti oil: Efficacy and safety study. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 6741-6752, 2020.

MARRONATO, Andreia *et al.*, Comparison of sunscreens Containing Titanium Dioxide Alone Or In Association With Cocoa, Murumuru Or Cupuaçu Butters DOI:10.19277/bbr.13.2.141

MASIERO, Jessica Fagionato et al. Vegetable oils in pharmaceutical and cosmetic lipid-based nanocarriers preparations. **Industrial Crops and Products**, v. 170, p. 113838, 2021.

MOSTAFA, Wedad Z.; HEGAZY, Rehab A. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 6, p. 793-804, 2015.

NASCIMENTO, Jéssica *et al.* Encapsulation of orlistat in biodegradable polymeric nanocapsules improves its cytotoxic effect against cervical cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 89, p. 105086, 2023.

NONATO, Carla de Fatima Alves *et al.* Chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of the pulp oil of fruits of *Mauritia flexuosa* L. f. **Blacpma**, v. 19, n. 4, p. 408-419, 2020.

ONUGWU, Adaeze L. *et al.* Development and optimization of solid lipid nanoparticles coated with chitosan and poly (2-ethyl-2-oxazoline) for ocular drug delivery of ciprofloxacin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 74, p. 103527, 2022.

OTANICAR, Todd P. *et al.* Filtering light with nanoparticles: a review of optically selective particles and applications. **Advances in Optics and Photonics**, v. 8, n. 3, p. 541-585, 2016.

PALADINI, Andreia Medeiros; LOPES, Talita Durante; MACHADO, Karina Elisa. Benefícios do resveratrol como ativo cosmético na prevenção do envelhecimento cutâneo. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 32, n. 4, p. 319-328, 2020.

PAULUK, Daniele *et al.* Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. **Food hydrocolloids**, v. 94, p. 411-417, 2019.

PULSONI, Ilaria *et al.* Comparison between Franz diffusion cell and a novel micro-physiological system for in vitro penetration assay using different skin models. **SLAS technology**, v. 27, n. 3, p. 161-171, 2022.

PURI, Poonam *et al.* Effects of air pollution on the skin: A review. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*, v. 83, p. 415, 2017.

QUINTANAR-GUERRERO, David *et al.* Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

REIS, Carolina Santos. Estudo de caso: uma investigação da atitude e do comportamento ambientais dos consumidores de cosméticos orgânicos e naturais. 2019.

ROLIM, Hercilia Maria Lins; FEITOSA., Christiane Mendes et al. **Nanotecnologia e saúde**. 1 ed. Campinas, SP. Editora Átomo, 2021.

ROMERO, Valéria et al. Diferenças entre cosméticos orgânicos e naturais: literatura esclarecedora para prescritores. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 10, n. 3, p. 188-193, 2018.

SALVIONI, Lucia et al. The emerging role of nanotechnology in skincare. **Advances in colloid and interface science**, v. 293, p. 102437, 2021.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International journal of pharmaceutics**, v. 289, n. 1-2, p. 209-213, 2005.

SHARKAWY, Asma et al. Enhancing trans-resveratrol topical delivery and photostability through entrapment in chitosan/gum Arabic Pickering emulsions. **International journal of biological macromolecules**, v. 147, p. 150-159, 2020.

SHARMA, Ashmita; KUHAD, Anurag; BHANDARI, Ranjana. Novel nanotechnological approaches for treatment of skin-aging. **Journal of tissue viability**, v. 31, n. 3, p. 374-386, 2022.

SHIRATA, Marina Mendes Fossa; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Importance of texture and sensorial profile in cosmetic formulations development. **Surg. Cosmet. Dermatol**, v. 187, p. 223, 2016.

SHROTRIYA, S. N.; RANPISE, N. S.; VIDHATE, B. V. Skin targeting of resveratrol utilizing solid lipid nanoparticle-engrossed gel for chemically induced irritant contact dermatitis. **Drug delivery and translational research**, v. 7, p. 37-52, 2017.

SILVA, Antônia Castro et al. Envelhecimento e ativos cosméticos antienvhecimento. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 37, n. 72, p. 113-127, 2021.

SILVEIRA, Camila Costa et al. Estudo científico de Nanocosméticos. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, v. 6, n. 2, p. 108-120, 2019.

SOHAIL, Saba et al. Melatonin delivered in solid lipid nanoparticles ameliorated its neuroprotective effects in cerebral ischemia. **Heliyon**, v. 9, n. 9, 2023.

SOLDATI, Pedro P. et al. Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect. **IFAC-PapersOnLine**, v. 51, n. 27, p. 16-21, 2018.

SU, Xianglong; CHEN, Wen; XU, Wenxiang. Characterizing the rheological behaviors of non-Newtonian fluid via a viscoelastic component: Fractal dashpot. **Advances in Mechanical Engineering**, v. 9, n. 10, p. 1687814017699765, 2017.

VERMA, Veenit Kr; MONDAL, Sabyasachi. A brief review of numerical methods for heat and mass transfer of Casson fluids. **Partial Differential Equations in Applied Mathematics**, v. 3, p. 100034, 2021.

VINARDELL, María Pilar; MITJANS, Montserrat. Nanocarriers for delivery of antioxidants on the skin. **Cosmetics**, v. 2, n. 4, p. 342-354, 2015.

ZHANG, Shoubing; DUAN, Enkui. Fighting against skin aging: the way from bench to bedside. **Cell transplantation**, v. 27, n. 5, p. 729-738, 2018.

ZIELIŃSKA, Aleksandra; NOWAK, Izabela. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel carriers for cosmetic ingredients. In: **Nanobiomaterials in galenic formulations and cosmetics**. William Andrew Publishing, 2016. p. 231-255.