

MESTRADO EM TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Sistemas baseados em microemulsões para a administração cutânea de proteínas

Cátia Sofia Gomes

M
2020





Cátia Sofia da Silva Gomes

Sistemas baseados em microemulsões para a administração cutânea de proteínas

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em
Tecnologia Farmacêutica

Trabalho realizado sob orientação
da Prof^ª. Doutora Maria Helena dos Anjos Rodrigues Amaral

Dezembro 2020

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS
PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO
INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

Foram diversas as pessoas que me ajudaram ao longo desta caminhada de dois anos e que contribuíram para que esta experiência se tornasse enriquecedora, tanto a nível académico como a nível pessoal. Deste modo, não posso deixar de agradecer com muito carinho a todos os que tornaram isto possível.

À Professora Doutora Maria Helena Amaral, minha professora e orientadora, agradeço toda a orientação científica, o carinho, a paciência, a disponibilidade, o interesse e o empenho que acompanhou as diversas fases do meu trabalho.

Aos restantes Professores do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, agradeço por todas as competências e todo o conhecimento científico que me transmitiram ao longo deste ciclo de estudos.

Aos colegas de Mestrado que comigo partilharam este percurso, agradeço todo o apoio, toda a ajuda e todos os momentos de convívio proporcionados.

Aos elementos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, mais especificamente à Dona Conceição e ao Joel, agradeço toda a ajuda e disponibilidade prestadas no decorrer do trabalho no laboratório.

Aos meus amigos, em especial à Joana e à Andreia, agradeço o apoio e a confiança que me deram sempre que precisei.

Aos meus pais, agradeço a paciência e o apoio.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, tornaram possível a execução deste trabalho, o meu profundo reconhecimento e um bem-haja!

Este trabalho foi apoiado pela Unidade de Ciências Biomoleculares Aplicadas - UCIBIO financiada por fundos nacionais através da FCT/MCTES (UID/Multi/04378/2019).

Resumo

As microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis constituídos por misturas de óleo, água, tensioativo e co-tensioativo. As microemulsões são fáceis de preparar e podem ser usadas como sistemas de administração de um grande número de substâncias, devido à elevada capacidade de carga que possuem e também por melhorarem a biodisponibilidade de muitos compostos.

As proteínas podem exercer diferentes efeitos na pele, especialmente para fins farmacêuticos e cosméticos, no entanto, a capacidade de penetração destas moléculas na pele é uma das grandes limitações para a sua administração. Portanto, o principal objetivo das microemulsões como sistemas para administração cutânea de proteínas é aumentar a permeabilidade e a tolerabilidade destas na pele.

O objetivo deste trabalho foi, numa fase inicial, desenvolver microemulsões simples O/A e múltiplas A/O/A com e sem albumina como proteína modelo de fatores de crescimento para a cicatrização e regeneração da pele. De forma a caracterizar e avaliar a estabilidade destes sistemas foram realizados os seguintes ensaios: análise das características organoléticas, tamanho das gotículas da fase interna e pH. Posteriormente, prosseguiram-se os estudos apenas com as microemulsões A/O/A e foram realizados adicionalmente os ensaios de estabilidade acelerada por centrifugação e avaliação do teor de albumina. Numa fase final do trabalho, as microemulsões foram gelificadas com o agente gelificante PFC® para melhorar a sua consistência e para facilitar a sua aplicação na pele. Em seguida, as microemulsões gelificadas foram caracterizadas quanto às características organoléticas, ao comportamento reológico, à textura (firmeza e adesividade), à libertação *in vitro* de albumina e à capacidade de oclusão.

Os resultados deste trabalho permitiram concluir, de uma forma geral, que foi possível obter microemulsões A/O/A estáveis relativamente ao pH e ao tamanho das gotículas da fase interna. A gelificação das microemulsões permitiu a obtenção de preparações semissólidas com características adequadas ao nível do aspeto, comportamento reológico, textura e libertação *in vitro* de albumina, contudo, pouco oclusivas. Estes sistemas baseados em microemulsões podem ser potencialmente utilizados no futuro para a administração de moléculas proteicas, como por exemplo os fatores de crescimento destinados a serem utilizados na cicatrização e regeneração da pele.

Palavras-chave: Microemulsões, Proteínas, Administração cutânea, Regeneração da pele.

Abstract

Microemulsions are thermodynamically stable systems consisting of mixtures of oil, water, surfactant and co-surfactant. Microemulsions are easy to prepare and can be used as delivery systems for a large number of substances, due to their high loading capacity and also to improve the bioavailability of many compounds.

Proteins can have different effects on the skin, especially for pharmaceutical and cosmetic purposes, however, the ability of these molecules to penetrate the skin is one of the major limitations for their administration. Therefore, the main objective of microemulsions as systems for cutaneous administration of proteins is to increase their permeability and tolerability in the skin.

The aim of this work was, in an initial phase, to develop O/W and W/O/W microemulsions with and without albumin as a model protein for growth factors for skin healing and regeneration. In order to characterize and evaluate the stability of these systems the following tests were performed: organoleptic analysis, internal phase droplet size and pH. Subsequently, the studies were pursued only with the W/O/W microemulsions and the following tests were additionally performed: accelerated stability by centrifugation and evaluation of the albumin content. In a final stage of the work, microemulsions were jellified with the gelling agent PFC® to improve their consistency and to facilitate their application to the skin. Then, jellified microemulsions were characterized and evaluated regarding their organoleptic characteristics, rheological behavior, texture (firmness and adhesiveness), *in vitro* release of albumin and occlusion ability .

The results of this work allowed to conclude that it was possible to obtain stable W/O/W microemulsions regarding their droplet sizes of the internal phase and pH. The gelation of the microemulsions allowed to obtain stable semi-solid preparations regarding their appearance, rheological behavior, texture and *in vitro* release of albumin, however, were little occlusive. These systems based on microemulsions can potentially be used in the future for the administration of protein molecules, such as growth factors intended to be used in the healing and regeneration of the skin.

Key words: Microemulsions, Proteins, Cutaneous administration, Skin regeneration.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. A pele humana.....	1
1.2. Administração cutânea de proteínas.....	5
1.3. Fatores de crescimento utilizados na cicatrização e regeneração da pele.....	8
1.3.1. Nanossistemas utilizados na veiculação de fatores de crescimento.....	10
1.4. Micro e nanoemulsões.....	12
1.4.1. Definição.....	12
1.4.2. Aplicação de micro e nanoemulsões na cosmética e na dermofarmácia.....	17
1.5. Objetivos do trabalho.....	22
2. Parte Experimental.....	23
2.1. Matérias-primas e equipamento.....	23
2.1.1. Matérias-primas.....	23
2.1.2. Equipamento.....	24
2.2. Métodos.....	25
2.2.1. Preparação de microemulsões contendo albumina.....	25
2.2.2. Caracterização e avaliação da estabilidade das microemulsões.....	29
2.2.2.1. Análise organolética.....	29
2.2.2.2. Tamanho das gotículas da fase interna.....	29
2.2.2.3. pH.....	30
2.2.2.4. Estabilidade acelerada por centrifugação.....	31
2.2.2.5. Teor de albumina.....	32
2.2.3. Preparação de microemulsões gelificadas.....	34
2.2.4. Caracterização e avaliação da estabilidade das microemulsões gelificadas.....	35

2.2.4.1. Análise organolética.....	35
2.2.4.2. Reologia.....	35
2.2.4.3. Textura.....	37
2.2.4.4. Liberação <i>in vitro</i> de albumina.....	39
2.2.4.5. Teste de oclusão.....	40
2.2.5. Análise Estatística.....	41
2.3. Resultados e discussão.....	42
2.3.1. Caracterização e avaliação da estabilidade das microemulsões.....	42
2.3.1.1. Análise organolética.....	42
2.3.1.2. Tamanho das gotículas da fase interna.....	43
2.3.1.3. pH.....	51
2.3.1.4. Estabilidade acelerada por centrifugação.....	56
2.3.1.5. Teor de albumina.....	58
2.3.2. Caracterização e avaliação da estabilidade das microemulsões gelificadas.....	61
2.3.2.1. Análise organolética.....	61
2.3.2.2. Reologia.....	62
2.3.2.3. Textura.....	67
2.3.2.4. Liberação <i>in vitro</i> de albumina.....	73
2.3.2.5. Teste de oclusão.....	75
3. Conclusões.....	76
4. Referências bibliográficas.....	78

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura da pele e respetivos anexos.....	1
Figura 2 - Estratos da epiderme.....	2
Figura 3 - Camadas da derme (corte histológico de pele humana – microscópio ótico (Coloração HE) (100x)).....	4
Figura 4 - Esquema representativo das vias de penetração das moléculas através da pele. (I) Via intercelular; (A) Via anexial; (T) Via intracelular (ou transcelular).....	5
Figura 5 - Classificação das microemulsões quanto às fases dispersa e dispersante	13
Figura 6 - Esquema das nanoemulsões.....	14
Figura 7 - Preparação das microemulsões O/A e A/O/A. (A) Ultra-Turrax, IKA, T25 digital (Alemanha); (B) Ultrassons, SONICS, Vibra Cell (EUA); (C) Recipientes de vidro âmbar contendo as microemulsões preparadas.....	28
Figura 8 - Mastersizer 3000, Malvern (Reino Unido).....	30
Figura 9 - Potenciómetro, Hanna Instruments 2211 (EUA).....	31
Figura 10 - Centrífuga, Eppendorf AG 5804 (Alemanha).....	32
Figura 11 - Espectrofotómetro UV-Vis, Jasco V650 (Japão).....	33
Figura 12 - Processo de gelificação das microemulsões.....	34
Figura 13 - Comportamento reológico dos materiais.....	36
Figura 14 - Viscosímetro, Thermo Haake VT-550 (Alemanha).....	37
Figura 15 - Representação esquemática do gráfico Força <i>versus</i> Distância percorrida.....	38
Figura 16 - Texturómetro, Stable Micro Systems TA-XT2i (Reino Unido).....	39
Figura 17 - Aparelho de dissolução, Sotax AT7 (Suíça).....	40
Figura 18 - Aspeto final das microemulsões preparadas pelo método de sonicação.....	42
Figura 19 - Representação gráfica do Dv50 das gotículas da fase interna das microemulsões simples O/A sem albumina (MB1) e com albumina (M1).....	43

Figura 20 - Representação gráfica do Dv50 das gotículas da fase oleosa das microemulsões múltiplas A/O/A, preparadas com diferentes razões de tensioativo/co-tensioativo.....	44
Figura 21 - Representação gráfica do Dv50 das gotículas da fase oleosa das microemulsões múltiplas A/O/A, sujeitas a diferentes velocidades de agitação no Ultra-Turrax.....	46
Figura 22 - Representação gráfica do Dv50 das gotículas da fase oleosa das microemulsões múltiplas A/O/A, sujeitas a diferentes tempos de sonicação.....	47
Figura 23 - Representação gráfica do Dv50 das gotículas da fase interna da microemulsão simples O/A sem albumina (MB1) e da microemulsão múltipla A/O/A sem albumina (MB3_6), após preparação e ao fim de algum tempo de armazenamento.....	49
Figura 24 - Representação gráfica do Dv50 das gotículas da fase oleosa das microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina (MB3_6) e com albumina (M3_6), após preparação.....	50
Figura 25 - pH das microemulsões simples O/A sem albumina (MB1) e com albumina (M1), após preparação.....	51
Figura 26 - pH das microemulsões simples O/A sem albumina (MB1) e com albumina (M1), após 5 meses de armazenamento.....	52
Figura 27 - pH das microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina, após preparação.....	53
Figura 28 - pH das microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina, após 4 meses de armazenamento.....	54
Figura 29 - pH das microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina (MB3_6) e com albumina (M3_6), após preparação.....	55
Figura 30 - Resultado do ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação da microemulsão múltipla A/O/A sem albumina (MB3_6) (A) Após o 1º ciclo de centrifugação (B) Após o 2º ciclo de centrifugação.....	56
Figura 31 - Resultado do ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação da microemulsão múltipla A/O/A com albumina (M3_6) (A) Após o 1º ciclo de centrifugação (B) Após o 2º ciclo de centrifugação.....	57
Figura 32 - Curva de calibração das soluções de BSA.....	59

Figura 33 - Aspeto final das microemulsões simples (lado esquerdo da imagem) e múltipla (lado direito da imagem) gelificadas.....	61
Figura 34 - Reogramas da microemulsão A/O/A gelificada (ME gelificada) e da microemulsão O/A gelificada (MES gelificada), aos 8 e 30 dias de armazenamento.....	62
Figura 35 - Reogramas das microemulsões A/O/A gelificadas, com albumina (M3_6), aos 8 e 30 dias de armazenamento a 5 e 20°C.....	64
Figura 36 - Reogramas das microemulsões A/O/A gelificadas, sem albumina (MB3_6), aos 8 e 30 dias de armazenamento a 5 e 20°C.....	65
Figura 37 - Textura da microemulsão O/A gelificada (MES gelificada) e da microemulsão A/O/A gelificada (ME gelificada), avaliada quanto à firmeza e adesividade, aos 8 e 30 dias de armazenamento.....	67
Figura 38 - Textura das microemulsões A/O/A gelificadas, com albumina (M3_6), avaliada quanto à firmeza e adesividade, aos 8 e 30 dias de armazenamento a 5 e 20°C.....	69
Figura 39 - Textura das microemulsões A/O/A gelificadas, sem albumina (MB3_6), avaliada quanto à firmeza e adesividade, aos 8 e 30 dias de armazenamento a 5 e 20°C.....	71
Figura 40 - Perfil de libertação <i>in vitro</i> da albumina.....	74
Figura 41 - Fator de oclusão da vaselina e da microemulsão múltipla A/O/A gelificada (M3_6), ao fim de 24h.....	75

Índice de tabelas

Tabela I - Comparação geral entre as micro e as nanoemulsões.....	16
Tabela II - Lista de matérias - primas utilizadas no trabalho experimental.....	23
Tabela III - Lista de equipamento utilizado no trabalho experimental.....	24
Tabela IV - Fórmula da microemulsão O/A contendo albumina.....	26
Tabela V - Fórmula da microemulsão A/O/A contendo albumina.....	27
Tabela VI - Tamanhos das gotículas da fase interna das microemulsões MB1 e M1 (apresentados sob a forma de percentis e com os respectivos coeficientes de variação) e valor de <i>Span</i>	43
Tabela VII - Tamanhos das gotículas da fase interna das microemulsões MB2, MB3_1, MB3_2 e MB3_3 (apresentados sob a forma de percentis e com os respectivos coeficientes de variação) e valor de <i>Span</i>	44
Tabela VIII - Tamanhos das gotículas da fase interna das microemulsões MB3_1, MB3_4 e MB3_5 (apresentados sob a forma de percentis e com os respectivos coeficientes de variação) e valor de <i>Span</i>	45
Tabela IX - Tamanhos das gotículas da fase interna das microemulsões MB3_4, MB3_6 e MB3_7 (apresentados sob a forma de percentis e com os respectivos coeficientes de variação) e valor de <i>Span</i>	47
Tabela X - Tamanhos das gotículas da fase interna das microemulsões MB1 e MB3_6, após armazenamento (apresentados sob a forma de percentis e com os respectivos coeficientes de variação) e valor de <i>Span</i>	48
Tabela XI - Soluções padrão preparadas para a obtenção da curva de calibração da BSA em água e as respectivas médias das absorvâncias.....	58
Tabela XII - Teor de albumina (BSA) das microemulsões múltiplas A/O/A armazenadas a 5 e 20°C.....	60
Tabela XIII - [BSA] libertada e respectivas quantidades de proteína libertada ao longo das 4h.....	73

Lista de abreviaturas e símbolos

AH - Ácido Hialurónico

A/O - Água/Óleo

A/O/A - Água/Óleo/Água

BSA - Bovine serum albumin (Albumina de soro bovino)

EGF - Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidérmico)

FC - Fator de crescimento

FGF - Fibroblast growth factor (Fator de crescimento fibroblástico)

HE - Hematoxilina - eosina

IGF - Insulin-like growth factor (Fator de crescimento semelhante a insulina)

ME - Microemulsão

min - Minuto

N - Newton

O/A - Óleo/Água

PCL – Policaprolactona

PDGF - Platelet derived growth factor (Fator de crescimento derivado de plaquetas)

PEG - Polietilenoglicol

pH - Potencial Hidrogeniônico

PLGA - Ácido poli-láctico-co-glicólico

q.b.p - Quanto baste para

rpm - Rotações por minuto

TGF- β - Transforming growth factor beta (Fator beta de transformação do crescimento)

UV/Vis - Ultra-violeta/Visível

VEGF - Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento endotelial vascular)

1. Introdução

1.1. A pele humana

A pele é um órgão complexo que cobre toda a superfície do corpo humano, correspondendo a 15% do peso corporal total de um adulto (Kanitakis, 2002). É considerada o maior órgão do corpo humano e exerce múltiplas funções vitais, nomeadamente na proteção contra agressões físicas, químicas e biológicas externas, que são possibilitadas graças a uma estrutura elaborada que associa tecidos de várias origens (epitelial, conjuntivo, vascular, muscular e nervoso) (Kanitakis, 2002; Kolarsick *et al.*, 2011). Além de atuar como barreira entre o meio interno e externo e proteger o corpo humano de agressões externas, consegue manter a homeostasia do organismo, impedindo a perda de água e eletrólitos em excesso e regulando também a temperatura corporal (Roger *et al.*, 2019).

A pele humana organiza-se em três camadas (da mais externa para a mais interna): a epiderme (e os seus anexos associados, como os folículos pilossebáceos e as glândulas sudoríparas), a derme e a hipoderme, também conhecida como tecido subcutâneo (Kanitakis, 2002; Gordon, 2013; Watkins, 2013). A estrutura da pele e os seus anexos estão representados na Figura 1.

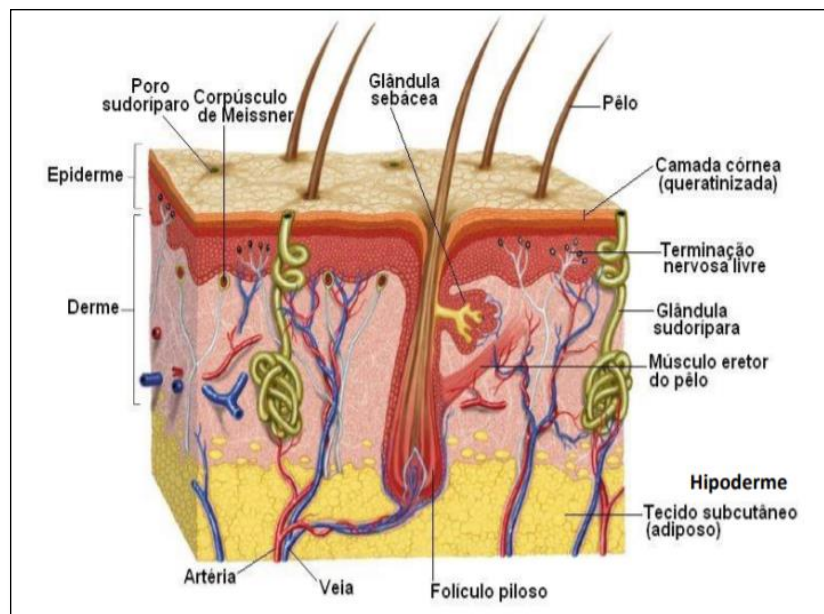


Figura 1 - Estrutura da pele e respetivos anexos. Fonte: Adaptado de Rod *et al.*, 2011.

A epiderme é constituída maioritariamente por epitélio queratinizado estratificado, sem presença de vasos sanguíneos e apresenta uma espessura variável entre 0,1 e 1,5 mm (Kanitakis, 2002). O epitélio epidérmico é dividido em 5 estratos (do mais externo para o mais interno): o estrato córneo; o estrato lúcido; o estrato granuloso; o estrato espinhoso e o estrato basal (Rod *et al.*, 2011) (Figura 2).

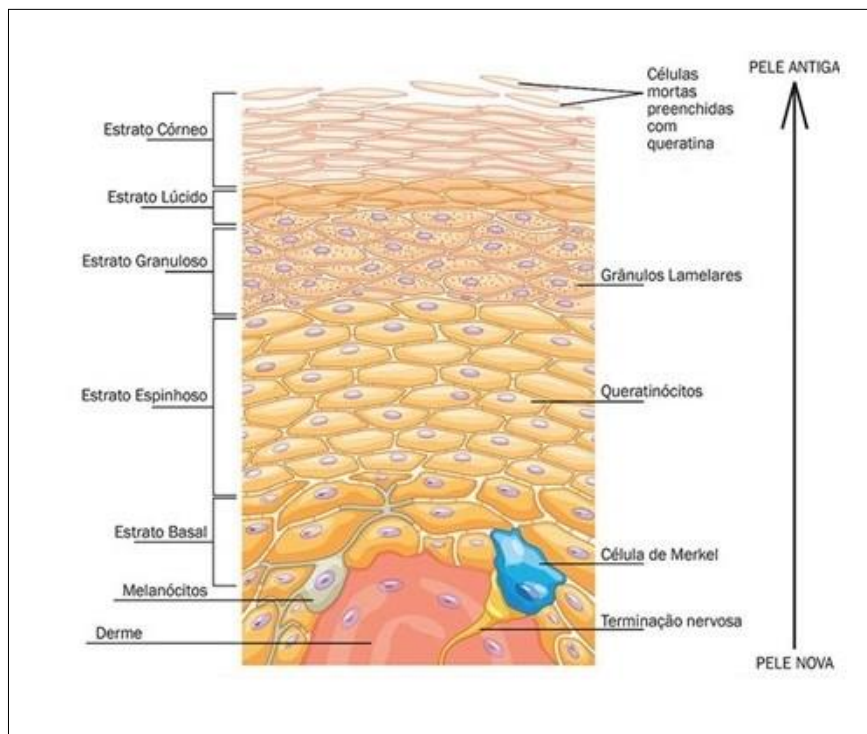


Figura 2 - Estratos da epiderme. **Fonte:** Adaptado de Rod *et al.*, 2011.

Esta camada é composta por vários tipos de células, onde a maioria delas (90-95%) são queratinócitos. Estas células epiteliais são submetidas a um processo de diferenciação específico, resultando na produção de células achatadas e anucleadas, os corneócitos, que vão sendo substituídos regularmente por descamação e renovação dos estratos epidérmicos inferiores (Kanitakis, 2002; Roger *et al.*, 2019).

Dentro das células epidérmicas que não são queratinócitos (5-10%), incluem-se principalmente as células de Langerhans, os melanócitos e as células de Merkel (Kanitakis, 2002). As células de Langerhans estão presentes nas camadas mais intermédias da epiderme, apresentam funções imunitárias e, por isso, são responsáveis pelos processos de hipersensibilidade cutânea. Os melanócitos estão localizados no estrato basal e são responsáveis pela produção de melanina, e desta forma, responsáveis também pela proteção da pele contra os raios ultravioleta (UV). As células de Merkel também estão localizadas no

estrato basal e encontram-se ligadas a terminais nervosos, apresentando assim uma função mais sensorial (Rod *et al.*, 2011).

A epiderme, além das células epidérmicas, também contém duas unidades estruturais distintas, isto é, a parte superficial das glândulas sudoríparas écrinas e a parte superficial dos folículos pilosos. Estas estruturas são constituídas por células epiteliais, mas têm propriedades biológicas próprias como a renovação, a diferenciação e a resposta a estímulos externos (Kanitakis, 2002). De uma forma geral, a epiderme desempenha várias funções vitais, tais como evitar a perda excessiva de água, evitar a entrada de microrganismos e proteger contra os raios UV (Rod *et al.*, 2011).

A derme está localizada logo abaixo da epiderme e é uma camada constituída por tecido conjuntivo, que consiste numa rede entrelaçada de colagénio e outras fibras elásticas. Além disso, é constituída por vasos sanguíneos, canais linfáticos, nervos e estruturas derivadas da epiderme, como os folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (Rod *et al.*, 2011; Kanitakis, 2002). Compreende a maior parte da espessura total da pele, variando entre 1 a 4 mm, e está unida à hipoderme, através da camada mais inferior (Silver *et al.*, 2001). A junção dermoepidérmica que separa a derme da epiderme facilita a troca regulada de substâncias, através de um mecanismo de difusão (Muroyama e Lechler, 2012).

Esta camada é composta por várias células, como os fibroblastos (sintetizam e restauram a matriz extracelular) e os macrófagos (eliminam material estranho e fragmentos de tecido danificado) (Kanitakis, 2002; Kolarsick *et al.*, 2011; Baroni *et al.*, 2012). Os fibroblastos produzem proteínas da matriz extracelular (PME), como o colagénio, a fibronectina e a elastina, que são responsáveis pela elasticidade, flexibilidade e resistência à tração da pele (Roger *et al.*, 2019).

A derme compreende duas camadas estruturalmente diferentes denominadas camada papilar e reticular (Rippa *et al.*, 2019) (Figura 3). A camada papilar está localizada mais próxima da superfície da pele. Na parte superior, está organizada em proeminências cónicas, chamadas de papilas dérmicas, que contêm terminações nervosas e vasos microvasculares, necessários para nutrição e inervação da epiderme (Schulze *et al.*, 1997; Stücker *et al.*, 2002). A derme papilar difere da reticular por ter uma maior densidade celular, um maior conteúdo de proteoglicanos e uma menor organização das fibras de colagénio e elastina (Mine *et al.*, 2008; Smith e Melrose, 2015; Meigel *et al.*, 1977).

Abaixo da camada papilar está a camada reticular, que é uma camada muito mais espessa, constituída por tecido conjuntivo. Além disso, contém fibras de elastina e colagénio, muito mais

organizadas, que conferem extensibilidade e resistência à pele. Os fibroblastos, os macrófagos e alguma gordura podem ser encontrados nesta camada (Kanitakis, 2002; Rippa *et al.*, 2019).

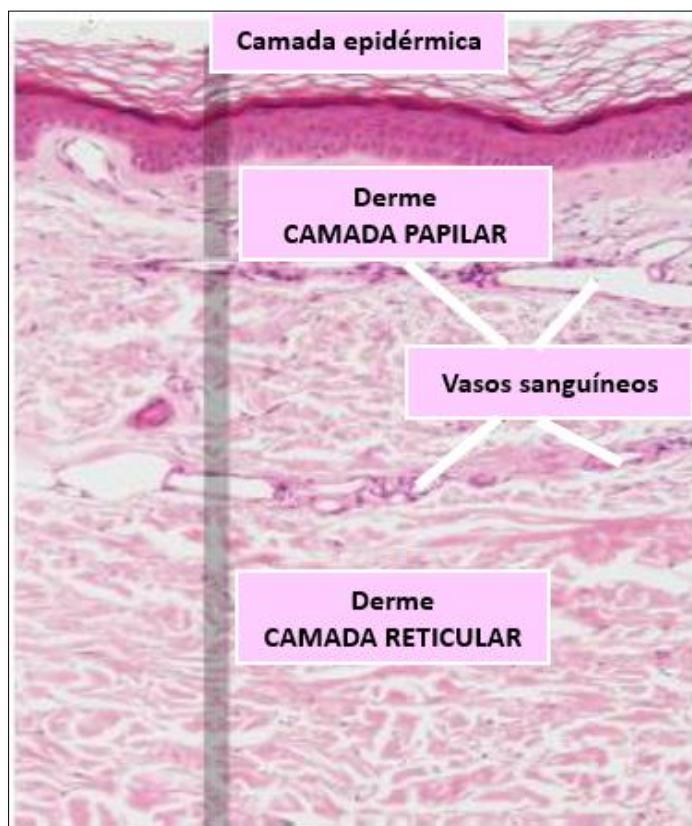


Figura 3 - Camadas da derme (corte histológico de pele humana – microscópio ótico (Coloração HE) (100x)). **Fonte:** Adaptado de Bringel, 2011.

A hipoderme é um tecido adiposo que constitui a parte mais profunda da pele. Esta camada desempenha um papel importante na termorregulação, isolamento, fornecimento de energia (reserva nutricional) e proteção contra lesões mecânicas (Kanitakis, 2002).

As principais células da hipoderme são os adipócitos, que são células grandes e arredondadas, que apresentam um citoplasma carregado de lípidos (triglicerídeos e ácidos gordos) que comprimem o núcleo contra a membrana celular (Kanitakis, 2002).

A espessura da hipoderme depende de vários fatores, como o sexo, a raça, a idade e o estado endócrino e nutricional da pessoa em questão (Rod *et al.*, 2011).

1.2. Administração cutânea de proteínas

A administração cutânea de substâncias ativas proporciona uma ação tópica mais ou menos profunda (Prista *et al.*, 2008). No caso de certas doenças dermatológicas, onde há necessidade de uma administração cutânea local, a substância ativa tem como objetivo atuar nos tecidos mais profundos da pele, necessitando de atravessar o estrato córneo para chegar ao seu local de ação. No caso de uma administração cutânea sistêmica, a substância ativa que é aplicada topicamente deve atingir a corrente sanguínea, sem que ocorra absorção ou formação de reservatórios na pele, uma vez que isso levaria a que a dose a atingir a corrente sanguínea fosse inferior à pretendida (Martins e Veiga, 2002; Prausnitz e Langer, 2008).

Dependendo das características físico-químicas das substâncias ativas e da ação que se pretende obter, a administração cutânea pode ser realizada através das formas farmacêuticas convencionais (pomadas, cremes, pastas e geles) ou utilizando sistemas de liberação transdérmica (Maibach, 1993; Prista *et al.*, 2008).

A penetração de moléculas através da pele pode assumir várias vias: a via intracelular (ou transcelular); a via intercelular ou a via anexial (Figura 4) (Singh *et al.*, 2013).

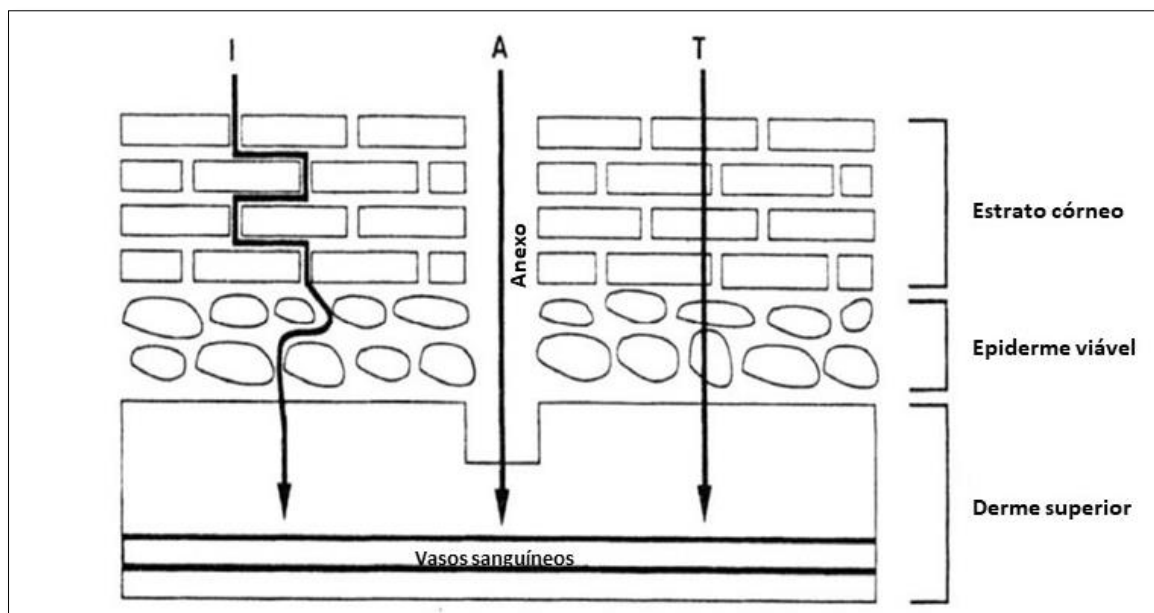


Figura 4 - Esquema representativo das vias de penetração das moléculas através da pele. **(I)** Via intercelular; **(A)** Via anexial; **(T)** Via intracelular (ou transcelular). **Fonte:** Adaptado de Singh *et al.*, 2013.

Através da via intracelular, penetram moléculas polares, enquanto através da via intercelular, penetram moléculas apolares, visto que estas apresentam afinidade lipídica, e assim, difundem-se lentamente ao longo dos espaços que existem entre as células. A via intercelular é considerada a principal via de penetração, embora muitas moléculas atravessem o estrato córneo e o resto das camadas por ambas as vias (Lopes e Souto, 2011).

A via anexial permite a penetração de moléculas através dos anexos da pele, como os folículos pilosos, as glândulas sudoríparas e as glândulas sebáceas. Neste caso, a penetração é mais rápida, visto que a superfície da epiderme é mais permeável nestes locais. Esta via é importante no caso de se querer administrar compostos ionizados e moléculas de elevado peso molecular, dado que estes atravessam dificilmente a pele (Kogan e Garti, 2006; Lopes e Souto, 2011).

Como exemplo das substâncias que apresentam muitas limitações em atravessar a barreira cutânea, temos as proteínas. As proteínas são moléculas complexas com elevado peso molecular e de natureza hidrófila. Os problemas de estabilidade, juntamente com a natureza complexa que estas macromoléculas apresentam, tornam muito difícil a sua administração através da pele (Kalluri e Banga, 2011).

O estrato córneo, sendo a camada mais externa da pele, atua como uma barreira limitadora no que concerne à administração cutânea de proteínas. Esta camada lipófila permite que apenas moléculas pequenas, potentes e moderadamente lipófilas atravessem passivamente até às camadas mais profundas da pele. Por isso, esta barreira limita consideravelmente a administração cutânea de proteínas, uma vez que o estrato córneo tem natureza lipídica e apresenta baixo teor em água (Kalluri e Banga, 2011; Stahl *et al.*, 2011).

Além de terem de superar a barreira do estrato córneo, as proteínas precisam de manter a sua estrutura para exercerem os seus respetivos efeitos farmacológicos. A pele possui enzimas proteolíticas que podem degradar as proteínas, mas já foi reconhecido que este órgão possui atividade proteolítica relativamente baixa quando comparado a outras vias de administração (Steinstrasser e Merkle, 1995).

Assim, é desejável que o sistema de administração (microemulsão, nanoemulsão, lipossoma, etc.) se assemelhe à composição da pele, ou seja, formulações com natureza lipídica, semelhantes aos lípidos fisiológicos do estrato córneo, são as mais apropriadas para este tipo de administração.

A administração cutânea de proteínas apresenta algumas vantagens relativamente à via oral e à via subcutânea, tais como (Yadav *et al.*, 2017; Russell-Jones e Himes, 2011):

- Evitar o efeito de primeira passagem no fígado;
- Permitir a administração de proteínas com tempos de semivida curtos e com janela terapêutica estreita;
- Melhorar a adesão terapêutica por parte do paciente;
- Maior biodisponibilidade;
- Diminuir os efeitos secundários.

Como desvantagens deste tipo de administração podem considerar-se (Barrie e Timothy, 1999; Russell-Jones e Himes, 2011):

- Propriedades de barreira da pele;
- Alteração da atividade biológica/farmacêutica das proteínas.

Assim, por exemplo, a administração cutânea de produtos biofarmacêuticos, devido à sua natureza proteica, enfrenta enormes desafios e, ao mesmo tempo, tem um potencial muito significativo para o tratamento não invasivo de doenças localizadas (Foldvari *et al.*, 2010).

Dentro das moléculas de natureza proteica, sabe-se que os fatores de crescimento (FC) desempenham um papel importante no processo de cicatrização da pele danificada (Gainza *et al.*, 2015). Dentro destas moléculas que atuam no processo de cicatrização, o fator de crescimento epidérmico (EGF) é um dos mais importantes na cicatrização ao nível da camada epidérmica. No subcapítulo seguinte, será abordado o papel de alguns destes fatores de crescimento na cicatrização e regeneração da pele.

1.3. Fatores de crescimento utilizados na cicatrização e regeneração da pele

Os fatores de crescimento (FC) são definidos como moléculas biologicamente ativas que são segregadas e que podem atuar em recetores específicos da superfície celular que, posteriormente, transmitem esses sinais celulares a outros componentes intracelulares (Naderali *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2018). São polipeptídeos biologicamente ativos que estão envolvidos no crescimento, diferenciação, proliferação, migração e metabolismo celular (Barrientos *et al.*, 2008). Cada FC tem um efeito mitogénico (promove a divisão celular) num conjunto característico de células. Enquanto alguns desses FC afetam apenas alguns tipos de células, a maioria estimula o crescimento de uma ampla variedade de células. Por isso, a capacidade dos fatores de crescimento para promover o crescimento celular acelerado, a diferenciação e/ou divisão celular, atraiu a atenção da indústria farmacêutica (Walsh, 2007).

O processo de cicatrização é complexo e ainda não está totalmente esclarecido. A zona de dano tecidual torna-se o foco de vários processos, geralmente começando com reações imunológicas e inflamatórias. As várias células envolvidas nesses processos, bem como as células adicionais que aparecem no local da ferida, também segregam vários FC, por isso, pode-se afirmar que todas as etapas do processo de cicatrização são controladas por uma ampla variedade destas moléculas (Gainza *et al.*, 2015; Walsh, 2007).

Estas moléculas são expressas não só pelas plaquetas e pelos macrófagos, como também pelas células epiteliais, e assim, estimulam o crescimento e a ativação de vários tipos de células, incluindo fibroblastos (que produzem precursores do colagénio, da elastina e da substância fundamental amorfa), células epiteliais e células endoteliais vasculares. Tais células promovem a cicatrização e processos como a granulação (crescimento de tecido conjuntivo e pequenos vasos sanguíneos na superfície de cicatrização) e a subsequente epitelização (Walsh, 2007). Por este motivo, os FC são considerados especialmente importantes na cicatrização de feridas porque desempenham um papel significativo no estímulo à formação de tecido, na modulação da resposta inflamatória e na promoção da angiogénese (Barrientos *et al.*, 2008).

As feridas podem ser categorizadas como: agudas (cicatrizando rapidamente por si só) ou crónicas (cicatrizando lentamente e geralmente exigindo medicação). Geralmente, as feridas crónicas ocorrem se algum fator, como a diabetes, interromper o processo normal de cicatrização (Walsh, 2007).

Os principais FC envolvidos na cicatrização da pele são: o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); o fator beta de transformação do crescimento (TGF- β); o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (Gainza *et al.*, 2015).

O PDGF tem como função principal estimular os macrófagos para produzirem e segregarem mais FC e ainda, melhorar a proliferação de fibroblastos e a respetiva formação da matriz extracelular. O TGF- β tem como objetivo aumentar a expressão de proteínas da matriz extracelular, a formação de tecido de granulação e a resistência à tração de feridas (Barrientos *et al.*, 2008; Werner e Grose, 2003). O VEGF, assim como o TGF- β , têm um papel importante na formação do tecido de granulação, e além disso, promovem a migração e a proliferação de células endoteliais (Barrientos *et al.*, 2008; Losi *et al.*, 2010). O FGF estimula a reepitelização, a formação de tecido de granulação e a remodelação da matriz extracelular (Barrientos *et al.*, 2008; Werner e Grose, 2003).

Como já referido anteriormente, o EGF tem um maior destaque, visto que atua mais ao nível da epiderme. Este FC tem a capacidade de promover a proliferação e a migração de queratinócitos e, portanto, a reepitelização da pele. Inclusivamente, estimula a produção de proteínas como a fibronectina e aumenta o número de fibroblastos no local a cicatrizar (Barrientos *et al.*, 2008; Tiaka *et al.*, 2012; Werner e Grose, 2003).

Sabe-se por exemplo que em feridas crónicas, os níveis de FC que são produzidos durante a cicatrização, descem consideravelmente. Deste modo, uma estratégia interessante para promover um aumento desses FC, é a sua administração externa (Gainza *et al.*, 2015). No entanto, os FC apresentam algumas limitações críticas devido à sua baixa estabilidade *in vivo*. Muitas proteases são ativadas no leito da ferida e podem facilmente degradar os FC produzidos fisiologicamente e os que são aplicados externamente por injeção ou topicamente (Mast e Schultz, 1996; Losi *et al.*, 2010; Mark e Baldwin, 1998).

Para superar as dificuldades anteriores, vários sistemas de administração foram desenvolvidos para melhorar a estabilidade dos FC no local da ferida, e assim, permitir uma libertação sustentada dos mesmos e uma otimização da eficácia do tratamento (Gainza *et al.*, 2015).

1.3.1. Nanossistemas utilizados na veiculação de fatores de crescimento

Este subcapítulo resume alguns dos nanossistemas desenvolvidos até ao momento para permitir uma libertação controlada de FC, neste caso o EGF, *in vitro* e *in vivo*, focando principalmente as micro e nanoesferas poliméricas, os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas, as nanofibras e as nanoemulsões.

As micro e as nanoesferas poliméricas são sistemas coloidais preparados com materiais naturais ou sintéticos, como o ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA), o alginato, a gelatina, o quitosano, além de outras combinações de polímeros (Degim, 2007; Ye *et al.*, 2010). Este tipo de polímeros é amplamente utilizado nestes sistemas para o tratamento da pele danificada porque permitem uma libertação controlada de substâncias ao longo do tempo, reduzem a degradação das mesmas pelas proteases, evitam a administração frequente e prolongam a eficácia do tratamento (Gainza *et al.*, 2013).

Estão descritas micro e nanoesferas poliméricas contendo polímeros como o PLGA, que posteriormente foram encapsuladas com o EGF. A administração destes sistemas na pele danificada foi feita topicamente, uma vez por dia. As micro e as nanoesferas contendo PLGA, melhoraram a taxa de crescimento dos fibroblastos e a cicatrização da pele foi mais eficaz do que o EGF livre (Dong *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2010). Gaiza e os seus colaboradores desenvolverem microesferas poliméricas contendo PLGA e alginato. Estes sistemas foram administrados em dose única no interior das lesões, melhorando a cicatrização, a reepitelização e o próprio processo inflamatório, comparativamente com o EGF livre (Gaiza *et al.*, 2013).

Os lipossomas foram desenvolvidos como uma alternativa para a aplicação de substâncias na pele devido à sua excelente tolerabilidade (Müller *et al.*, 2002). Apesar disso, estes sistemas apresentam algumas desvantagens, visto que existem alguns problemas de estabilidade associados que podem causar a libertação descontrolada das substâncias encapsuladas e também uma baixa reprodutibilidade (Ming-Ren e Chiu, 2013).

Existem poucos estudos relativos ao desenvolvimento de lipossomas contendo FC para promover a cicatrização cutânea, no entanto, está descrito um estudo no qual o EGF foi encapsulado em lipossomas e foi administrado topicamente, numa única administração, tendo-se mantido estável *in vivo* e *in vitro* após aplicação na pele danificada (Brown *et al.*, 1988). Estes dados sugerem que o encapsulamento do FC pode ter melhorado a eficácia do tratamento (Almeida e Souto, 2007).

Para superar algumas limitações que os lipossomas apresentam, foram desenvolvidas nanopartículas lipídicas sólidas, que além de exibirem melhores características, são fáceis de preparar (Müller *et al.*, 2002). Estes sistemas, quando aplicados topicamente duas vezes por semana, mostraram que o processo de encapsulamento não afetou a atividade biológica do EGF, pois as nanopartículas melhoraram a proliferação dos queratinócitos e dos fibroblastos *in vitro*, em comparação com a forma livre de EGF (Gainza *et al.*, 2014).

Diferentes estudos encontraram evidências do uso de nanofibras na libertação controlada de FC para a cicatrização da pele. A estimulação elétrica e a terapia da luz mostraram resultados promissores na cicatrização da pele e, por isso, as nanofibras a usar, poderiam conter combinações de materiais fotossensíveis e polímeros comuns (Gainza *et al.*, 2015). Foram preparadas nanofibras usando a combinação de dois polímeros, sendo estes o polietilenoglicol (PEG) e a policaprolactona (PCL). Num primeiro estudo, os investigadores concluíram que essa combinação de polímeros com o EGF encapsulado, usada topicamente, uma vez por semana, resultou num aumento da expressão de queratina nos queratinócitos e numa cicatrização superior, relativamente aos controlos (Choi *et al.*, 2008). Já quando imobilizaram o EGF à superfície das nanofibras, repararam que a libertação de EGF foi prolongada durante o processo de cicatrização, e além disso, houve um aumento da acumulação de colagénio na pele danificada, em comparação com os controlos (Choi *et al.*, 2011).

Choi e os seus colaboradores (2017) desenvolveram um hidrogel à base de uma nanoemulsão para administração tópica, que continha várias combinações de análogos de EGF, PDGF e IGF (fator de crescimento semelhante a insulina). Estes investigadores repararam que essas combinações tornaram a pele mais permeável, permitindo uma atividade sinérgica de cicatrização na mesma. Portanto, este tipo de sistema pode ser candidato a uma terapia eficaz de cicatrização de feridas que pode atuar simultaneamente nas diferentes fases de cicatrização e em vários tipos de feridas.

Convém referir que não foram encontrados na literatura estudos que abordem a utilização de microemulsões como sistemas para a libertação de fatores de crescimento (neste caso o EGF) no processo de cicatrização e regeneração da pele e, por isso, com este trabalho pretende-se desenvolver sistemas deste tipo.

1.4. Micro e nanoemulsões

1.4.1. Definição

As microemulsões são compostas por gotículas nanométricas de um líquido imiscível disperso noutro líquido. São sistemas que apresentam um tamanho de gotícula, geralmente até aos 300 nm, mas ainda não há um consenso quanto à definição destes sistemas por parte de diversos autores. Estes sistemas podem formar uma ou várias fases que estão em equilíbrio entre si. Para a caracterização destes sistemas, ensaios analíticos comuns como a microscopia de luz invertida, a condutividade elétrica e a reologia são geralmente utilizados no estudo das microemulsões (McEvoy *et al.*, 2000).

Os principais componentes que podem estar presentes numa microemulsão são: água; óleos, tensoativos e co-tensoativos. Os dois últimos componentes atuam para estabilizar as gotículas das microemulsões, sendo capazes de diminuir a tensão interfacial entre a fase dispersa e a fase dispersante (McEvoy *et al.*, 2000). Para além disso, as microemulsões requerem uma grande quantidade de tensoativos, o que pode resultar num potencial aumento da irritação cutânea (Lakshmi *et al.*, 2013).

Em teoria, as microemulsões formam-se espontaneamente, sem fornecimento de qualquer tipo de energia. No entanto, na prática, o fornecimento de energia (agitação) facilita a formação destes sistemas (McClements, 2012). As microemulsões diferem significativamente das emulsões convencionais devido às suas propriedades físicas (transparência ou translucidez, baixa viscosidade, tamanho de gotícula pequeno). Enquanto as microemulsões são termodinamicamente estáveis, as gotículas das emulsões podem sofrer coalescência ao longo do tempo, e conseqüentemente levar à separação de fases, o que torna as emulsões termodinamicamente mais instáveis (Lu e Gao, 2010). A estrutura das microemulsões dificulta a área de contato desfavorável entre os grupos apolares e a água, o que favorece a termodinâmica do sistema coloidal. Isso significa que as microemulsões não sofrerão qualquer modificação, enquanto as condições de armazenamento permanecerem constantes ao longo do tempo (McEvoy *et al.*, 2000).

Em termos gerais, existem diferentes tipos de microemulsões, dependendo da composição, da razão entre compostos e dos arranjos das moléculas dos componentes presentes (Kogan e Garti, 2006). Estes sistemas podem ser do tipo A/O, O/A ou sistemas bicontínuos. As microemulsões água em óleo (A/O) contêm gotículas de água envolvidas por uma fase contínua

oleosa, enquanto as microemulsões óleo em água (O/A) são compostas por gotículas de óleo envolvidas por uma fase contínua aquosa. No caso dos sistemas bicontínuos, tanto o óleo como a água apresentam-se como fases contínuas. Nestes sistemas, as gotículas são estabilizadas pelo tensioativo e pelo co-tensioativo, que atuam para reduzir a tensão interfacial entre as duas fases para aproximadamente zero (McEvoy *et al.*, 2000).

A Figura 5 mostra a representação esquemática dos três tipos de microemulsões.

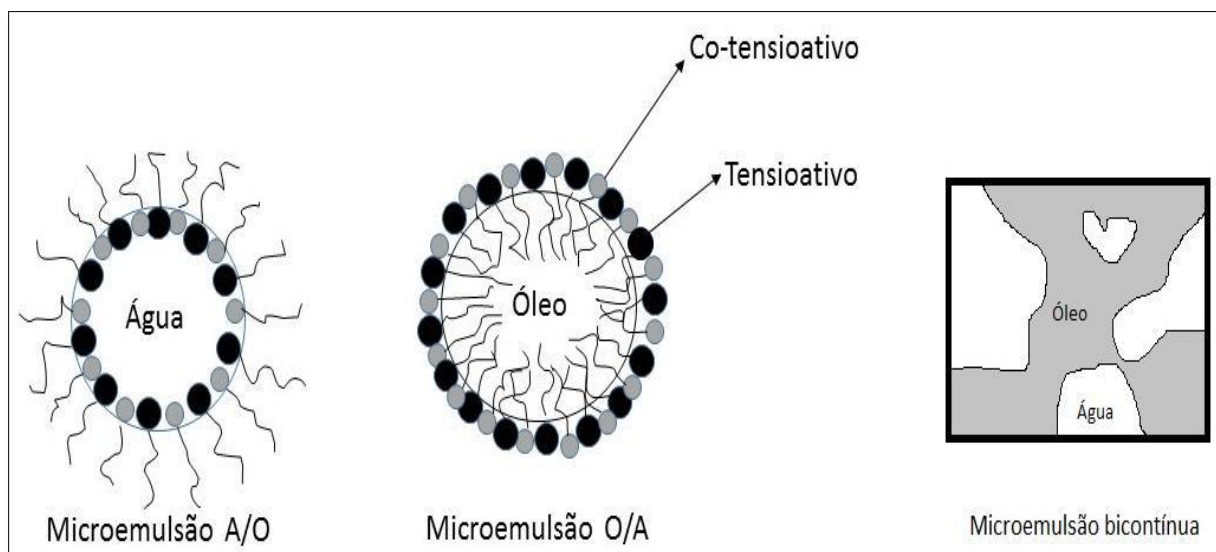


Figura 5 - Classificação das microemulsões quanto às fases dispersa e dispersante. **Fonte:** Adaptado de Lawrence e Rees, 2000.

As microemulsões tendem a aumentar a permeabilidade cutânea das substâncias ativas como resultado da interação destas com o estrato córneo. O que acontece é que há alteração da organização estrutural das camadas lipídicas do estrato córneo e alteração do coeficiente de partilha da substância em relação à pele, agindo assim as microemulsões como promotores de penetração cutânea (Singh *et al.*, 2013). Além disso, são capazes de aumentar a capacidade de hidratação dos tecidos cutâneos, o que por si só tem um efeito de aumento da penetração das substâncias ativas através da pele (Lopes, 2014).

A solubilização de uma ampla gama de substâncias ativas deve-se à presença de grandes frações das fases lipófila e hidrófila e à organização estrutural de ambas as fases (Shinoda e Lindman, 1987; Malcolmson e Lawrence, 1990).

As nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, formados a partir de dois líquidos imiscíveis que são estabilizados por tensioativos e co-tensioativos. Estes sistemas

normalmente apresentam um tamanho de gotícula inferior a 250 nm (Jain *et al.*, 2013; Haritha *et al.*, 2013; Lopes, 2014).

Teoricamente, uma nanoemulsão pode ser formada a partir de óleo e água, sem o uso de tensioativos, mas na prática este sistema seria altamente instável devido à coalescência das gotículas da fase interna. Por isso, torna-se necessário usar um tensioativo para facilitar a formação da nanoemulsão e garantir a sua estabilidade durante o armazenamento (McClements, 2005). As nanoemulsões apresentam a vantagem de serem formadas com quantidades menores de tensioativos, mas a preparação de nanoemulsões estáveis geralmente requer métodos de preparação caros para fornecer energia (McClements, 2012).

Portanto, uma nanoemulsão é geralmente preparada usando os mesmos componentes que uma microemulsão: óleo, água, tensioativo e possivelmente um co-tensioativo. A estrutura das gotículas numa nanoemulsão também é semelhante à encontrada numa microemulsão: as caudas não polares das moléculas de tensioativo projetam-se para o núcleo hidrofóbico formado pela fase oleosa, enquanto os grupos de cabeças polares das moléculas de tensioativo projetam-se para o meio aquoso circundante (Figura 6) (McClements, 2012).

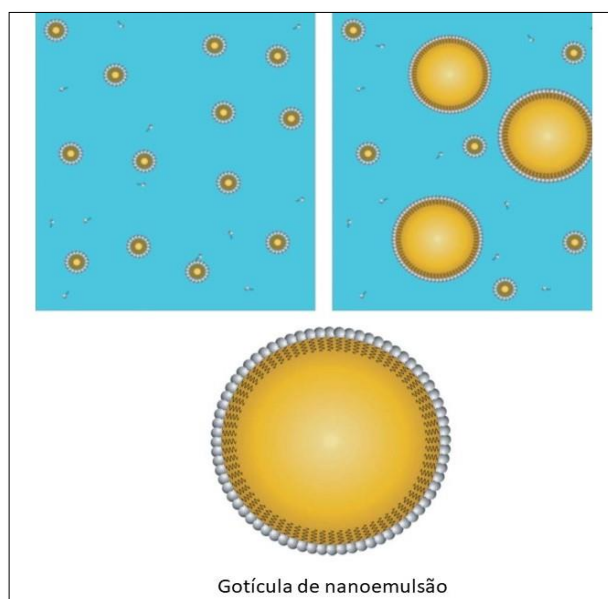


Figura 6 - Esquema das nanoemulsões. **Fonte:** Adaptado de McClements, 2012.

As nanoemulsões podem ser do tipo A/O, O/A ou sistemas bicontínuos, tal como as microemulsões. Nos três tipos de nanoemulsões, a interface é estabilizada por uma combinação apropriada de tensioativos e/ou co-tensioativos (Sole *et al.*, 2010; Amin e Das, 2019).

As nanoemulsões podem ser obtidas por métodos de baixa ou alta energia. Os métodos de alta energia que incluem homogeneizadores de alta pressão ou ultrassons promovem a deformação e a diminuição do tamanho das gotículas. Além disso, a diminuição do tamanho das gotículas, também pode ocorrer devido ao aumento da quantidade de tensioativo que é usada durante a formação do sistema. Nos métodos de baixa energia, as propriedades físico-químicas do sistema são utilizadas para alterar a curvatura espontânea das gotículas formadas pelo tensioativo. A diminuição do tamanho pode ser feita pela variação de temperatura ou variação da composição durante a preparação (Fernandez *et al.*, 2004; Rocha-Filho *et al.*, 2014).

A estabilidade física a longo prazo das nanoemulsões é uma consequência direta do tamanho pequeno das gotículas, o que afeta os fenômenos de desestabilização convencionais como a sedimentação e a coalescência. Quando administradas topicamente, o tamanho das gotículas da nanoemulsão e a sua capacidade de solubilizar compostos muito hidrófobos, conseguem aumentar drasticamente a taxa de dissolução da substância incorporada (Jaiswal *et al.*, 2015).

Como já referido anteriormente, as nanoemulsões e as microemulsões são dispersões coloidais com muitas semelhanças. Estes sistemas apresentam tamanhos de gotículas da fase interna baixos e os componentes usados na preparação e as suas estruturas são sensivelmente semelhantes (Anton e Vandamme, 2011).

Estes nanossistemas podem oferecer vantagens significativas na veiculação de moléculas hidrófobas e hidrófilas, aumentando a sua solubilidade e, portanto, a sua biodisponibilidade. Enquanto as emulsões convencionais têm aparência cremosa e tendem a aderir bem à pele, as micro e nanoemulsões são mais fluidas. Para obterem uma consistência apropriada e haver uma maior adesão à pele, é adicionado um polímero a estes sistemas que aumenta a viscosidade, para dessa forma se formar um gel (Nastiti *et al.*, 2017).

É possível preparar os dois sistemas recorrendo exatamente aos mesmos excipientes, mas em diferentes proporções. Normalmente, para preparar uma microemulsão é necessária uma maior proporção do agente tensioativo em relação ao óleo do que no caso de uma nanoemulsão (Anton e Vandamme, 2011).

Estes sistemas também diferem quando expostos a flutuações de temperatura. As microemulsões são potencialmente afetadas por mudanças de temperatura, enquanto as nanoemulsões permanecerão estáveis sob este tipo de stresse físico (McClements, 2012).

Outra diferença a realçar é que as microemulsões apresentam uma grande estabilidade termodinâmica, ao contrário das nanoemulsões (McClements, 2012). E por outro lado, ao

contrário das microemulsões, a preparação de nanoemulsões requer sempre um fornecimento elevado de energia externa para converter os componentes (antes separados) numa dispersão coloidal (Anton e Vandamme, 2011). A comparação geral entre as micro e as nanoemulsões está sumarizada na Tabela I.

Tabela I - Comparação geral entre as micro e as nanoemulsões (Lopes, 2014; McEvoy *et al.*, 2000 e McClements, 2012).

Parâmetro	Microemulsão	Nanoemulsão
Tipo de dispersão	Coloidal	Coloidal
Tamanho das gotículas da fase interna	Até 0,30 µm	Até 0,25 µm
Estabilidade termodinâmica	Estável	Instável
Formação	Espontânea*	Requer energia
Composição	Requer grandes quantidades de tensioativo e co-tensioativo	Requer pouca quantidade de tensioativo
Consistência	Fluída	Fluída

* Na teoria, as microemulsões formam-se espontaneamente, mas na prática é preciso fornecer, por exemplo agitação, para haver a formação da microemulsão.

1.4.2. Aplicação de micro e nanoemulsões na cosmética e na dermofarmácia

As micro e as nanoemulsões têm ganho crescente interesse devido às suas inúmeras vantagens em relação às formulações convencionais, uma vez que são sistemas coloidais estáveis, compostos por óleo e água, estabilizados por uma mistura de tensioativos e co-tensioativos (Nastiti *et al.*, 2017).

Estes sistemas são capazes de solubilizar compostos hidrófilos e lipófilos (Azeem *et al.*, 2008) e são capazes de aumentar a penetração de compostos através da pele (Neubert, 2011). Com essas vantagens, existe a intenção de manipular os componentes e as características da formulação para obter uma biodisponibilidade ideal e uma irritação mínima da pele. Inclui-se assim, a incorporação de componentes nestes sistemas que ajudem a desorganizar as bicamadas lipídicas do estrato córneo, reduzindo assim a barreira primária da pele e aumentando a permeação através da mesma (Nastiti *et al.*, 2017). Acredita-se que estes nanossistemas são adequados para a preparação de vários tipos de formulações que podem ser usadas na cosmética e na dermofarmácia. As formulações mais recentes apresentam elevada capacidade de hidratação e rápida penetração cutânea, quando usadas topicamente (Azeem *et al.*, 2008).

Além de já existirem estudos relativamente à veiculação de várias moléculas, também já se encontram alguns estudos relativamente à veiculação de proteínas e peptídeos em microemulsões, que podem ser utilizadas em produtos cosméticos ou dermofarmacêuticos, embora este número ainda seja reduzido. Segundo Russell-Jones e Himes (2011), as microemulsões A/O apresentam-se como um meio eficaz de administração tópica de peptídeos e proteínas de todos os tamanhos e em concentrações elevadas. Estes investigadores concluíram que os custos de desenvolvimento destas formulações são baratos, a estabilidade das mesmas é alta e, por isso, torna-se possível fornecer peptídeos e proteínas à pele de uma forma indolor e na quantidade desejada.

Getie e os seus colaboradores (2005) veicularam a desmopressina, que é um peptídeo pequeno que normalmente é utilizado no tratamento da diabetes *insipidus*, em microemulsões A/O e em cremes. As microemulsões obtidas libertaram com sucesso cerca de 6% da desmopressina, enquanto os cremes libertaram apenas 2% da desmopressina, num período de 300 min. Além disso, a substância ativa ficou localizada em maior quantidade na superfície da pele tratada com os cremes, enquanto as microemulsões foram capazes de libertar a desmopressina com maior profundidade através da pele. Este estudo não apenas validou a

capacidade das microemulsões como um potencial sistema transdérmico para ser usado em dermofarmácia, mas também reivindicou a sua superioridade em relação aos cremes ou às formas farmacêuticas semissólidas em geral, na administração de substâncias ativas na pele.

A insulina é uma hormona peptídica que é utilizada no tratamento da diabetes do tipo I ou diabetes *mellitus*, sendo a via subcutânea a preferencialmente usada para a sua administração. Malakar e os seus colaboradores (2011) decidiram desenvolver microemulsões com insulina incorporada e de certa forma perceber se era possível administrar insulina de forma indolor. Os resultados mostraram que a penetração na pele da insulina aumentou e, por isso, seria possível administrar a insulina transdermicamente no tratamento da diabetes *mellitus* e além disso, haveria uma melhor adesão por parte dos doentes.

A ciclosporina é um peptídeo cíclico imunossupressor que normalmente é administrado por via oral no tratamento de doentes que sofrem da psoríase mais severa. Se a aplicássemos topicamente, poder-se-ia evitar problemas relacionados à imunossupressão sistémica, mas as propriedades físico-químicas desfavoráveis, como o seu peso molecular, impedem a sua penetração através do estrato córneo. Assim, Benigni e os seus colaboradores (2018) desenvolveram microemulsões com uma viscosidade adequada de forma a administrar a ciclosporina através da pele e concluíram através dos resultados obtidos que estes sistemas poderiam contribuir para otimizar a terapia tópica da psoríase.

Drogul e os seus colaboradores (2014) desenvolveram microemulsões A/O contendo lidocaína, que é um anestésico de uso local muito utilizado em caso de dor localizada, e compararam a sua eficácia anestésica local com alguns produtos comerciais já existentes. Estes investigadores concluíram que estas microemulsões, contendo Miglyol® como fase oleosa e lecitina como tensioativo, apresentavam uma eficácia superior em termos de efeito anestésico local na pele e concluíram que este tipo de microemulsão A/O tem potencial para se tornar num sistema para veicular não apenas a lidocaína, mas também outras substâncias ativas solúveis em água.

As microemulsões têm vindo a ser utilizadas em formulações para o cuidado da pele. Bauer e os seus colaboradores (2002) desenvolveram microemulsões O/A, que continham um éster de poliglicerol como tensioativo e uma substância lipófila na fase interna. Essa substância era constituída por um grupo de carotenóides, especialmente beta-caroteno, vitaminas A, D, E, K e seus derivados e ácidos gordos polinsaturados. Verificou-se que ao adicionar esta microemulsão a determinados produtos cosméticos, a substância lipófila que foi adicionada, seria útil no tratamento de rugas e queimaduras. Como se sabe, o estrato córneo da pele, que tem características lipófilas, é a principal barreira para moléculas hidrófilas como o ácido hialurónico (AH) e o colagénio (Bouwstra *et al.*, 2003). Com o passar do tempo, a pele vai

envelhecendo e a produção dessas moléculas na derme vai diminuindo progressivamente. Por isso, uma das estratégias que se está a tentar implementar, é a encapsulação do AH e do colagénio em microemulsões, para melhorar o transporte e a libertação dessas moléculas na pele e assim retardar o envelhecimento cutâneo (Kupper *et al.*, 2017). Kupper e os seus colaboradores (2017) prepararam microemulsões A/O e avaliaram a capacidade destas para encapsular colagénio e AH, com diferentes pesos moleculares e, pela primeira vez, estas moléculas foram encapsuladas com sucesso em microemulsões. Além disso, verificou-se que a capacidade de solubilização das microemulsões relativamente aos polímeros dependeu fortemente da proporção e da quantidade dos tensioativos na mistura.

Carlotti e os seus colaboradores (2003) também preparam microemulsões O/A, tendo obtido formulações transparentes, com boa espalhabilidade, não gordurosas, à prova de água e compatíveis com a pele, que poderiam ser depois utilizadas como veículo para filtros solares.

Aggarwal e os seus colaboradores (2013) desenvolveram microemulsões O/A contendo griseofulvina que poderiam ser usadas topicamente no tratamento da dermatofitose, que é uma infeção fúngica da pele. Os resultados demonstraram que as microemulsões obtidas tinham um papel eficaz na administração da griseofulvina e, assim, no futuro haver elaboração de estudos clínicos e de estabilidade para o desenvolvimento de formulações tópicas comercialmente viáveis de microemulsões contendo griseofulvina.

Langasco e os seus colaboradores (2018) formularam microemulsões A/O com propionato de clobetasol, que poderiam ser utilizadas no tratamento da psoríase, já que os produtos comercializados que existem têm vindo a mostrar uma eficácia baixa. Concluíram que a eficácia da libertação do propionato de clobetasol combinada com as propriedades dos componentes da microemulsão melhorou. Além disso, houve uma redução dos efeitos adversos que normalmente estão associados aos corticosteróides.

Existe um grande número de formulações cosméticas comercializadas à base de microemulsões. De facto, a Avon, a L'Óreal e a Revlon (entre muitas outras marcas) possuem patentes sobre o uso de microemulsões para cuidados da pele, cabelos e unhas. Microemulsões contendo silicones fazem parte de produtos para o cabelo da marca Kérastase. Existe também comercializada uma microemulsão com efeito antirrugas à base de acetil-hexapeptídeo-3 (Auriga Int, Bélgica) (Lopes, 2014).

As nanoemulsões também possuem uma ampla gama de possibilidades para aplicações inovadoras nos campos cosmético e dermofarmacêutico (Yukuyama *et al.*, 2016). Syed Azhar e os seus colaboradores (2018) formularam nanoemulsões O/A contendo ésteres derivados do ácido kójico, para poderem ser utilizadas no tratamento de doenças relacionadas com a

produção anormal de melanina, como a hiperpigmentação. As nanoemulsões obtidas mostraram excelentes resultados ao nível da toxicidade e, por isso, acredita-se que poderiam ser potencialmente utilizadas no tratamento da hiperpigmentação. Já Atrux-Tallau e os seus colaboradores (2014) prepararam nanoemulsões contendo alcaçuz, que pode também funcionar como agente despigmentante. Estas nanoemulsões foram preparadas com quatro tipos de ligandos diferentes (um peptídeo de palmitoil, uma molécula de AH lipídica e dois ativos anfífilos, a polidatina e a isopilosina), para assim conseguirem-se ligar aos recetores dos melanócitos e atuar na inibição da melanina. Estes investigadores concluíram que a biodisponibilidade do alcaçuz incorporado foi superior no caso das nanoemulsões contendo o ligando de AH lipídico e demonstraram que foi possível direcionar nanoemulsões para os melanócitos e, conseqüentemente, aumentar a biodisponibilidade de substâncias ativas encapsuladas *in vitro*.

Yousef e os seus colaboradores (2019) desenvolveram uma série de nanoemulsões contendo curcumina, usando diferentes tensioativos e óleos que proporcionassem uma boa estabilidade a longo prazo e melhorassem a solubilidade deste composto. Escolheram a curcumina, que tem funções antioxidantes e anti-inflamatórias, porque esta pode ser potencialmente útil no tratamento da psoríase e do melanoma. Concluíram que as nanoemulsões obtidas melhoraram a solubilidade e a penetração da curcumina na pele, devido a uma redução da barreira do estrato córneo.

Leão e os seus colaboradores (2019) desenvolveram nanoemulsões O/A contendo óleo de buriti. Este óleo é rico em ácido oleico e outros compostos que podem exercer uma atividade antimicrobiana e também antioxidante, e assim poder ter aplicações na cosmética e na dermofarmácia. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos dos óleos interesterificados (modificados quimicamente) e não interesterificados nas propriedades físico-químicas e biológicas das nanoemulsões. O que concluíram de uma maneira geral, foi que a interesterificação melhorou a atividade antioxidante e, em menor grau, a ação antimicrobiana do óleo de buriti incorporado nas nanoemulsões.

Mitri e os seus colaboradores (2011) incorporaram luteína, que é um antioxidante natural que pode ser utilizado na proteção da pele contra danos solares, em nanoemulsões. Concluíram que estes sistemas apresentaram um alto perfil de libertação de luteína e um bom perfil de penetração na derme. Estas nanoemulsões foram capazes de proteger a luteína contra a degradação por raios UV, exibindo assim um bom aprimoramento na fotoestabilidade da luteína. Já Butnariu e Giuchici (2011) desenvolveram nanoemulsões à base de extratos aquosos de própolis e licopeno, uma vez que estes têm um papel importante nos mecanismos de proteção da pele contra a radiação UV. Os seus resultados mostraram que as nanoemulsões

forneceram uma libertação sustentada de própolis e licopeno *in vitro*. As nanoemulsões, quando aplicadas na pele com irritação, induziram uma redução na atividade da colagenase e a própria inflamação diminuiu. Este estudo demonstrou que estes sistemas podem conferir melhores efeitos terapêuticos do que as formulações convencionais, o que provavelmente melhora a sua eficácia.

Arianto e Cinty (2019) desenvolveram nanoemulsões contendo óleo de girassol, de modo a estudar a utilização destas como filtro solar, uma vez que este óleo contém vitamina E, que é normalmente utilizada na cosmética como antioxidante. Avaliaram a estabilidade das mesmas e determinaram o fator de proteção solar, por meio de métodos espectrofotométricos *in vitro*. Estes investigadores chegaram à conclusão de que as nanoemulsões preparadas apresentavam uma boa estabilidade, sem separação de fases, e uma possível eficácia para serem usadas como filtro solar.

A aplicação das nanoemulsões como sistemas de veiculação de óleos essenciais, aromas e fragrâncias está a ganhar interesse por parte da indústria cosmética. Graças às características que estas apresentam, as nanoemulsões ganham interesse na veiculação de fragâncias e óleos essenciais, uma vez que podem ser uma ótima alternativa para perfumes à base de água, sem álcool, e ainda resolver problemas relacionados com a oxidação, baixa biodisponibilidade e baixa estabilidade de certas fragrâncias. Miastkowska e os seus colaboradores (2018) decidiram desenvolver nanoemulsões O/A compatíveis com composições de fragrâncias selecionadas, sem álcool, polióis e tensioativos iónicos, e estudar as propriedades físico-químicas, microbiológicas e dermatológicas destes sistemas. Concluíram que as nanoemulsões obtidas eram compatíveis com as fragâncias utilizadas e, por isso, apresentavam uma grande estabilidade química. Também apresentavam baixa viscosidade, pH compatível com a pele e contaminação microbiológica nula. Os resultados dermatológicos deste estudo confirmaram a segurança das formulações desenvolvidas e, dessa forma, num futuro próximo quando pudessem ser comercializadas, poderiam ser utilizadas por pessoas com tendência para alergias e com pele sensível.

Já existem algumas nanoemulsões que estão a ser comercializadas no mercado cosmético. A empresa Mibelle AG Bioquímica (Suíça) desenvolveu o *SunActin*® que contém um extrato orgânico de raízes de girassol que foi combinado com vitamina E natural numa nanoemulsão. Este produto protege a pele contra o stresse oxidativo e neutraliza os efeitos oxidativos da radiação UVA e UVB (responsável por 80% do envelhecimento da pele), aumentando o fator de proteção solar. A empresa Biofrontera (Alemanha) desenvolveu o *Ameluz*® que contém ácido aminolevulínico numa nanoemulsão composta por fosfatidilcolina de soja, água, polissorbato, propilenoglicol e álcool isopropílico para o tratamento da queratose actínica. Já a

empresa Novavax (Estados Unidos da América) criou o *Estrasorb*® que contém estradiol hemihidrato, numa nanoemulsão composta por óleo de soja, água, polissorbato 80 e etanol, sendo este produto de dose única para aplicação nas pernas, no tratamento de sintomas vasomotores associados à menopausa (Nastiti *et al.*, 2017).

As micro e as nanoemulsões têm ganho interesse na veiculação de ingredientes ativos, através ou não da pele, para uma variedade de finalidades. Além disso, o desenvolvimento de novos ingredientes ativos com potencial utilidade na cosmética e dermofarmácia, continua a oferecer novas oportunidades para o desenvolvimento de formulações com alta capacidade de veiculação, baixa irritação e toxicidade (Nastiti *et al.*, 2017).

1.5. Objetivos do trabalho

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver microemulsões que pudessem conter fatores de crescimento para serem utilizadas na cicatrização e regeneração da pele, tendo sido utilizada a albumina (BSA) como proteína modelo. Neste sentido, pretendeu-se:

- Preparar diferentes tipos de microemulsões (O/A e A/O/A) com e sem albumina;
- Caracterizar e avaliar a estabilidade das microemulsões com e sem albumina (análise organolética, tamanho das gotículas da fase interna, pH, estabilidade acelerada por centrifugação e teor de albumina);
- Preparar microemulsões gelificadas com e sem albumina;
- Caracterizar e avaliar a estabilidade das microemulsões gelificadas com e sem albumina (análise organolética, reologia, textura, libertação *in vitro* de albumina e teste de oclusão).

2. Parte Experimental

2.1. Matérias-primas e equipamento

2.1.1. Matérias-primas

Durante a realização deste trabalho experimental foram utilizadas as seguintes matérias-primas (Tabela II):

Tabela II - Lista de matérias-primas utilizadas no trabalho experimental.

Matéria - prima	Lote	Origem
Água purificada	-	Lab. Tecnologia Farmacêutica
Albumina bovina (BSA)	SLBV4994	Sigma-Aldrich
Miristato de Isopropilo	180724-P-1	Acofarma
Tween® 80	180974-P-2	Acofarma
Span® 80	181070	Acofarma
Glicerina	171471-P-1	Acofarma
Imidureia	9095300035	Guinama
Agente gelificante PFC®	87540000017	Guinama
Trietanolamina	082524	Acofarma
Vaselina	161740	Acofarma

2.1.2. Equipamento

Durante a realização deste trabalho experimental foi utilizado o seguinte equipamento (Tabela III):

Tabela III - Lista de equipamento utilizado no trabalho experimental.

Equipamento	Fabricante	Modelo	Origem
Balança analítica	RADWAG	AS 220.R2	Polónia
Balança semi-analítica	Kern & Sohn GmbH	Pks 3600 – 2	Alemanha
Placa de agitação	IKA	C-MAG HS 7	Alemanha
Agitador mecânico	IKA	T25 Ultra Turrax ®	Alemanha
Ultrassons	Sonics & Material Inc.	VCX 130	EUA
Difratómetro laser	Malvern Instruments	Mastersizer 3000E	Reino Unido
Potenciómetro	Hanna Instruments	2211	EUA
Centrífuga	Eppendorf AG	5804	Alemanha
Espectrofotómetro	Jasco	V-650	Japão
Viscosímetro	Themo Haake	Viscotester 550	Alemanha
Texturómetro	Stable Micro Systems	TA-Xt2i	Reino Unido
Aparelho de dissolução	Sotax AG	AT7	Suíça
Vórtex	Heidolph Instruments	REAX 2000	Alemanha
Estufa	Memmert	-	Alemanha

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação de microemulsões contendo albumina

Neste trabalho experimental foram preparadas microemulsões simples O/A e microemulsões múltiplas A/O/A com e sem albumina de soro bovino (controle), utilizando o método de ultrassons ou sonicação.

O método de sonicação pode ocorrer através de dois mecanismos. Primeiramente, um campo acústico que é aplicado na microemulsão produz ondas interfaciais que se tornam instáveis, resultando assim, na libertação da fase oleosa no meio aquoso na forma de gotículas. Em segundo lugar, a aplicação do ultrassom de baixa frequência causa cavitação acústica, ou seja, ocorre a formação e subsequente colapso das microgotículas. O resultado é a quebra das gotículas primárias da fase dispersa em gotículas de tamanho nanométrico. Comparando com outros métodos de emulsificação, descobriu-se que o método de sonicação é mais vantajoso em termos de redução do tamanho das gotículas e eficiência energética (Kentish *et al.*, 2008).

Numa fase inicial, foram preparadas microemulsões simples O/A. A fase oleosa era constituída pelo lípido miristato de isopropilo e a fase aquosa continha o tensioativo (Tween® 80), o co-tensioativo (glicerina), o conservante (imidureia), a água e a proteína (albumina bovina). No caso das microemulsões controle não havia presença de albumina na fórmula. A fase aquosa foi adicionada à fase oleosa, com o auxílio do Ultra-Turrax, IKA, T25 digital, a 8000 rpm, durante 5 minutos. Após agitação, procedeu-se à sonicação, com o auxílio do Ultrassons, SONICS, Vibra Cell, a uma amplitude energética de 70%, durante 10 minutos, obtendo-se assim as microemulsões O/A.

A fórmula geral da microemulsão O/A contendo albumina está representada na Tabela IV.

Tabela IV - Fórmula da microemulsão O/A contendo albumina.

	Matéria - prima	Quantidade (%)
FASE OLEOSA	Miristato de Isopropilo	40,0
FASE AQUOSA	Tween® 80	5,0
	Glicerina	10,0
	Imidureia	0,1
	Albumina (BSA)	0,4
	Água purificada	q.b.p 100,0

Foram também preparadas microemulsões múltiplas A/O/A. Em primeiro lugar, foi preparada a microemulsão A/O, e de seguida acrescentou-se a fase aquosa externa. A fase oleosa da microemulsão simples era constituída pelo tensioativo Span® 80 e pelo lípido miristato de isopropilo. A fase aquosa era constituída pela água purificada e pela albumina. No caso das microemulsões controlo não havia presença de albumina nesta fase. A fase aquosa foi adicionada à fase oleosa, com o auxílio do Ultra-Turrax, IKA, T25 digital, a 8000 rpm, durante 5 minutos. Depois, foi preparada a fase aquosa externa contendo o Tween® 80, a glicerina, a imidureia e a água purificada, que foi adicionada a parte da microemulsão A/O, com agitação pelo Ultra-turrax, IKA, T25 digital, a 8000 rpm, durante 5 minutos. É de referir que foram utilizadas diferentes razões tensioativo/co-tensioativo além da indicada na fórmula (10g/10g; 15g/10g; 10g/5g), com o objetivo de estudar o efeito destas variações no tamanho das gotículas. A preparação resultante foi submetida à sonicação, com o auxílio do Ultrassons, SONICS, Vibra Cell, a uma amplitude energética de 70%, durante 10 minutos. É de notar que também se prepararam microemulsões com 15 e 20 minutos de sonicação em vez dos 10 minutos referidos neste procedimento, com o objetivo de estudar o efeito do tempo de

sonicação no tamanho das gotículas. Além disso, também foram preparadas microemulsões utilizando diferentes velocidades de agitação de 9000 rpm e 10000 rpm, além de 8000 rpm, com o objetivo de estudar o efeito da velocidade de agitação no tamanho das gotículas.

A fórmula geral da microemulsão A/O/A contendo albumina está representada na Tabela V.

Tabela V - Fórmula da microemulsão A/O/A contendo albumina.

	Matéria - prima	Quantidade (%)
FASE AQUOSA (Fase I)	Albumina (BSA)	1,0
	Água purificada	25,0
FASE OLEOSA (Fase II)	Span® 80	5,0
	Miristato de Isopropilo	q.b.p 100,0
FASE III (Fase I + Fase II)	-	40,0
FASE AQUOSA EXTERNA (Fase IV)	Tween® 80	5,0
	Glicerina	10,0
	Imidureia	0,1
	Água purificada	q.b.p 100,0

Após a preparação das microemulsões, estas foram acondicionadas em recipientes de vidro âmbar e guardadas no frigorífico a 5°C, até posterior caracterização e avaliação da estabilidade (Figura 7).

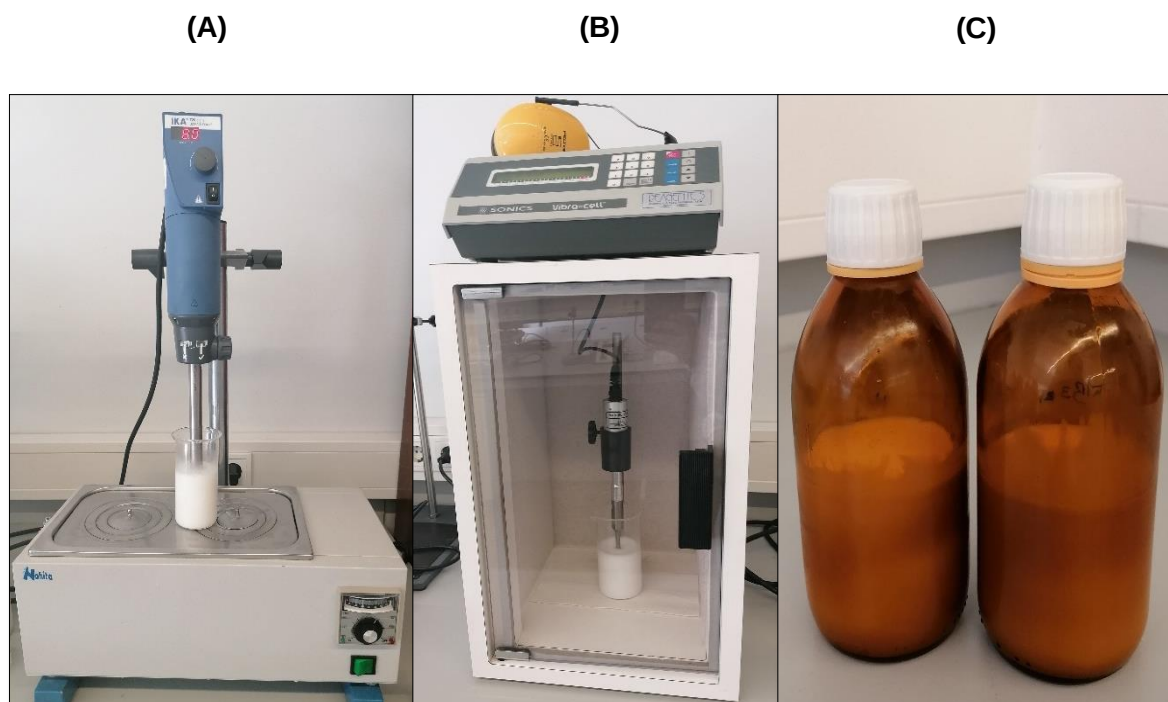


Figura 7 - Preparação das microemulsões O/A e A/O/A. **(A)** Ultra-Turrax, IKA, T25 digital (Alema-
nha); **(B)** Ultrassons, SONICS, Vibra Cell (EUA); **(C)** Recipientes de vidro âmbar contendo as mi-
croemulsões preparadas.

2.2.2. Caracterização e avaliação da estabilidade das microemulsões

Os ensaios a realizar para avaliação da estabilidade permitem prever possíveis alterações nas microemulsões, podendo indicar alguns problemas de instabilidade, que podem estar associados a separação de fases/coalescência de gotículas, problemas de perda de substância ativa, entre outros. As microemulsões foram sujeitas a vários ensaios para caracterização e avaliação das características organoléticas, do tamanho das gotículas da fase interna, do pH, da estabilidade acelerada por centrifugação e do teor de albumina.

2.2.2.1. Análise organolética

A análise das características organoléticas permite obter uma primeira noção da qualidade da formulação. Apesar da simplicidade desta análise, os problemas que ocorram no aspeto e/ou homogeneidade das preparações são indicativos de problemas nas matérias-primas ou no processo de preparação das formulações (Santos, 2015). Esta análise consiste numa simples avaliação da cor e da homogeneidade.

A avaliação organolética das microemulsões simples e múltiplas foi feita imediatamente após a preparação e ao fim de algum tempo de armazenamento.

2.2.2.2. Tamanho das gotículas da fase interna

O tamanho das gotículas da fase interna é um parâmetro importante a avaliar no caso das formulações a ser usadas topicamente e que precisam de ter um tamanho adequado. A avaliação do tamanho das gotículas da fase interna das microemulsões foi feita por difratometria laser. A difração laser baseia-se no facto das gotículas em suspensão dispersarem a luz em todas as direções com um padrão de intensidade que é dependente do tamanho das gotículas. O que acontece é que a amostra dispersa é atravessada por um feixe de radiação laser que incide nas gotículas, e posteriormente, é detetada com exatidão a intensidade da luz dispersa por essas gotículas presentes na amostra. É um dos métodos mais utilizados para fazer a medição do tamanho das gotículas e, além disso, é um método rápido, fácil de executar, flexível e que pode ser adaptado para medir amostras em diferentes estados físicos (Santos, 2015).

O tamanho das gotículas da fase interna das microemulsões simples e múltiplas preparadas foi medido pelo Difrátmetro Laser Mastersizer 3000, Malvern (Figura 8). Ao fim de algum tempo de armazenamento voltou-se a medir o tamanho das gotículas da fase interna.



Figura 8 - Mastersizer 3000, Malvern (Reino Unido).

As condições utilizadas neste ensaio foram as seguintes: índice de refração do lípido 1,43; índice de absorção 0,01 e densidade 1 g/cm³.

Os resultados obtidos desta avaliação são geralmente apresentados na forma de distribuição estatística. Os tamanhos das partículas são apresentados em percentis. Os percentis medidos foram o Dv10, o Dv50 e o Dv90. O valor de *Span*, que é um indicativo da polidispersão do sistema, também foi utilizado para a caracterização do tamanho das gotículas da fase interna. Foi calculado segundo a Equação 1:

$$Span = \frac{Dv90 - Dv10}{Dv50} \quad \text{Equação 1}$$

2.2.2.3. pH

O pH é um parâmetro químico extremamente importante a ser avaliado, quando se trata de formulações para serem usadas na pele. O pH da pele é geralmente ácido (valores de pH entre 4 e 6, podendo oscilar por vezes até 8) e é assegurado por um sistema tampão de ácido

lático/lactato, pelos ácidos dicarboxílicos do suor, pelos ácidos gordos das glândulas sebáceas e pelos elementos ácidos da queratina (Prista *et al.*, 2008). O pH reduzido da superfície da pele tem um papel fisiológico de defesa contra microrganismos invasores. Além disso, várias enzimas envolvidas na síntese e manutenção da barreira cutânea são amplamente afetadas pelo pH. Para proteger a pele é então importante que as formulações cutâneas tenham um pH compatível com a mesma (Ali e Yosipovitch, 2013).

Além disso, é importante medir o pH logo após a preparação das microemulsões e após algum tempo de armazenamento, de forma a detetar possíveis alterações na estabilidade das mesmas.

Foram feitas três medições do pH, após a preparação de cada microemulsão simples e múltipla e ao fim de algum tempo de armazenamento, utilizando um potenciômetro, Hanna Instruments 2211 (Figura 9). A média e o desvio padrão foram posteriormente calculados.



Figura 9 - Potenciômetro, Hanna Instruments 2211 (EUA).

2.2.2.4. Estabilidade acelerada por centrifugação

As formulações que são desenvolvidas para aplicação tópica podem manifestar alguns problemas ao nível da estabilidade física e química. Esta estabilidade depende de diversas variáveis presentes nas formulações e no processo de obtenção das mesmas. É influenciada por diversos fatores como a composição da formulação, o tamanho das gotículas, a

viscosidade, entre outros (Avendano-Gomez *et al.*, 2005). Por isso, recorre-se a técnicas como a estabilidade acelerada por centrifugação para avaliar a estabilidade destas formulações que podem ser usadas topicamente. No método da centrifugação, a força da gravidade vai atuar sobre as formulações, fazendo com que as suas gotículas se movam no seu interior. A centrifugação vai produzir stresse na amostra, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das gotículas e antecipando possíveis instabilidades. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto (*caking*), coalescência, entre outras (Krambeck, 2009).

Para este ensaio foi utilizada a Centrífuga, Eppendorf 5804 (Figura 10), sendo que as microemulsões múltiplas preparadas foram submetidas a dois ciclos de centrifugação de 30 minutos, a 3000 rpm. No fim do ensaio, as preparações foram inspecionadas visualmente, de modo a verificar se existiam problemas de instabilidade.



Figura 10 - Centrífuga, Eppendorf AG 5804 (Alemanha).

2.2.2.5. Teor de albumina

O doseamento da albumina presente nas microemulsões é fundamental porque esta pode não estar presente na quantidade adequada na formulação. O doseamento da BSA das microemulsões múltiplas foi realizado por espectrofotometria UV/Vis. Para posteriormente se avaliar o teor de albumina presente nas microemulsões foi necessário realizar uma curva de

calibração, tendo sido preparadas soluções padrão de BSA em água nas concentrações correspondentes a 80 µg/mL, 120 µg/mL, 160 µg/mL, 200 µg/mL e 240 µg/mL, e lidas as respectivas absorvâncias para obtenção da curva. Inicialmente foi adicionado a um tubo, 1 mL de microemulsão a 19 mL de água purificada. Esta diluição da microemulsão foi necessária para que após a centrifugação a 4000 rpm, durante 30 minutos, ocorresse a instabilização do sistema e a consequente separação de fases. Após todo o processo de centrifugação, obteve-se uma fase sobrenadante que correspondia ao lípido e uma fase inferior que correspondia à fase aquosa. Foi extraída então a fase aquosa, uma vez que a BSA é solúvel em água. Posteriormente, a 250 µL de filtrado, foram adicionados 750 µL de água purificada e 4000 µL de Reagente de Bradford. Este reagente forma um complexo com a proteína da amostra, havendo uma interação entre o corante e a proteína que irá levar a um deslocamento do equilíbrio do corante azul brilhante de Coomassie de uma forma aniônica (vermelha) para uma forma catiónica (azul), que irá absorver no comprimento de onda correspondente a 595 nm. A medição das absorvâncias foi realizada utilizando o espectrofotômetro UV-Vis, Jasco V650 (Japão) (Figura 11), 10 min após a adição do Reagente de Bradford à amostra a dosear. Aplicando a equação da curva de calibração obtida foi possível calcular o teor de BSA nas microemulsões múltiplas.



Figura 11 - Espectrofotômetro UV-Vis, Jasco V650 (Japão).

2.2.3. Preparação de microemulsões gelificadas

As microemulsões que foram preparadas e caracterizadas anteriormente foram gelificadas recorrendo ao agente gelificante PFC®.

O agente gelificante PFC® é um polímero do ácido acrílico e, portanto, apresenta carácter ácido. Este polímero existe num estado colapsado e passa a um estado intumescido quando ionizado. O intumescimento é devido a dois fatores: à pressão osmótica exercida pelos iões confinados eletrostaticamente no interior do gel e à repulsão das interações eletrostáticas entre os grupos carboxílicos. No entanto, os iões confinados contribuem mais para esse efeito. Quando as forças repulsivas excedem as forças atrativas, a ligação de hidrogénio, as interações de Van der Waals e as interações hidrofóbicas, o polímero intumescer e muda para uma conformação de cadeia estendida (Philippova *et al.*, 1997).

Para a formação do gel adicionou-se lentamente as microemulsões ao agente gelificante PFC®, numa concentração de 0,5% (Figura 12). Para obter um gel estável é importante garantir que este tenha um pH final de 7. Portanto, para neutralizar a formulação, foram adicionadas lentamente gotas de trietanolamina até o pH desejado ser alcançado.



Figura 12 - Processo de gelificação das microemulsões.

2.2.4. Caracterização e avaliação da estabilidade das microemulsões gelificadas

Num primeiro estudo, após a gelificação de uma microemulsão múltipla A/O/A sem albumina e de uma microemulsão simples O/A sem albumina, estas foram armazenadas à temperatura ambiente (20°C) em boiões de plástico. Já num segundo estudo, após a gelificação das microemulsões múltiplas A/O/A com e sem albumina, estas foram armazenadas à temperatura ambiente (20°C) e no frigorífico (5°C) em boiões de plástico. Além da análise organolética a seguir à gelificação, após 8 e 30 dias da gelificação das microemulsões, foram realizados estudos reológicos e de avaliação dos parâmetros de textura. Após 8 dias da gelificação das microemulsões múltiplas, realizou-se o ensaio de libertação *in vitro* de albumina e o teste de oclusão.

2.2.4.1. Análise organolética

A caracterização organolética das microemulsões gelificadas tem como objetivo avaliar a qualidade das preparações semissólidas. Esta caracterização é importante, porque é a primeira análise que qualquer indivíduo faz, mesmo que involuntariamente, quando aplica alguma formulação para uso cutâneo. Assim como no caso das microemulsões, esta análise consiste numa simples avaliação da cor e da homogeneidade das microemulsões gelificadas.

A avaliação organolética foi feita imediatamente após a gelificação das microemulsões.

2.2.4.2. Reologia

A reologia pode ser definida como o estudo das propriedades de fluxo e de deformação da matéria. É de fundamental importância fazer uma avaliação das características reológicas das formulações semissólidas, pois serve para estudar parâmetros importantes na aceitabilidade das mesmas, como a espalhabilidade e a estabilidade física (Santos, 2015).

A viscosidade de um fluido pode ser descrita como a sua resistência ao fluxo ou movimento, ou seja, quanto maior a viscosidade, menor a velocidade com que o fluido se movimenta.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Equação 2

Na Equação 2, η corresponde à viscosidade, τ à tensão de corte e $\dot{\gamma}$ à velocidade de corte.

Os tipos de comportamento mecânico dos materiais podem ser: Newtonianos e não Newtonianos, dependendo das suas propriedades de fluxo. O fluxo Newtoniano apresenta uma viscosidade constante, independente da força aplicada. O fluxo não Newtoniano é caracterizado pela alteração da viscosidade em função da tensão de corte aplicada. O fluxo não Newtoniano pode ser dividido em fenómenos independentes do tempo: fluxo plástico, reoespessante e reofluidificante; e em fenómenos dependentes do tempo: tixotropia e reopexia (Allen *et al.*, 2007).

Os materiais reofluidificantes apresentam diminuição da viscosidade aparente com o aumento da tensão de corte. Os materiais plásticos necessitam de uma tensão de corte mínima (tensão de cedência) para iniciar o escoamento. Já os materiais reoespessantes apresentam aumento da viscosidade aparente com o aumento da tensão de corte (Figura 13) (Aulton, 2005).

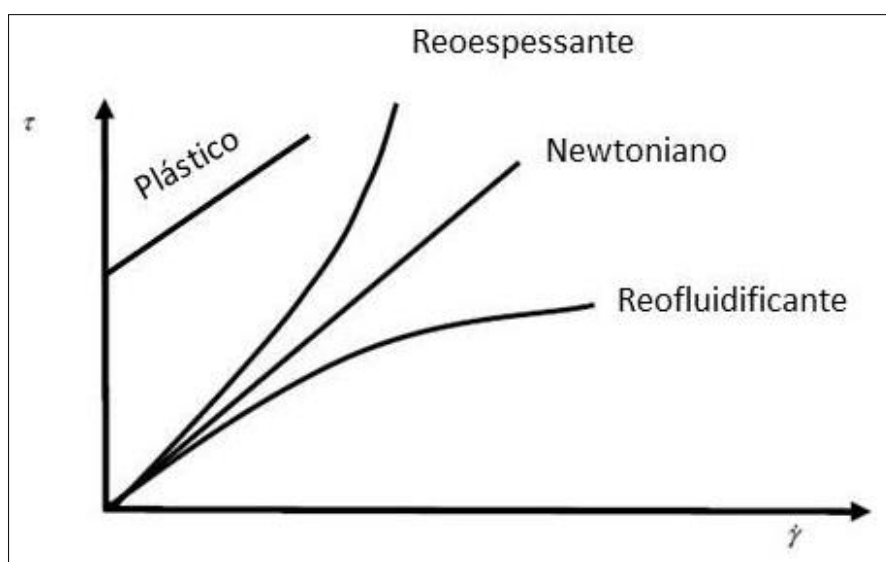


Figura 13 - Comportamento reológico dos materiais. Fonte: Adaptado de Castro *et al.*, 2001.

Por outro lado, os materiais podem ser classificados pelas suas alterações reológicas ao longo do tempo de deformação, quando é aplicada uma tensão de corte constante. Assim, temos fluidos com tixotropia ou fluidos com reopexia. Se a viscosidade aparente do material diminuir com o tempo, quando aplicada uma tensão de corte constante, estamos na presença de um comportamento tixotrópico. Quando a viscosidade aparente do material aumenta com o tempo, quando aplicada essa mesma tensão de corte, estamos na presença de um comportamento reopético (Aulton, 2005).

O estudo reológico das microemulsões gelificadas foi realizado utilizando o viscosímetro, Thermo Haake Viscotester V-550 (Figura 14). Para reduzir a influência da temperatura sobre o comportamento reológico das formulações semissólidas analisadas, o ensaio foi realizado a uma temperatura constante de 20°C, com leituras sistemáticas de velocidades de corte de 1s⁻¹ até 500s⁻¹ (rampa ascendente) e de 500 s⁻¹ até 1s⁻¹ (rampa descendente), com um tempo de estabilização da temperatura de cerca de 10 minutos.



Figura 14 - Viscosímetro, Thermo Haake VT-550 (Alemanha).

2.2.4.3. Textura

A textura compreende todas as características físicas percebidas pelo sentido do tato, que estão relacionadas com a deformação sob ação de uma força. Estas características podem ser medidas em termos de força, distância e tempo, sendo estes parâmetros importantes para a aceitabilidade do produto final por parte do consumidor. A avaliação da textura pode ser feita através de uma análise sensorial ou de uma análise instrumental. A avaliação instrumental, recorrendo a um texturómetro, consiste em ensaios mecânicos que permitem determinar as características de adesividade e de firmeza de uma preparação e que estão relacionadas com

a deformação observada nas formulações quando lhes é exercida uma força (Tichota *et al.*, 2014).

Este ensaio consiste na medição da área negativa (adesividade) e da força máxima (firmeza) em função da distância percorrida por uma sonda durante a deformação da amostra. A sonda penetra na amostra a uma determinada velocidade e numa distância pré-definida. Ao fim dessa distância de penetração a sonda ascende à posição inicial, acima da superfície da amostra. A adesividade é uma medida da força necessária para superar as forças de atração entre as superfícies da amostra e a sonda, ou seja, traduz a energia que é necessário despende para a sonda ascender à posição inicial. A firmeza está relacionada com a facilidade de aplicação do produto, sendo determinada pela força máxima exercida durante o primeiro ciclo de compressão (Santos, 2015). A adesividade pode ser calculada a partir da área negativa do gráfico Força *versus* Distância percorrida (por exemplo) e a firmeza corresponde à força máxima exercida pela sonda ao penetrar a amostra (Figura 15).

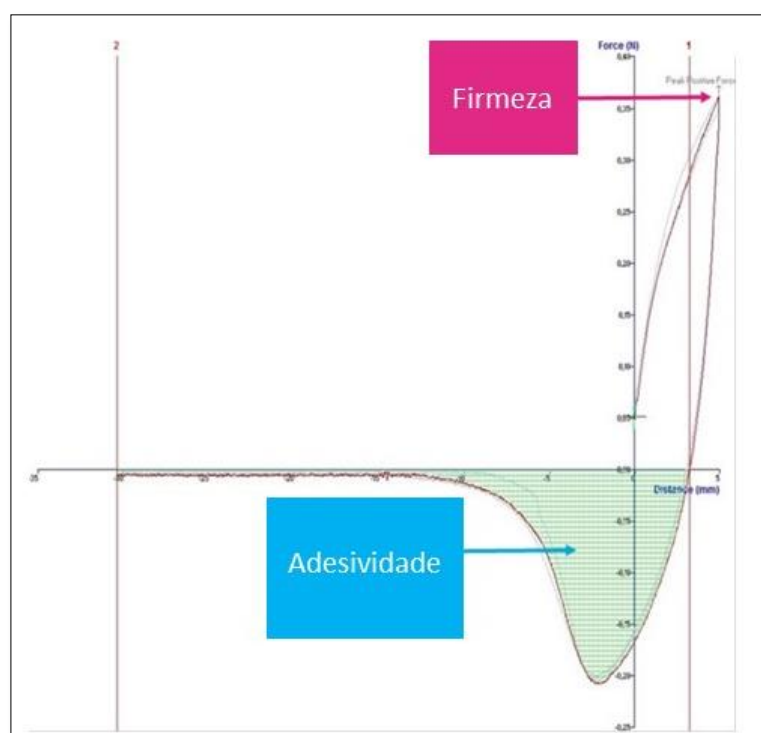


Figura 15 - Representação esquemática do gráfico Força *versus* Distância percorrida.

Foi utilizado o texturómetro Stable Micro Systems, TA-XT2i (Figura 16), segundo as seguintes condições: velocidade de teste - 3 mm/s; distância de penetração - 5 mm; Tigger Force - 0,049 N; sonda cilíndrica com diâmetro de 25 mm (P/25P).

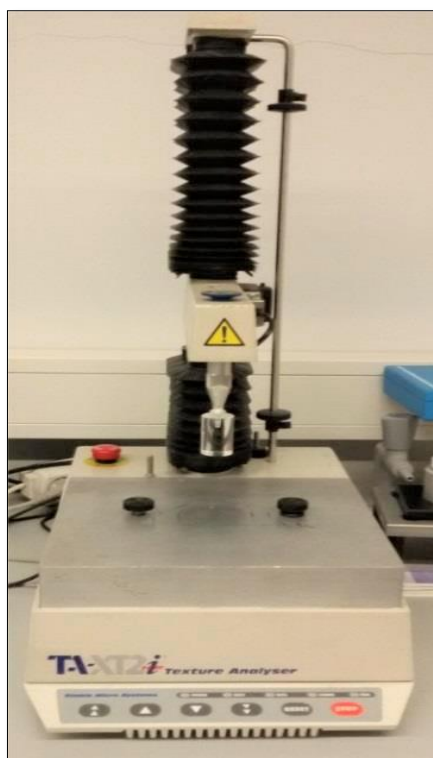


Figura 16 - Texturómetro, Stable Micro Systems TA-XT2i (Reino Unido).

2.2.4.4. Liberação *in vitro* de albumina

A liberação da albumina incorporada nas microemulsões múltiplas gelificadas pode ser avaliada por meio de ensaios *in vitro*. Os testes de liberação *in vitro* constituem um controlo qualitativo do sistema e fornecem informações para futuros estudos de liberação *in vivo* (Bhardwaj e Burgess, 2010).

Para a realização do ensaio de liberação da albumina, utilizou-se o aparelho de dissolução, SOTAX AT7 (Suíça) com pá agitadora (Figura 17). Em primeiro lugar, pesaram-se 5g de microemulsão gelificada em recipiente apropriado e, em seguida, foi aplicada uma membrana de celulose de 0,45 μm (previamente hidratada com meio de dissolução) sobre a amostra e fixou-se ao recipiente. O sistema foi mergulhado num vaso de dissolução contendo 200 mL de água, a $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, e submeteu-se o sistema a uma agitação de 50 rpm. Posteriormente, recolheram-se alíquotas de 5 mL aos 60, 120, 180 e 240 min, sem reposição de volume. As absorvâncias das amostras foram lidas no espectrofotómetro UV-Vis, Jasco V650 (Japão), a 595 nm, utilizando o método de Bradford descrito anteriormente na secção 2.2.2.5.



Figura 17 - Aparelho de dissolução, Sotax AT7 (Suíça).

2.2.4.5. Teste de oclusão

A hidratação da camada córnea depende da difusão de água das camadas mais profundas da pele, da velocidade de evaporação, da queratinização e da aplicação de preparações cosméticas e dermofarmacêuticas na sua superfície. Assim, de forma a impedir a desidratação cutânea, é necessário manter a integridade da barreira hidrolipídica através de diferentes mecanismos de hidratação: oclusão, humectação e hidratação ativa (Silva *et al.*, 2009). O mecanismo de oclusão consiste na utilização de substâncias hidrófobas e emolientes que formam uma película protetora sobre a pele, restabelecendo o filme hidrolipídico e impedindo a perda de água por evaporação (Costa *et al.*, 2004).

Para a avaliação do efeito oclusivo e indiretamente do poder hidratante e emoliente da microemulsão gelificada foi realizado o teste de oclusão. Pesaram-se cerca de 40g de água purificada em gobelés de 50 ml e estes foram tapados com papel de filtro. De seguida, 2,5g da formulação a testar foram espalhados na superfície do papel de filtro colocado sobre os gobelés. Foram também preparados gobelés cobertos com 2,5g de vaselina, considerada o excipiente oclusivo de referência e gobelés sem aplicação de qualquer produto para funcionarem como controlo. Os gobelés foram depois colocados numa estufa a 40°C, durante 24 horas, sendo pesados 1 h após serem retirados da estufa. O fator de oclusão foi posteriormente calculado utilizando a seguinte equação:

$$F(\%) = \frac{A-B}{A} * 100$$

Equação 3

Em que A é a quantidade de água pesada no gobelé sem formulação e B a quantidade de água pesada no gobelé com a formulação (microemulsão múltipla gelificada ou vaselina) na superfície do papel de filtro.

2.2.5. Análise Estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico IBM SPSS Statistics (EUA), versão 26 (Windows). Para a comparação dos valores de firmeza e da adesividade das microemulsões gelificadas, empregou-se o Teste *t* de Student, com nível de significância de 5%. Sempre que o $p > 0,05$, as diferenças entre as amostras não foram consideradas estatisticamente significativas.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Caracterização e avaliação da estabilidade das microemulsões

2.3.1.1. Análise organolética

As microemulsões simples O/A e as microemulsões múltiplas A/O/A obtidas pelo método de sonicação apresentavam um aspeto branco, leitoso, homogêneo e fluído (Figura 18). É de referir que em todas as formulações houve a formação de alguma espuma durante a emulsificação no Ultra-Turrax, devido à presença do tensioativo. Contudo, quando foram sujeitas ao processo de sonicação, a espuma acabou por desaparecer.

É de notar que ao fim de algum tempo de armazenamento não existiram alterações de cor ou homogeneidade nas preparações armazenadas a 5°C. Nos estudos de Basheer e seus colaboradores (2013), as microemulsões preparadas com diferentes tensioativos e co-tensioativos, contendo como fase oleosa o palmitato de isopropilo e armazenadas a 25°C, também não apresentaram alterações na cor, ao fim de 4 semanas de armazenamento.

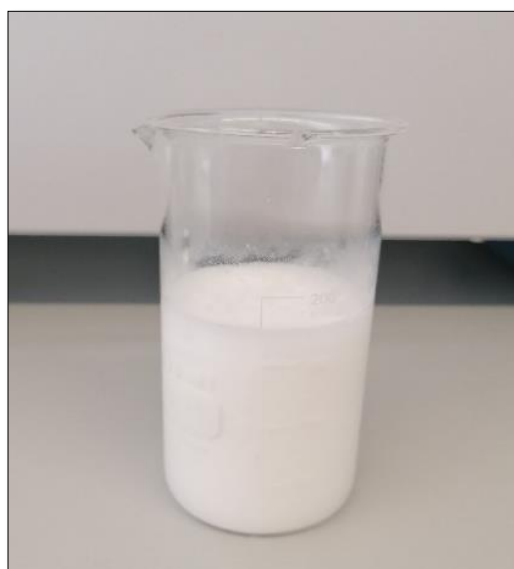


Figura 18 - Aspeto final das microemulsões preparadas pelo método de sonicação.

2.3.1.2. Tamanho das gotículas da fase interna

Numa fase inicial do trabalho experimental, foram preparadas duas microemulsões simples O/A, com e sem albumina. Os resultados da avaliação dos tamanhos das gotículas das microemulsões simples O/A sem albumina (MB1) e com albumina (M1) e o respetivo valor de *Span* encontram-se na Tabela VI e na Figura 19.

Tabela VI - Tamanhos das gotículas da fase interna das microemulsões MB1 e M1 (apresentados sob a forma de percentis e com os respetivos coeficientes de variação) e valor de *Span*.

	Dv10 (μm)	CV (%)	Dv50 (μm)	CV (%)	Dv90 (μm)	CV (%)	<i>Span</i>
MB1	0,203	0,060	0,364	0,097	0,635	0,034	1,19
M1	0,184	1,080	0,333	0,012	0,583	0,039	1,20

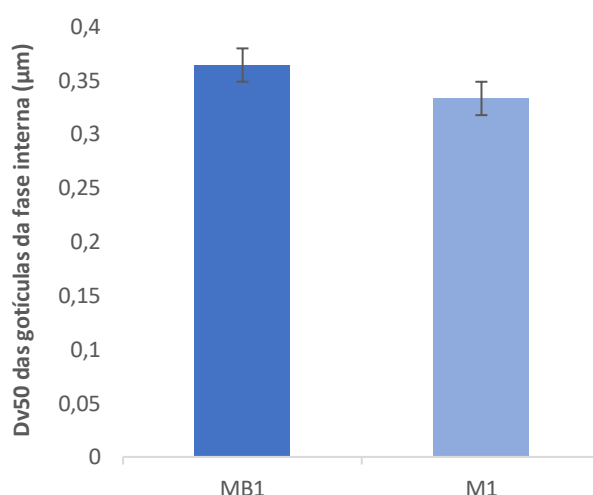


Figura 19 - Representação gráfica do Dv50 das gotículas da fase interna das microemulsões simples O/A sem albumina (MB1) e com albumina (M1).

Como se pode observar pela Tabela VI e pela Figura 19, verifica-se que a microemulsão com albumina (M1) apresenta um valor da mediana (Dv50=0,333 μm) ligeiramente inferior ao da microemulsão sem albumina (MB1) (Dv50=0,364 μm). É possível observar que a adição da proteína ao sistema não afetou substancialmente este parâmetro. O valor de *Span*, segundo a literatura, quanto mais próximo estiver de 1, mais estreita é a distribuição do tamanho das gotículas, e consequentemente mais uniforme é o tamanho das gotículas (Teeranachaideekul *et al.*, 2007). Por isso, quanto menor o valor de *Span*, mais uniforme é a amostra analisada. Relativamente aos valores de *Span* obtidos para ambas as microemulsões simples O/A,

conclui-se que estes estão próximos de 1 e, dessa forma, as amostras são consideradas uniformes apresentando uma baixa dispersão dos tamanhos das gotículas.

Em relação às microemulsões múltiplas A/O/A, numa primeira fase, o objetivo foi estudar a influência da razão tensioativo/co-tensioativo no tamanho das gotículas da fase interna. Foram preparadas microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina, com as seguintes razões tensioativo/co-tensioativo: 5g/10g (MB2), 10g/10g (MB3_1), 15g/10g (MB3_2) e 10g/5g (MB3_3). Os resultados da avaliação dos tamanhos das gotículas da fase interna A/O das microemulsões múltiplas A/O/A (MB2, MB3_1, MB3_2 e MB3_3) e o respectivo valor de *Span* encontram-se apresentados na Tabela VII e na Figura 20.

Tabela VII - Tamanhos das gotículas da fase interna das microemulsões MB2, MB3_1, MB3_2 e MB3_3 (apresentados sob a forma de percentis e com os respectivos coeficientes de variação) e valor de *Span*.

	Dv10 (μm)	CV (%)	Dv50 (μm)	CV (%)	Dv90 (μm)	CV (%)	<i>Span</i>
MB2	0,219	1,350	0,413	2,060	1,910	9,640	4,09
MB3_1	0,164	0,370	0,316	0,540	0,650	2,510	1,54
MB3_2	0,146	2,280	0,338	0,170	1,540	0,400	4,12
MB3_3	0,182	2,740	0,370	3,540	2,120	3,700	5,24

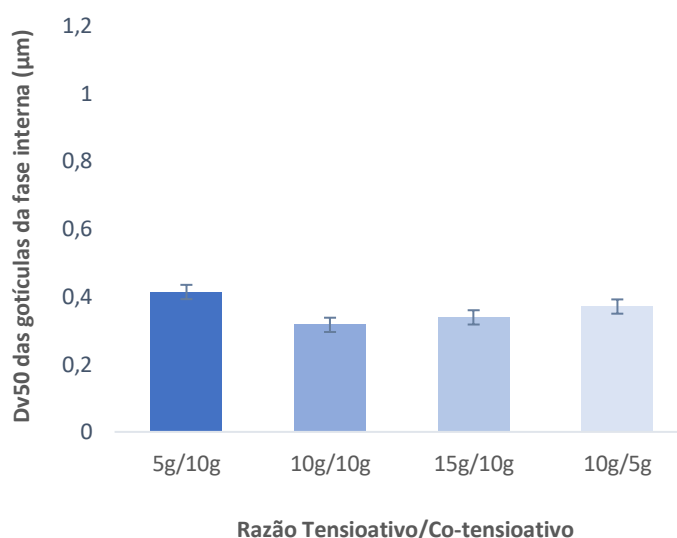


Figura 20 - Representação gráfica do Dv50 das gotículas da fase oleosa das microemulsões múltiplas A/O/A, preparadas com diferentes razões de tensioativo/co-tensioativo.

Como se pode verificar pela Tabela VII e pela Figura 20, a razão tensioativo/co-tensioativo (10g/10g) correspondente à microemulsão múltipla MB3_1, com um valor de mediana ligeiramente inferior ($Dv50=0,316 \mu\text{m}$), contribuiu para um tamanho das gotículas da fase oleosa mais baixo e próximo do tamanho pretendido e, por isso, foi essa a proporção utilizada nas preparações posteriores. Resende (2013) preparou uma microemulsão com diferentes percentagens de etanol (10, 20 e 30%) como co-tensioativo e com Tween® 80 como tensioativo, e chegou à conclusão de que quanto maior a percentagem de etanol adicionado ao sistema, menor foi o tamanho das gotículas, o qual rondou os 58 nm. Os valores de *Span* das microemulsões múltiplas MB2, MB3_2 e MB3_3 são muito superiores a 1, o que significa que as amostras são polidispersas, apresentando uma maior dispersão e uma menor uniformidade nos tamanhos das gotículas. Este resultado pode ser indicativo de que as razões de tensioativo/co-tensioativo utilizadas nessas preparações tiveram influência na polidispersão dos sistemas. Já o valor de *Span* da microemulsão múltipla MB3_1 está próximo de 1 sendo a uniformidade dos tamanhos maior.

Após estes resultados, passou-se à preparação de microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina, com a razão de 10g de tensioativo/10g de co-tensioativo, com o objetivo de estudar a influência da velocidade de agitação do Ultra-Turrax no tamanho das gotículas da fase interna oleosa. As velocidades de agitação utilizadas foram: 8000 rpm (MB3_1), 9000 rpm (MB3_4) e 10000 rpm (MB3_5). Os resultados da avaliação dos tamanhos das gotículas das microemulsões múltiplas A/O/A (MB3_1, MB3_4 e MB3_5) e o respetivo valor de *Span* encontram-se apresentados na Tabela VIII e na Figura 21.

Tabela VIII - Tamanhos das gotículas da fase interna das microemulsões MB3_1, MB3_4 e MB3_5 (apresentados sob a forma de percentis e com os respetivos coeficientes de variação) e valor de *Span*.

	Dv10 (μm)	CV (%)	Dv50 (μm)	CV (%)	Dv90 (μm)	CV (%)	<i>Span</i>
MB3_1	0,164	0,370	0,316	0,540	0,650	2,510	1,54
MB3_4	0,160	0,360	0,304	0,480	0,594	1,180	1,43
MB3_5	0,163	2,650	0,320	2,430	0,639	6,800	1,49

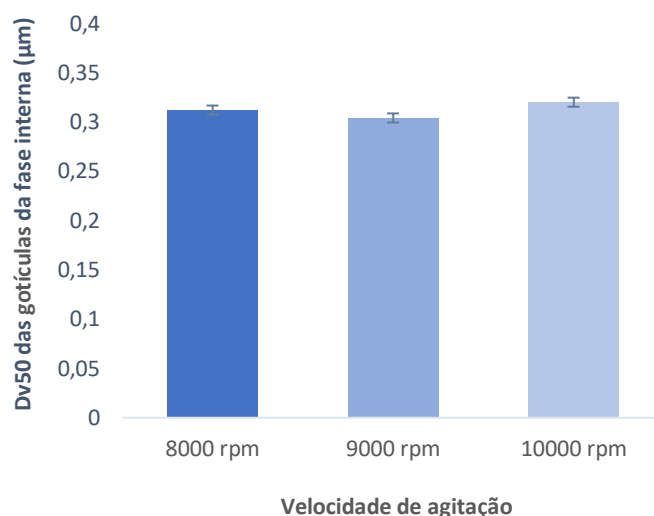


Figura 21 - Representação gráfica do Dv50 das gotículas da fase oleosa das microemulsões múltiplas A/O/A, sujeitas a diferentes velocidades de agitação no Ultra-Turrax.

Como se pode observar pelos resultados da Tabela VIII e da Figura 21, a MB3_4 que foi sujeita a uma velocidade de agitação de 9000 rpm, apresenta um Dv50 (0,304 µm) relativamente mais baixo e próximo do tamanho pretendido, em relação às outras duas microemulsões. A velocidade de agitação de 10000 rpm revelou não ser necessária para futuras preparações, visto que o tamanho não diminuiu consideravelmente. Foi decidido que a velocidade de agitação seria fixada nas 9000 rpm para futuras preparações. Relativamente aos valores de *Span* obtidos, conclui-se que estes se encontram próximos de 1 e, dessa forma, as amostras são consideradas uniformes, apresentando uma menor dispersão dos tamanhos das gotículas.

Seguidamente, foram preparadas microemulsões múltiplas A/O/A com a razão de 10g de tensioativo/10g de co-tensioativo, com velocidade de agitação de 9000 rpm, com o objetivo de estudar a influência do tempo de sonicação no tamanho das gotículas da fase interna oleosa. Os tempos de sonicação utilizados foram: 10 min (MB3_4), 15 min (MB3_6) e 20 min (MB3_7), mantendo-se fixa a amplitude de 70% no ultrassons. Os resultados da avaliação dos tamanhos das gotículas da fase oleosa das microemulsões múltiplas A/O/A (MB3_4, MB3_6 e MB3_7) e o respetivo valor de *Span* encontram-se apresentados na Tabela IX e na Figura 22.

Tabela IX - Tamanhos das gotículas da fase interna das microemulsões MB3_4, MB3_6 e MB3_7 (apresentados sob a forma de percentis e com os respectivos coeficientes de variação) e valor de *Span*.

	Dv10 (μm)	CV (%)	Dv50 (μm)	CV (%)	Dv90 (μm)	CV (%)	<i>Span</i>
MB3_4	0,160	0,360	0,304	0,480	0,594	1,180	1,43
MB3_6	0,155	0,520	0,298	0,140	0,591	1,000	1,46
MB3_7	0,137	0,510	0,305	0,220	0,581	0,120	1,46

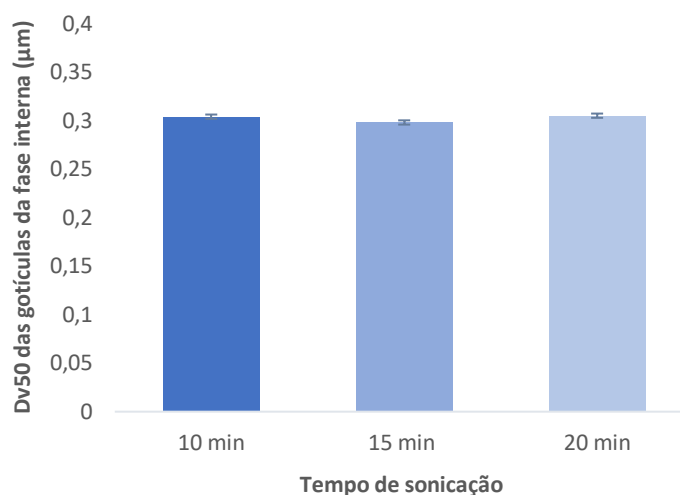


Figura 22 - Representação gráfica do Dv50 das gotículas da fase oleosa das microemulsões múltiplas A/O/A, sujeitas a diferentes tempos de sonicação.

A Tabela IX e a Figura 22 mostram que a MB3_6 que foi sujeita a um tempo de sonicação de 15 min, apresenta um Dv50 relativamente mais baixo (0,298 μm) em relação às outras microemulsões. Foi decidido que o tempo de sonicação seria fixado nos 15 min para futuras preparações, uma vez que não se obteve um melhor Dv50 aos 20 min. Desta forma, as condições de preparação da fórmula MB3_6 passaram a ser utilizadas nos estudos subsequentes. Santos (2015) também preparou microemulsões com Tween® 80 como tensioativo, mas com Transcutol® como co-tensioativo, com diferentes tempos de sonicação, e neste caso não foram detetadas diferenças nos tamanhos das gotículas quando se utilizaram tempos de sonicação de 10 e 15 min. Os valores de *Span* obtidos mostram que as microemulsões múltiplas preparadas utilizando diferentes tempos de sonicação apresentam uma baixa dispersão dos tamanhos das gotículas da fase oleosa.

Fazendo uma comparação com os dois tipos de microemulsões preparados, foi possível observar que as gotículas da fase oleosa da microemulsão múltipla MB3_1, preparada com a razão de 10g de tensioativo/10g co-tensioativo, com velocidade de agitação de 8000 rpm e com tempo sonicação de 10 min, apresentaram um menor valor da mediana ($Dv50=0,316\ \mu\text{m}$) comparativamente às gotículas da microemulsão simples MB1 ($Dv50=0,364\ \mu\text{m}$), obtida através das mesmas condições, embora a diferença não tenha sido muito acentuada. Em relação aos valores de *Span*, conclui-se de uma maneira geral, que tanto as microemulsões simples, como as microemulsões múltiplas são amostras uniformes e apresentam uma baixa dispersão dos tamanhos das gotículas.

Ao fim de algum tempo de armazenamento, procedeu-se novamente à avaliação do tamanho das gotículas da microemulsão simples MB1 e múltipla MB3_6. O tamanho das gotículas da microemulsão simples O/A sem albumina (MB1) foi determinado após 5 meses de armazenamento e o tamanho das gotículas da fase oleosa da microemulsão múltipla A/O/A sem albumina (MB3_6) foi medido após 4 meses de armazenamento a 5°C. Os resultados da avaliação dos tamanhos das gotículas das microemulsões MB1 e MB3_6, ao fim do período de armazenamento, e o respetivo valor de *Span* estão representados na Tabela X e na Figura 23.

Tabela X - Tamanhos das gotículas da fase interna das microemulsões MB1 e MB3_6, após armazenamento (apresentados sob a forma de percentis e com os respetivos coeficientes de variação) e valor de *Span*.

	Dv10 (μm)	CV (%)	Dv50 (μm)	CV (%)	Dv90 (μm)	CV (%)	<i>Span</i>
MB1	0,548	0,281	1,150	0,756	2,310	2,700	1,53
MB3_6	0,237	0,146	0,456	0,069	1,330	0,395	2,40

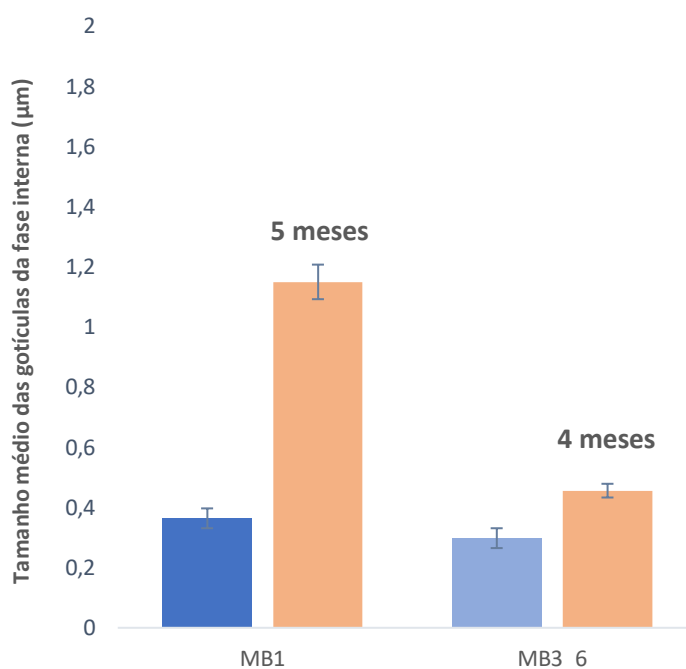


Figura 23 - Representação gráfica do Dv50 das gotículas da fase interna da microemulsão simples O/A sem albumina (MB1) e da microemulsão múltipla A/O/A sem albumina (MB3_6), após preparação e ao fim de algum tempo de armazenamento.

Comparando os valores dos Dv50, após a preparação e ao fim de algum tempo de armazenamento, é possível verificar um aumento da mediana nas duas microemulsões (Figura 23). Observam-se valores discrepantes, embora no caso da microemulsão simples O/A sem albumina (MB1) ($Dv50=1,150\ \mu\text{m}$) essa diferença seja mais acentuada. Conclui-se que a estabilidade física da microemulsão simples apresentou uma maior diminuição em comparação com a da microemulsão múltipla, uma vez que as gotículas da fase oleosa sofreram uma maior aglomeração ao longo do tempo de armazenamento. A microemulsão múltipla A/O/A mostrou ser mais estável neste parâmetro físico do que a microemulsão simples O/A, e como está descrito, quanto menor o valor do tamanho das gotículas da fase interna, maior será a estabilidade das microemulsões (Majuru e Oyewumi, 2009). Já Berry (2011) preparou microemulsões contendo óleo de soja (como fase oleosa) e monoestearato de glicerol juntamente com polissorbato 80 (como tensioativos), para serem também usadas como potenciais sistemas de administração de biomoléculas e concluiu que os tamanhos das gotículas não foram significativamente diferentes, após a preparação e ao fim de 8 meses de armazenamento.

No que se refere aos valores de *Span*, estes aumentaram ao longo do tempo. O maior aumento na dispersão dos tamanhos das gotículas aconteceu na MB3_6, o que significa que a amostra começou a apresentar uma maior dispersão dos tamanhos das gotículas.

Quando a albumina foi incorporada na microemulsão múltipla A/O/A, verificou-se que os valores das medianas relativos ao tamanho das gotículas da fase oleosa da microemulsão múltipla A/O/A sem albumina (MB3_6) ($Dv50=0,298\ \mu\text{m}$) e da microemulsão múltipla A/O/A com albumina (M3_6) ($Dv50=0,303\ \mu\text{m}$), após a preparação das mesmas, não diferiram muito entre si, como se pode observar na Figura 24. Por isso, como a M3_6 apresentou um $Dv50$ relativamente baixo, significa que as gotículas da microemulsão podem estabelecer um contacto mais próximo com a pele, o que seria uma vantagem para a administração cutânea de proteínas. Malakar e os seus colaboradores (2011) prepararam microemulsões com insulina (contendo também como fase oleosa o miristato de isopropilo) para a administração transdérmica, no entanto, estes autores obtiveram tamanhos de gotículas de cerca de 1025 nm. Conclui-se então que a adição da albumina à microemulsão múltipla A/O/A não afetou este parâmetro físico.

O valor de *Span* obtido para a M3_6 está próximo de 1 ($Span=1,50$), o que significa que a amostra exibiu uma dispersão dos tamanhos baixa, assim como aconteceu com a MB3_6 ($Span=1,46$), após a preparação.

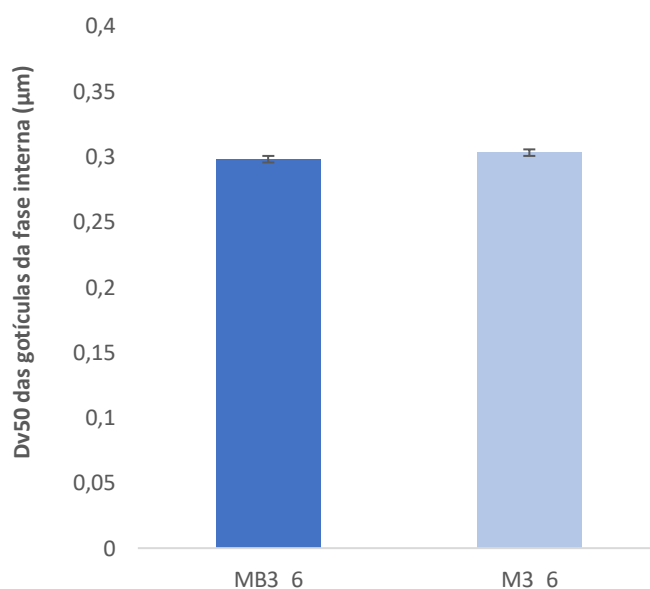


Figura 24 - Representação gráfica do $Dv50$ das gotículas da fase oleosa das microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina (MB3_6) e com albumina (M3_6), após preparação.

2.3.1.3. pH

O pH das microemulsões foi medido após a preparação e após 5 meses de armazenamento a 5°C. Os resultados obtidos para a análise do pH das microemulsões simples O/A sem albumina (MB1) e com albumina (M1), após a preparação destas, estão apresentados na Figura 25.

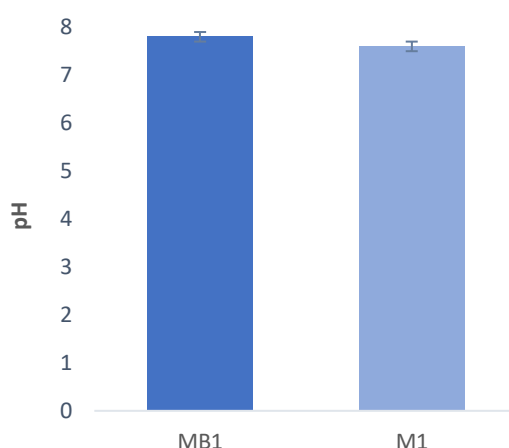


Figura 25 - pH das microemulsões simples O/A sem albumina (MB1) e com albumina (M1), após preparação.

Os valores de pH observados não diferem muito entre si, sendo que a MB1 sem albumina, apresentou um pH médio de $7,80 \pm 0,02$ e a M1 com albumina apresentou um pH médio de $7,60 \pm 0,07$ (Figura 25). Pode-se concluir que a presença de albumina não alterou de forma significativa o pH das microemulsões simples. Um outro estudo mostrou que uma microemulsão O/A contendo triacetina (como fase oleosa) quando hibridizada com nanopartículas de BSA-PEG em comparação com uma microemulsão não hibridizada, apresentou valores de pH mais baixos, o que pode estar relacionado com a presença de grupos com carácter ácido na estrutura da BSA (Gharbavi *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos para a análise do pH das microemulsões simples O/A sem albumina (MB1) e com albumina (M1), após 5 meses de armazenamento, estão apresentados na Figura 26.

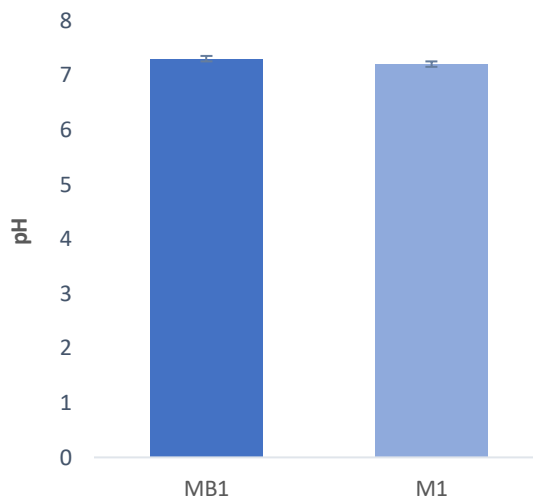


Figura 26 - pH das microemulsões simples O/A sem albumina (MB1) e com albumina (M1), após 5 meses de armazenamento.

Ao fim de 5 meses de armazenamento, apesar de ter existido um ligeiro decréscimo no pH, os valores observados nas microemulsões simples com (M1) e sem albumina (MB1) não apresentaram valores de pH muito distintos, sendo que a MB1 apresentou um pH médio de $7,30 \pm 0,03$ e a M1 apresentou um pH médio de $7,20 \pm 0,06$ (Figura 26).

Em relação ao pH medido após a preparação destas, apesar do ligeiro decréscimo do pH ao longo do tempo, não existiram alterações consideráveis, mantendo-se estes valores de pH aceitáveis para a aplicação na pele.

Os resultados obtidos para a análise do pH das microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina, após a preparação destas, estão apresentados na Figura 27

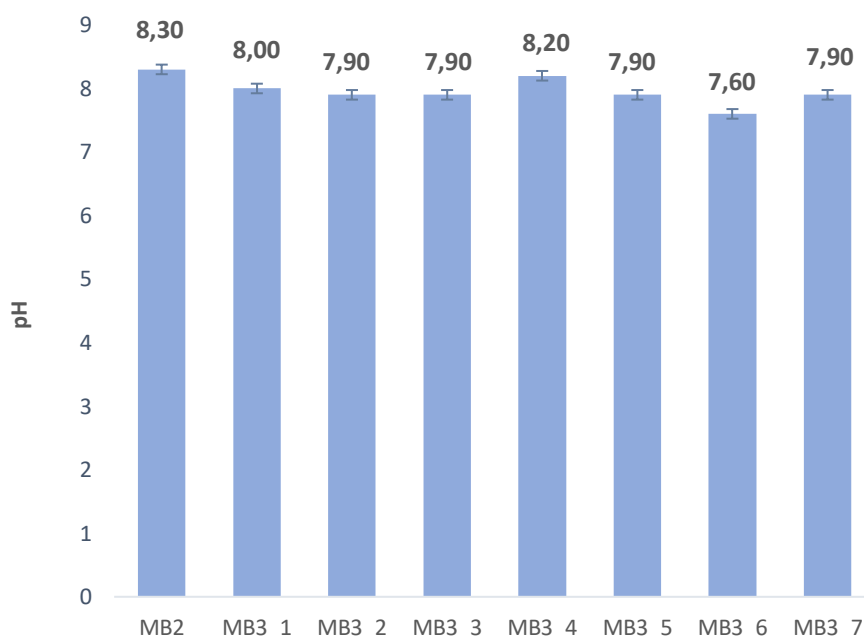


Figura 27 - pH das microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina, após preparação.

Pelo que se pode observar, o pH das microemulsões múltiplas situou-se entre os 7,60 e os 8,30, sendo que a microemulsão MB3_6 preparada com razão de 10g de tensioativo/10g de co-tensioativo, com velocidade de agitação de 9000 rpm e com tempo de sonicação de 15 min, apresentou um pH mais baixo ($7,60 \pm 0,11$) em relação às outras microemulsões preparadas (Figura 27). Este valor de pH mais baixo é mais vantajoso, visto que se aproxima mais do pH normal da pele (Prista *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos para a análise do pH das microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina, após 4 meses de armazenamento, estão apresentados na Figura 28.

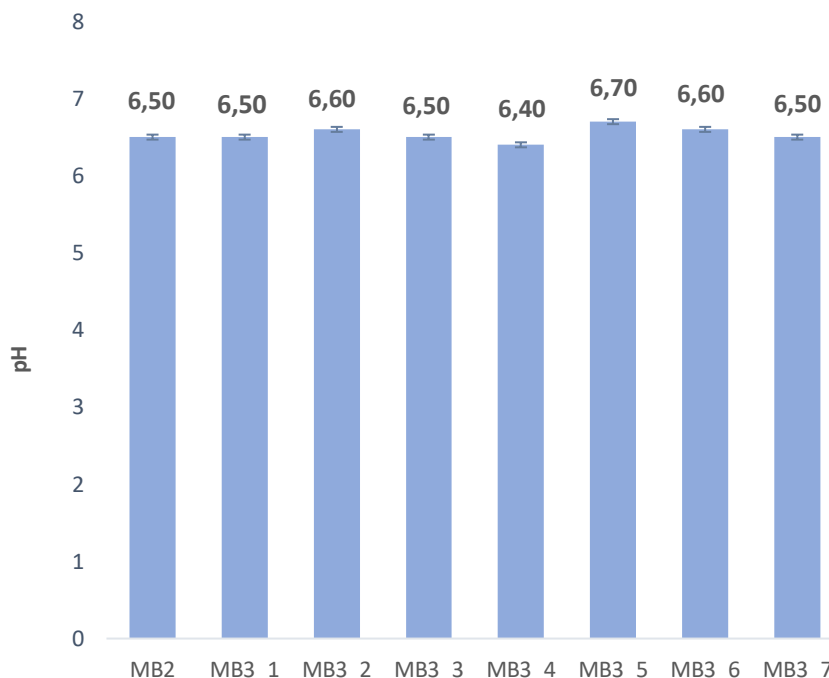


Figura 28 - pH das microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina, após 4 meses de armazenamento.

Após 4 meses de armazenamento, os valores de pH das microemulsões múltiplas reduziram ligeiramente para um pH mais ácido, sendo que estes valores se encontram entre os 6,40 e 6,70 (Figura 28). A microemulsão múltipla A/O/A que ao fim dos 4 meses de armazenamento apresentou um pH mais baixo foi a MB3_4 (6,40±0,06).

Ainda assim, apesar do decréscimo observado, os valores de pH de todas as preparações, mantêm-se aceitáveis para a aplicação na pele. Santos (2015) também verificou que ao longo do tempo, houve uma tendência para a descida do pH de todas as microemulsões preparadas, quer estas apresentassem ou não fármaco na sua composição.

Os resultados obtidos para a análise do pH das microemulsões múltiplas A/O/A com (M3_6) e sem albumina (MB3_6), após preparação destas, estão apresentados na Figura 29.

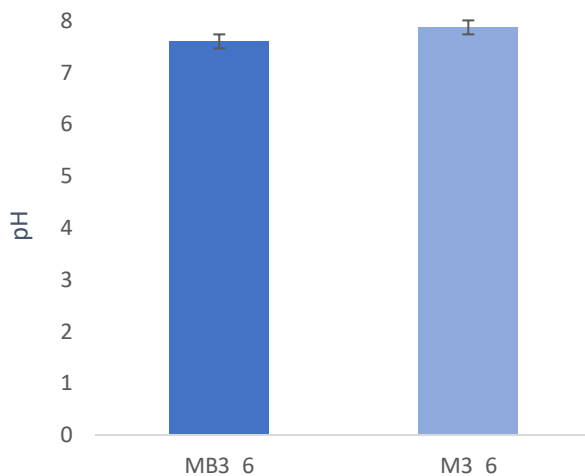


Figura 29 - pH das microemulsões múltiplas A/O/A sem albumina (MB3_6) e com albumina (M3_6), após preparação.

Após a preparação de cada uma das microemulsões múltiplas, os valores de pH observados não apresentaram grandes diferenças entre si, sendo que a MB3_6 como já vimos anteriormente, apresenta um pH de $7,60 \pm 0,11$ e a M3_6 apresenta um pH de $7,80 \pm 0,06$ (Figura 29). A presença de albumina não alterou de forma significativa o pH da microemulsão múltipla A/O/A (M3_6), assim como já se tinha verificado para o caso da microemulsão simples O/A (M1).

2.3.1.4. Estabilidade acelerada por centrifugação

Como se viu anteriormente, apesar das microemulsões simples O/A com e sem albumina apresentarem um pH aceitável para serem utilizadas na pele, estas mostraram alguma instabilidade física ao nível do tamanho das gotículas da fase interna, após algum tempo de armazenamento. Por isso, decidiu-se prosseguir os estudos de caracterização das microemulsões, apenas com as microemulsões múltiplas A/O/A.

O estudo de estabilidade acelerada foi feito após a preparação da microemulsão A/O/A sem albumina (MB3_6) e da microemulsão A/O/A com albumina (M3_6), sendo que estas foram submetidas a dois ciclos de centrifugação de 30 min, a 3000 rpm.

Na Figura 30 está representado o resultado do ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação da microemulsão MB3_6. Na Figura 31 está representado o resultado do mesmo ensaio relativo à microemulsão M3_6.

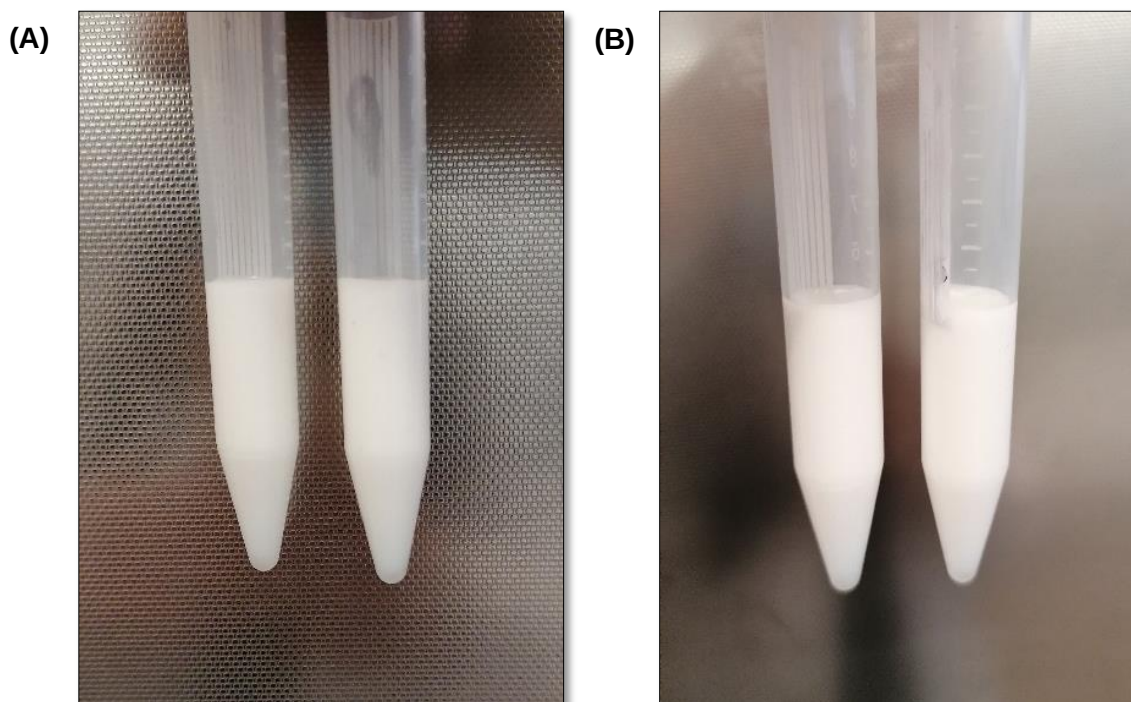


Figura 30 - Resultado do ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação da microemulsão múltipla A/O/A sem albumina (MB3_6) **(A)** Após o 1º ciclo de centrifugação **(B)** Após o 2º ciclo de centrifugação.

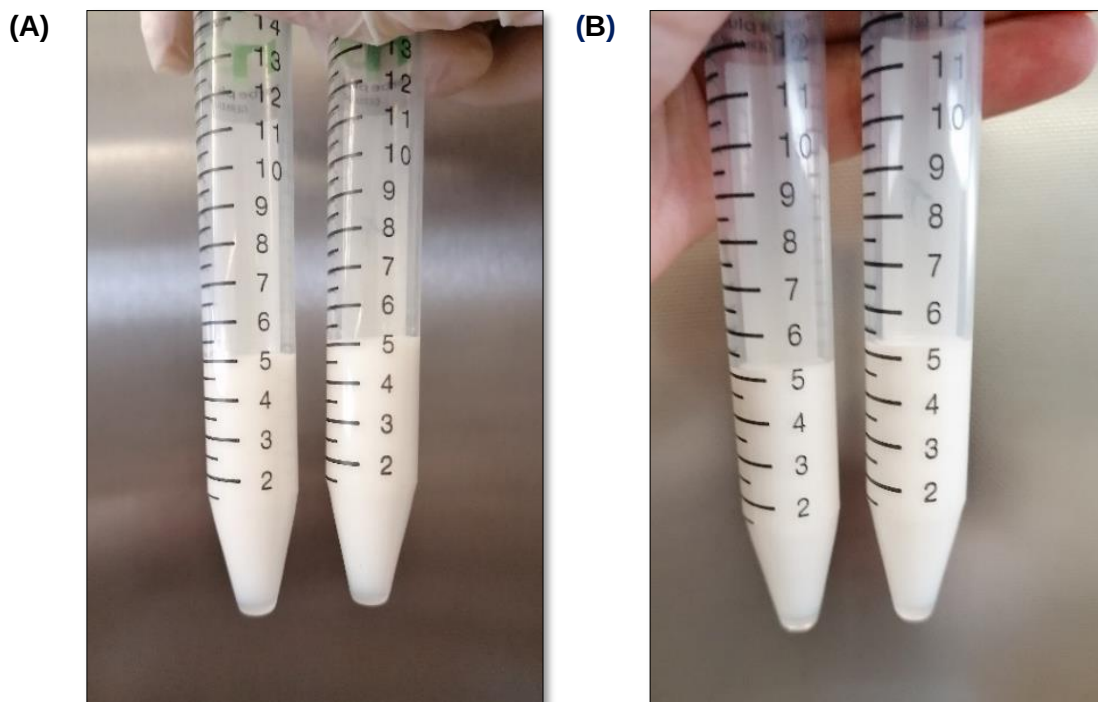


Figura 31 - Resultado do ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação da microemulsão múltipla A/O/A com albumina (M3_6) **(A)** Após o 1º ciclo de centrifugação **(B)** Após o 2º ciclo de centrifugação.

Pela observação das imagens, é possível concluir que as microemulsões permaneceram homogêneas após os dois ciclos de centrifugação, revelando que são estáveis, não ocorrendo separação de fases ou qualquer formação de sedimento compacto, quando expostas a condições de força centrífuga excessiva.

Estes resultados são coerentes com os obtidos por Santos (2015), em que após centrifugação, todas as microemulsões preparadas permaneceram homogêneas e apresentaram uma boa estabilidade física.

2.3.1.5. Teor de albumina

Como já referido anteriormente, antes de se proceder ao doseamento da albumina (BSA), foi necessário realizar uma curva de calibração, para posteriormente ser calculado o teor de BSA presente nas microemulsões.

Foram preparadas soluções padrão de BSA em água para se obter a curva de calibração. As concentrações das diferentes soluções padrão no intervalo 0-120%, assim como as respectivas absorvâncias lidas a 595 nm, podem ser encontradas na Tabela XI.

Tabela XI - Soluções padrão preparadas para a obtenção da curva de calibração da BSA em água e as respectivas médias das absorvâncias.

Padrões	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias médias (n=3)
120%	240	0,5497
100%	200	0,4996
80%	160	0,4025
60%	120	0,3064
40%	80	0,2098
0%	0	0,0000

A representação gráfica dos valores de absorvância em função da concentração de BSA das soluções padrão pode ser observada na Figura 32.

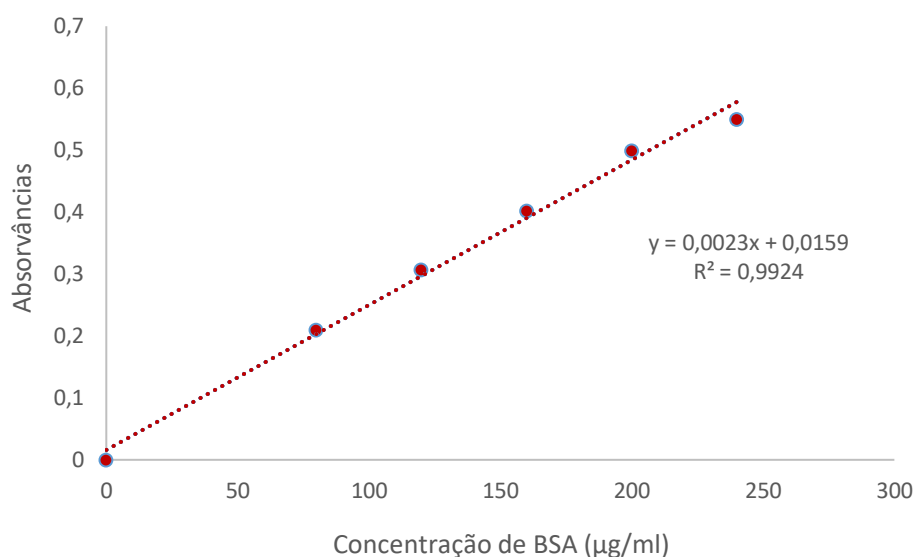


Figura 32 - Curva de calibração das soluções de BSA.

O método de doseamento da albumina por espectrofotometria UV/Vis demonstrou apresentar uma correlação linear para a gama de concentrações ensaiadas, embora os valores do coeficiente de determinação (R^2) devessem ser superiores a 0,999.

Posteriormente à obtenção da curva de calibração, procedeu-se ao doseamento da BSA das microemulsões múltiplas A/O/A armazenadas durante 30 dias a 5 e a 20°C.

Todos os valores das absorvâncias obtidos para as amostras com albumina foram corrigidos de forma a eliminar a interferência dos componentes que pudessem absorver no mesmo comprimento de onda da BSA, fazendo a diferença entre o valor de absorvância obtido para a amostra da microemulsão com albumina e o valor de absorvância obtido para a amostra da microemulsão sem albumina.

Na Tabela XII estão representados os valores médios de absorvância e os valores de teor de albumina das microemulsões múltiplas A/O/A armazenadas a 5 e 20°C.

Tabela XII - Teor de albumina (BSA) das microemulsões múltiplas A/O/A armazenadas a 5 e 20°C.

Amostra	Absorvâncias médias (n=3)	Absorvância corrigida	Teor de BSA (%)
M3_6 (5°C)	1,5119	0,4310	90,00
M3_6 (20°C)	1,0383	0,1020	18,70

Pela análise da Tabela XII, ao fim de 30 dias de armazenamento, observa-se um elevado decréscimo do teor de albumina na microemulsão múltipla armazenada a 20°C (cerca de 81%), mostrando que a albumina sofreu uma degradação acentuada à temperatura ambiente, revelando assim a elevada instabilidade desta proteína. No caso da microemulsão múltipla armazenada a 5°C, houve um decréscimo de cerca de 10% do teor de albumina.

A microemulsão múltipla A/O/A armazenada a 20°C apresentou uma menor estabilidade química em relação à microemulsão múltipla A/O/A armazenada a 5°C, o que permite concluir que a temperatura de armazenamento teve influência na velocidade de degradação da albumina. De acordo com a literatura, sabe-se que a temperatura é um fator importante que está envolvido na degradação de muitas substâncias, incluindo as proteínas e, por essa razão, com o aumento da temperatura, pode aumentar a degradação química das mesmas (Kommanaboyina e Rhodes, 1999).

2.3.2. Caracterização e avaliação da estabilidade das microemulsões gelificadas

2.3.2.1. Análise organolética

Todas as microemulsões gelificadas utilizando o agente gelificante PFC® apresentaram um aspeto adequado para serem aplicados na pele. Exibiram um aspeto branco, opaco e homogêneo (Figura 33).



Figura 33 - Aspeto final das microemulsões simples (lado esquerdo da imagem) e múltipla (lado direito da imagem) gelificadas.

2.3.2.2. Reologia

Numa fase inicial, foi avaliada a reologia da microemulsão simples O/A gelificada, designada MES gelificada, e da microemulsão múltipla A/O/A gelificada, designada ME gelificada, preparadas segundo as fórmulas descritas na secção 2.2.1., mas sem albumina. A análise reológica das microemulsões gelificadas foi realizada conforme descrito na secção 2.2.4.2.

Na Figura 34 está representado o gráfico tensão de corte *versus* velocidade de corte das microemulsões gelificadas, após 8 e 30 dias de armazenamento a 20°C.

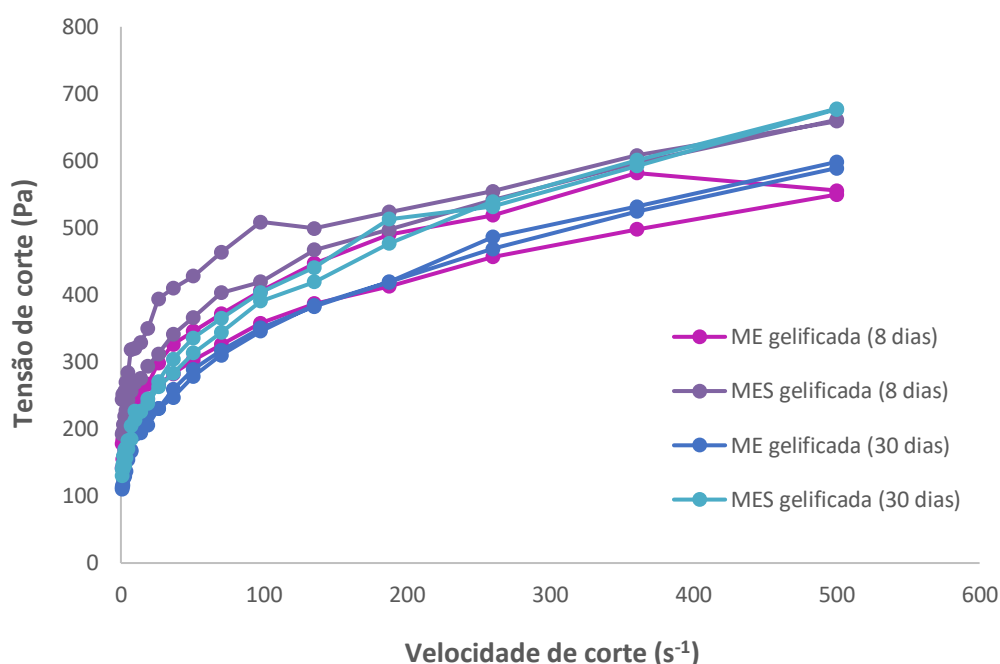


Figura 34 - Reogramas da microemulsão A/O/A gelificada (ME gelificada) e da microemulsão O/A gelificada (MES gelificada), aos 8 e 30 dias de armazenamento.

Pela análise da Figura 34, ao fim de 8 dias de armazenamento, pode-se verificar que as formulações não obedeceram à lei de Newton, sendo então consideradas fluidos não-Newtonianos. Já as microemulsões não gelificadas obtidas por Zachar (2010) exibiram propriedades de fluxo Newtoniano, o que é típico no caso das microemulsões devido à baixa viscosidade. Pode-se observar também que ambas as microemulsões gelificadas apresentaram um comportamento reofluidificante com tensão de cedência, uma vez que a viscosidade aparente diminuiu com o aumento da velocidade de corte, mas a deformação só ocorreu após a aplicação de uma determinada tensão de corte.

As microemulsões gelificadas apresentaram também alguma tixotropia, já que houve uma ligeira diminuição da viscosidade aparente com o tempo. É interessante a existência de tixotropia para que após a aplicação, o produto seja capaz de recuperar a viscosidade inicial (Gaspar e Campos, 2003). A microemulsão múltipla gelificada (ME gelificada) apresentou valores de viscosidade aparente ligeiramente menores, mas maior tixotropia do que a microemulsão simples gelificada (MES gelificada), como se pode verificar pela maior área de histerese, aos 8 dias de armazenamento.

Ao fim de 30 dias de armazenamento, pode-se observar que as microemulsões gelificadas mantiveram o comportamento reofluidificante com tensão de cedência. Nesta fase, verificou-se que a tixotropia é praticamente nula e muito semelhante para as duas microemulsões gelificadas. Além disso, a microemulsão múltipla gelificada (ME gelificada) continuou a apresentar valores de viscosidade aparente ligeiramente menores em relação à microemulsão simples gelificada (MES gelificada).

Estes ensaios reológicos mostraram que a viscosidade dos dois tipos de microemulsões gelificadas não se alterou ao longo dos 30 dias de armazenamento. Mas é relevante referir que a microemulsão múltipla gelificada (ME gelificada) apresentou, a velocidades de corte mais elevadas, valores de viscosidade mais reduzidos relativamente à microemulsão simples gelificada (MES gelificada), aos 8 e 30 dias de armazenamento.

Posteriormente, realizou-se um estudo comparativo da reologia das microemulsões múltiplas A/O/A gelificadas, com e sem albumina, armazenadas à temperatura ambiente (20°C) e no frigorífico (5°C).

Nas Figuras 35 e 36 estão representados os gráficos tensão de corte *versus* velocidade de corte das microemulsões múltiplas gelificadas, com e sem albumina, após 8 e 30 dias de armazenamento às temperaturas de 5°C e 20°C.

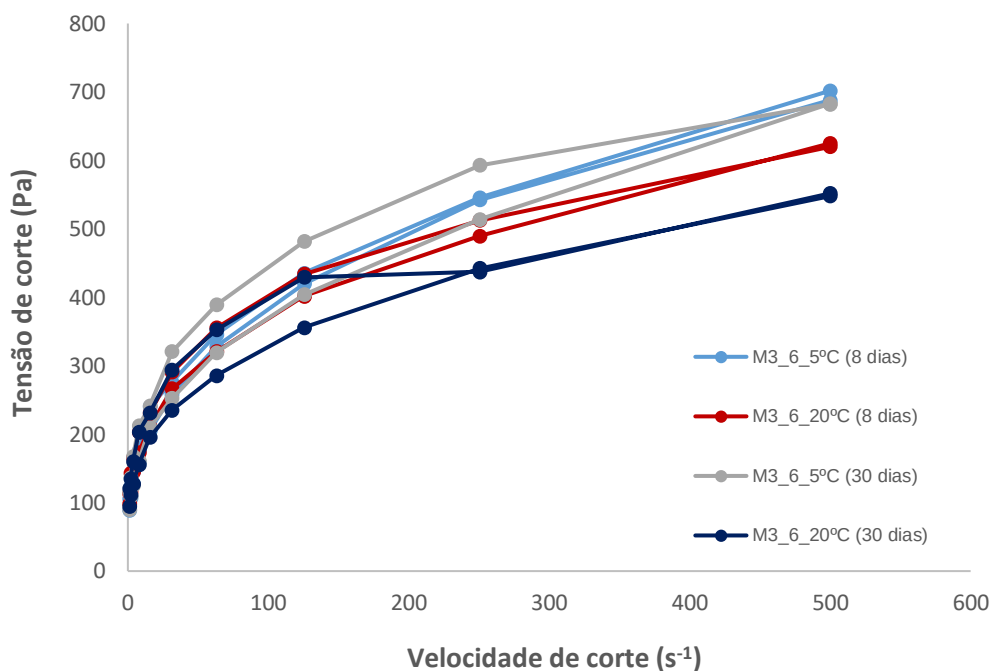


Figura 35 - Reogramas das microemulsões A/O/A gelificadas, com albumina (M3_6), aos 8 e 30 dias de armazenamento a 5 e 20°C.

Pela análise da Figura 35, ao fim de 8 dias de armazenamento, assim como no estudo anterior, as formulações são consideradas fluidos não-Newtonianos e apresentaram um comportamento reofluidificante com tensão de cedência. Ambas as microemulsões múltiplas gelificadas com albumina (MB3_6) armazenadas a 5 e 20°C, não apresentaram quase nenhuma tixotropia, uma vez que as curvas ascendentes e descendentes dos reogramas são praticamente sobreponíveis. No entanto, a microemulsão múltipla gelificada com albumina (M3_6), armazenada a 20°C, mostrou valores de viscosidade aparente ligeiramente menores, a velocidades de corte mais elevadas, em comparação com a microemulsão múltipla gelificada com albumina (M3_6) armazenada a 5°C.

Ao fim de 30 dias de armazenamento, quer a microemulsão múltipla gelificada com albumina (M3_6) armazenada a 5°C, quer a microemulsão múltipla gelificada com albumina (M3_6) armazenada a 20°C, exibiram tixotropia. As propriedades tixotrópicas são cruciais para a aplicação tópica de formulações semissólidas (Lee *et al.*, 2009) e como se pode constatar, as microemulsões múltiplas gelificadas com albumina (M3_6) ao apresentarem tixotropia, podem ter a vantagem de se deformarem durante a aplicação, ou seja, são capazes de se tornarem mais fluidas, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento em que se termina a aplicação, o que evita que o produto escorra. Tal como aconteceu aos 8 dias de armazenamento, a microemulsão múltipla gelificada com albumina (M3_6), armazenada a 20°C, a velocidades de corte mais elevadas, continuou a apresentar valores de viscosidade aparente ligeiramente menores, em comparação com a microemulsão múltipla gelificada com albumina (M3_6), armazenada a 5°C.

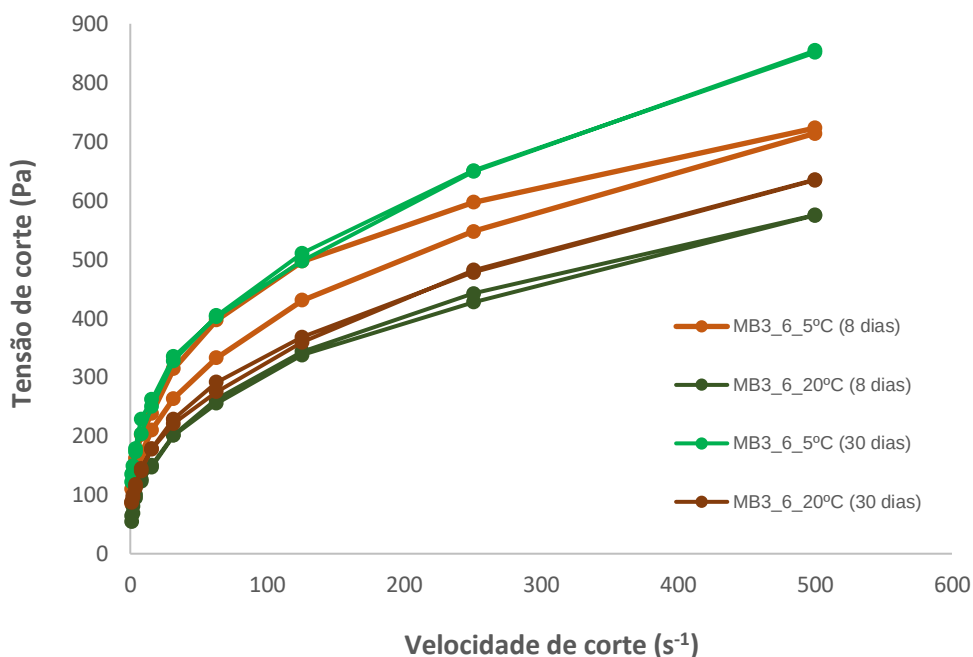


Figura 36 - Reogramas das microemulsões A/O/A gelificadas, sem albumina (MB3_6), aos 8 e 30 dias de armazenamento a 5 e 20°C.

Pela análise da Figura 36, ao fim de 8 dias de armazenamento, a microemulsão múltipla gelificada sem albumina (MB3_6) armazenada a 5°C, apresentou alguma tixotropia (maior área de histerese), em comparação com a microemulsão múltipla gelificada sem albumina (MB3_6) armazenada a 20°C. Além disso, a microemulsão múltipla gelificada sem albumina (MB3_6), armazenada a 20°C, exibiu valores de viscosidade aparente muito menores, em comparação com a microemulsão múltipla gelificada sem albumina (MB3_6), armazenada a 5°C.

Ao fim de 30 dias de armazenamento, ambas as microemulsões múltiplas gelificadas sem albumina (MB3_6) armazenadas a 5 e 20°C, não apresentaram tixotropia, visto que as curvas ascendentes e descendentes dos reogramas são quase sobreponíveis. Comparativamente aos 8 dias de armazenamento, apesar de ter existido um ligeiro aumento da viscosidade no caso da microemulsão múltipla gelificada sem albumina armazenada a 5°C, a microemulsão múltipla gelificada sem albumina (MB3_6) armazenada a 20°C, continuou a apresentar valores de viscosidade aparente ligeiramente menores, em comparação com a microemulsão múltipla gelificada sem albumina (MB3_6) armazenada a 5°C.

Pode-se concluir que quando se comparam as duas temperaturas, quer para as microemulsões múltiplas gelificadas com albumina, quer para as microemulsões múltiplas gelificadas sem albumina, ao fim dos 30 dias de armazenamento, os valores de viscosidade não alteraram de forma considerável, sugerindo que o humectante (glicerina) presente nas formulações foi eficaz na retenção de água. Além disso, a presença da albumina também não afetou o comportamento reológico destes sistemas.

É de notar também que sempre que as microemulsões múltiplas gelificadas foram armazenadas a 5°C, exibiram sempre uma maior viscosidade, comparativamente às que foram armazenadas a 20°C, após 30 dias da preparação, apesar dos ensaios terem sido realizados com ambas as amostras mantidas à temperatura ambiente.

2.3.2.3. Textura

Foram realizados estudos preliminares da textura de uma microemulsão simples O/A gelificada, designada MES gelificada, e de uma microemulsão múltipla A/O/A gelificada, designada ME gelificada, preparadas segundo as fórmulas descritas na secção 2.2.1, mas sem albumina. A análise da textura das microemulsões gelificadas foi realizada conforme descrito na secção 2.2.4.3.

Na Figura 37 estão representados os resultados da firmeza (aferida pelos valores de força máxima) e da adesividade (aferida pelos valores de área negativa) das microemulsões simples e múltipla, aos 8 e 30 dias de armazenamento a 20°C.

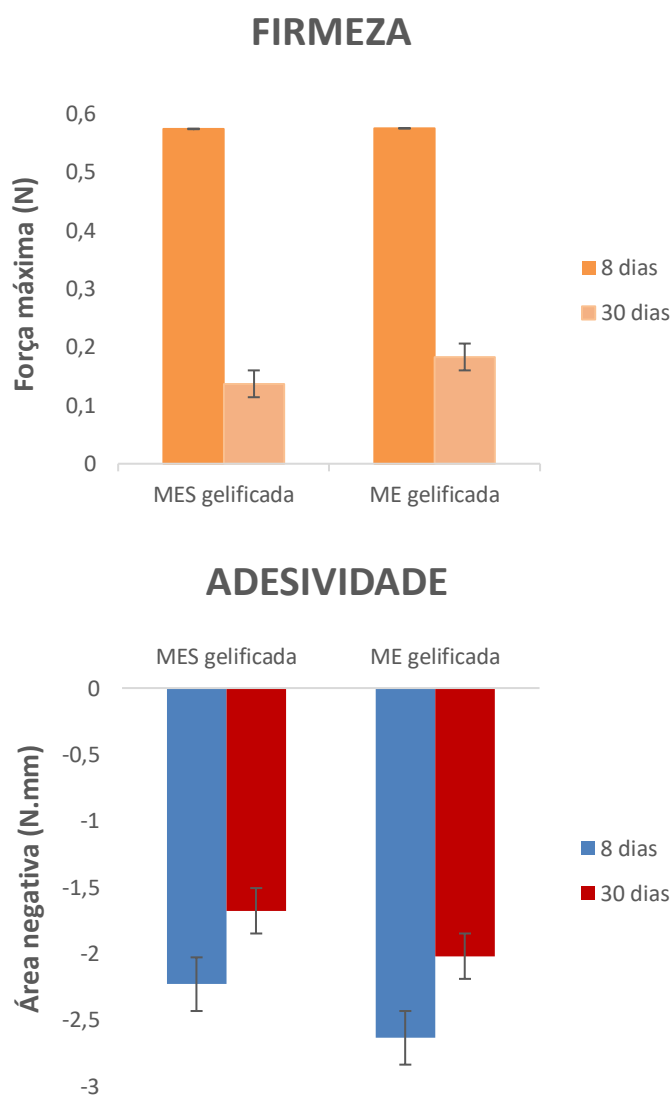


Figura 37 - Textura da microemulsão O/A gelificada (MES gelificada) e da microemulsão A/O/A gelificada (ME gelificada), avaliada quanto à firmeza e adesividade, aos 8 e 30 dias de armazenamento.

A Figura 37 mostra como se apresentam as microemulsões gelificadas relativamente à firmeza e à adesividade, aos 8 e 30 dias após a preparação. Efetuou-se o Teste *t* de Student para comparar os valores da firmeza e da adesividade das microemulsões gelificadas. Pode-se verificar que no que diz respeito à firmeza, aos 8 dias de armazenamento, não há diferenças significativas entre os valores, uma vez que o valor-*p* obtido é superior a 0,05 ($p=0,97$). No que concerne à adesividade, após a realização do Teste *t* de Student, verifica-se que há diferenças significativas entre os valores de adesividade das microemulsões gelificadas, visto que o valor-*p* obtido é inferior a 0,05 ($p=0,02$). Por isso, a microemulsão múltipla gelificada (ME gelificada) apresentou valores significativamente mais elevados de adesividade do que a microemulsão simples gelificada (MES gelificada).

Relativamente aos 30 dias de armazenamento, efetuou-se também o Teste *t* de Student e verifica-se que as microemulsões gelificadas relativamente à firmeza, demonstraram diferenças significativas, uma vez que o valor-*p* obtido é inferior a 0,05 ($p=0,01$). Desta forma, a microemulsão múltipla gelificada (ME gelificada) apresentou uma maior firmeza em relação à microemulsão simples gelificada (MES gelificada), aos 30 dias de armazenamento, embora a diferença não seja muito acentuada. As amostras que revelam maior firmeza tendem a ser mais difíceis de remover do recipiente do produto e de espalhar na pele (Gratieri *et al.*, 2010). No entanto, os valores da firmeza da ME gelificada apesar de mais elevados são adequados para a remoção do recipiente de acondicionamento e espalhamento na pele. No que diz respeito à adesividade, a microemulsão múltipla gelificada manteve-se com valores mais elevados do que a MES gelificada. Empregou-se o Teste *t* de Student e verificou-se também que existem diferenças significativas nos valores de adesividade, visto que o valor-*p* obtido é inferior a 0,05 ($p=0,02$).

Conclui-se que houve uma diminuição muito acentuada da firmeza e uma diminuição ligeira da adesividade de ambas as microemulsões gelificadas, após 30 dias de armazenamento, o que pode ser indicativo de alguma instabilidade e eventual tendência para a aglomeração das gotículas e separação de fases. Já Santos (2015) verificou que as microemulsões gelificadas utilizando Carbopol® 974P, sem a presença de substância ativa, apresentaram um aumento da firmeza e da adesividade, ao fim de 34 dias de armazenamento.

Posteriormente realizou-se a análise da textura das microemulsões múltiplas A/O/A gelificadas, com e sem albumina, armazenadas à temperatura ambiente (20°C) e no frigorífico (5°C).

Nas Figuras 38 e 39 estão representados os resultados da firmeza e da adesividade, respetivamente, das microemulsões múltiplas gelificadas com (M3_6) e sem albumina (MB3_6), após 8 e 30 dias de armazenamento às temperaturas de 5 e 20°C.

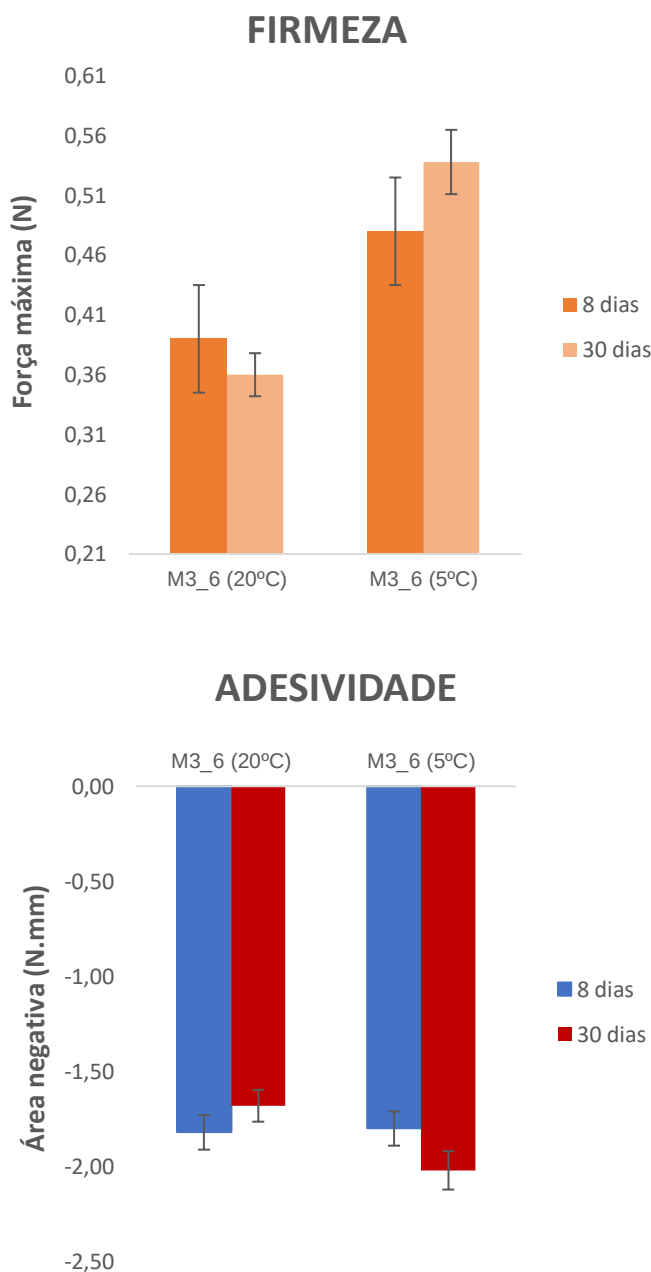


Figura 38 - Textura das microemulsões A/O/A gelificadas, com albumina (M3_6), avaliada quanto à firmeza e adesividade, aos 8 e 30 dias de armazenamento a 5 e 20°C.

Após a realização do Teste t de Student, verifica-se que 8 dias após a preparação, as microemulsões gelificadas relativamente à firmeza, apresentaram diferenças significativas, sendo o valor- p obtido inferior a 0,05 ($p=0,01$). Desta forma, a que apresentou maior firmeza foi a microemulsão gelificada com albumina que foi armazenada a 5°C. No que diz respeito à adesividade, os valores de adesividade não diferem entre si. Efetuou-se o Teste t de Student e verificou-se que não existem diferenças significativas nos valores de adesividade, visto que o valor- p obtido é superior a 0,05 ($p=0,82$).

Ao fim dos 30 dias de armazenamento, a que prosseguiu com maior firmeza foi a microemulsão com albumina que foi armazenada a 5°C, assim como aconteceu aos 8 dias de armazenamento. Em relação aos valores de firmeza, após a realização do Teste t de Student, verificou-se que as microemulsões gelificadas continuaram a exibir diferenças significativas, sendo o valor- p obtido inferior a 0,05 ($p=0,00$). No que diz respeito à adesividade, os valores de adesividade também diferiram entre si, sendo que a microemulsão gelificada armazenada a 5°C, apresentou valores mais elevados do que a 20°C, após 30 dias de armazenamento. Efetuou-se o Teste t de Student e verificou-se que existiram diferenças significativas nos valores de adesividade ao longo dos 30 dias de armazenamento, visto que o valor- p obtido é inferior a 0,05 ($p=0,00$).

É possível verificar que a firmeza e a adesividade aumentaram ligeiramente ao longo dos 30 dias de armazenamento, no caso da microemulsão múltipla gelificada contendo albumina, armazenada a 5°C, mas mantiveram-se com valores adequados para uma fácil remoção do recipiente de acondicionamento e aplicação na pele.

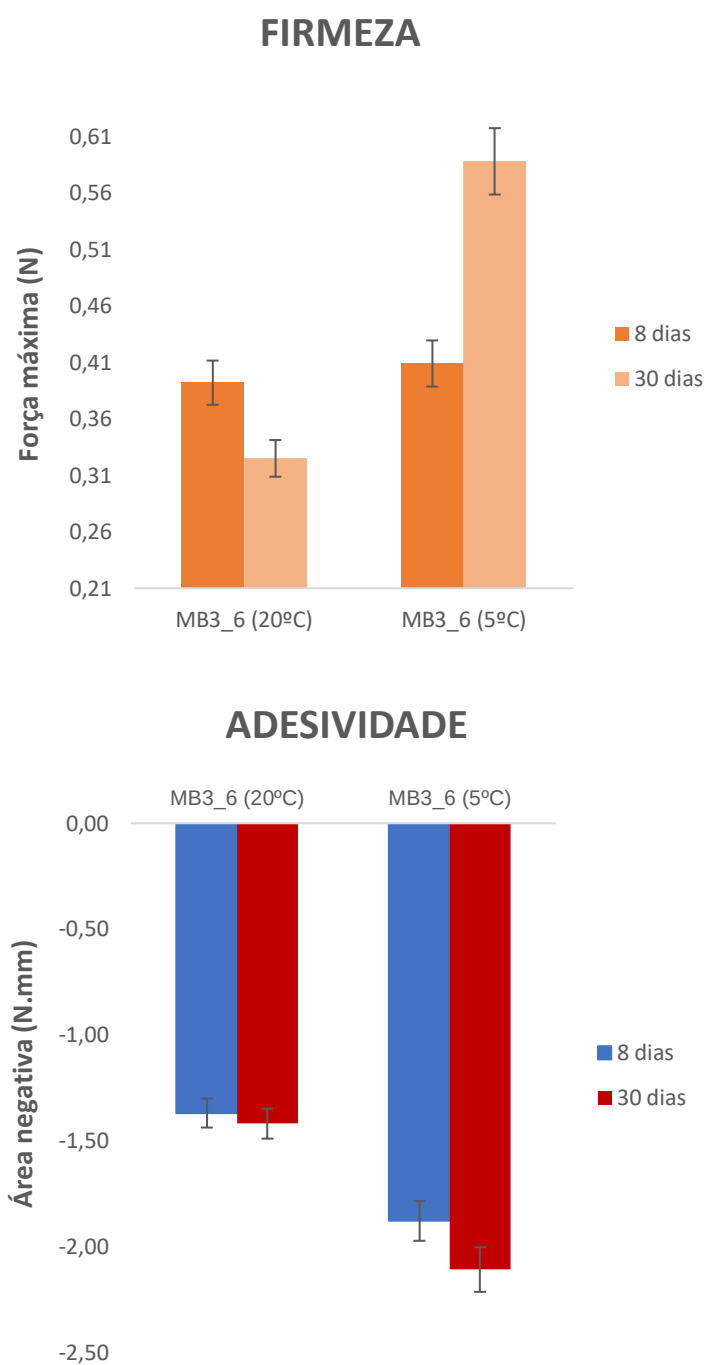


Figura 39 - Textura das microemulsões A/O/A gelificadas, sem albumina (MB3_6), avaliada quanto à firmeza e adesividade, aos 8 e 30 dias de armazenamento a 5 e 20°C.

A Figura 39 mostra como se apresentam as microemulsões gelificadas, sem albumina, armazenadas a 5 e 20°C, relativamente à firmeza e à adesividade. Realizou-se o Teste *t* de Student e verificou-se que 8 dias após armazenamento a diferentes temperaturas, as microemulsões gelificadas relativamente à firmeza, não apresentaram diferenças significativas, sendo o valor-*p* obtido superior a 0,05 ($p=0,26$). No que concerne à adesividade, o Teste *t* de Student demonstrou que existem diferenças significativas nos valores de adesividade das amostras armazenadas a diferentes temperaturas, visto que o valor-*p* obtido é inferior a 0,05 ($p=0,01$). Deste modo, a microemulsão gelificada sem albumina, armazenada a 5°C, apresenta maior adesividade em relação à microemulsão gelificada sem albumina, armazenada a 20°C.

A microemulsão gelificada sem albumina que foi armazenada a 5°C, exibiu maior firmeza, após 30 dias de armazenamento, sendo que este aumento foi acentuado em comparação com a MB3_6, armazenada a 20°C. Realizou-se o Teste *t* de Student e verificou-se que as microemulsões gelificadas, relativamente à firmeza, apresentaram diferenças significativas, sendo o valor-*p* obtido inferior a 0,05 ($p=0,00$). No que concerne à adesividade, a microemulsão gelificada sem albumina, armazenada a 5°C, apresentou um aumento da adesividade ao longo dos 30 dias de armazenamento, e desta forma continuou a apresentar uma maior adesividade, relativamente à microemulsão gelificada sem albumina, armazenada a 20°C. Efetuou-se o Teste *t* de Student e verificou-se que continuaram a existir diferenças significativas nos valores de adesividade das amostras armazenadas a diferentes temperaturas, visto que o valor-*p* obtido é inferior a 0,05 ($p=0,01$).

Pelo que se pode observar, ao fim de 30 dias de armazenamento, verifica-se quer para as microemulsões múltiplas gelificadas com albumina, quer para as microemulsões múltiplas gelificadas sem albumina, que à temperatura de armazenamento de 5°C, a adesividade e a firmeza apresentaram de uma maneira geral valores relativamente mais elevados, embora estes ensaios tenham sido realizados com as amostras mantidas à mesma temperatura. Os valores de firmeza e adesividade também são adequados para uma fácil remoção do recipiente de acondicionamento e aplicação na pele.

De um modo geral, as microemulsões múltiplas gelificadas, com e sem albumina (M3_6 e MB3_6, respetivamente), não apresentaram valores de firmeza e de adesividade muito díspares entre si, o que significa que a presença da albumina não teve influência significativa nas propriedades de textura destes sistemas.

2.3.2.4. Liberação *in vitro* de albumina

O perfil de liberação *in vitro* da albumina foi avaliado utilizando o aparelho de dissolução SOTAX AT7 (Suíça), com pá agitadora, contendo 200 mL de água, a $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, sendo que a massa de microemulsão múltipla gelificada (M3_6) utilizada no ensaio foi de 5g,

A concentração de BSA libertada ao longo das 4 horas de ensaio foi determinada através da análise das absorvâncias corrigidas das amostras recolhidas (lidas a 595 nm), sendo as concentrações calculadas utilizando a equação da reta de calibração obtida anteriormente em 2.2.2.5. É de notar que os valores das absorvâncias obtidos para a microemulsão múltipla gelificada com BSA foram corrigidos de forma a eliminar a interferência dos componentes que pudessem absorver no mesmo comprimento de onda da BSA, fazendo a diferença entre os valores das absorvâncias obtidos para as amostras da microemulsão múltipla gelificada com BSA e os valores das absorvâncias obtidos para a amostra da microemulsão múltipla gelificada sem BSA (Tabela XIII).

Tabela XIII - [BSA] libertada e respetivas quantidades de proteína libertada ao longo das 4h.

Tempo (min)	Absorvâncias médias corrigidas	[BSA] ($\mu\text{g/mL}$)	Q (μg)	Q (%)
60	0,1317	50,35	10069,57	50,35
120	0,2205	88,96	17596,52	87,98
180	0,2363	95,83	18903,48	94,52
240	0,2002	80,13	15999,78	80,00

Na Figura 40 está representado o perfil de liberação *in vitro* da albumina, ao longo de 4 horas de ensaio.

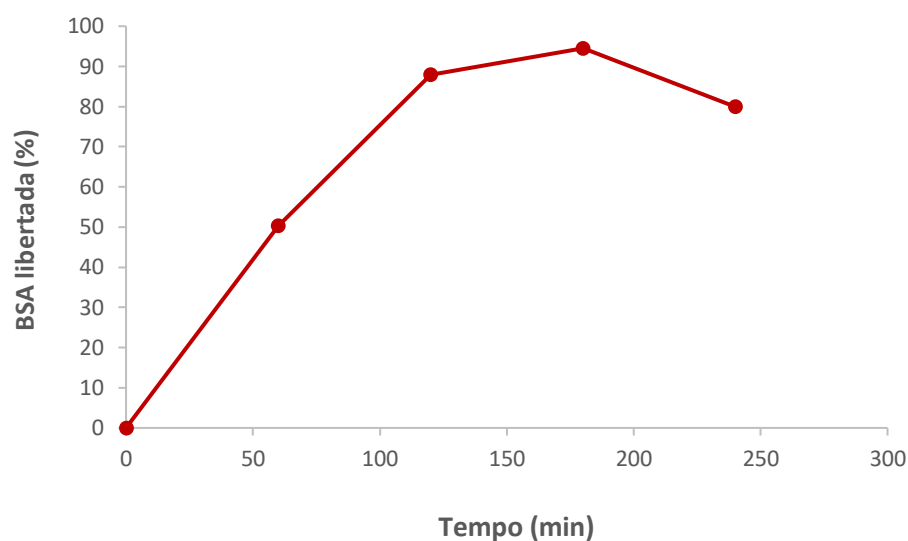


Figura 40 - Perfil de libertação *in vitro* da albumina.

Pela observação do gráfico da Figura 40, constata-se que na primeira hora de ensaio, metade da albumina foi libertada ($Q=50,34\%$). Posteriormente, ao fim de 3 horas de ensaio, é possível verificar que praticamente toda a BSA foi libertada ($Q=94,52\%$). Às 4 horas de ensaio, é possível verificar uma diminuição da libertação da BSA, não atingindo a fase de *plateau*. Parekh (2011) realizou um ensaio de libertação de 48 horas e verificou que a BSA incorporada em microemulsões, foi libertada de forma repentina durante 8 horas, e depois disso, a libertação pareceu estabilizar entre as 12h e as 48h.

O facto da albumina se ter libertado completamente ao fim de 3 horas, pode ser indicativo de que esta proteína poderia ter passado da fase mais interna para a fase mais externa da microemulsão múltipla A/O/A, não tendo de atravessar a fase hidrófoba intermédia constituída pelo miristato de isopropilo.

2.3.2.5. Teste de oclusão

A oclusão pode ser explicada como a capacidade que uma formulação semissólida tem em formar uma película sobre a pele, impedindo ou inibindo a evaporação de água e promovendo uma melhor hidratação da pele. Desta forma, o efeito oclusivo é um parâmetro importante a avaliar nas formulações cutâneas. Na Figura 41 está representado o fator de oclusão da vaselina (utilizada como excipiente oclusivo de referência) e da microemulsão múltipla A/O/A gelificada (M3_6), após 24h de ensaio na estufa a 40°C.

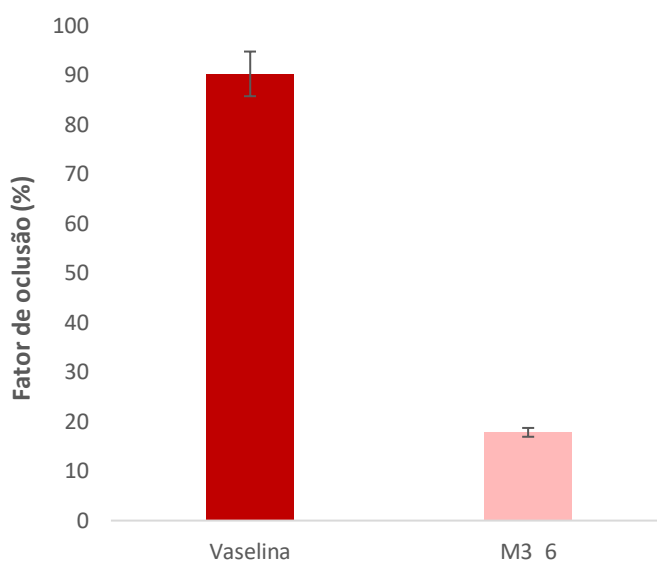


Figura 41 - Fator de oclusão da vaselina e da microemulsão múltipla A/O/A gelificada (M3_6), ao fim de 24h.

A Figura 41 mostra que a microemulsão múltipla A/O/A gelificada (M3_6) apresentou um baixo poder de oclusão após 24 horas de ensaio (F=18%), comparativamente com a vaselina que foi usada como excipiente oclusivo de referência (F=90%). Isto significa que, ao longo das 24h de ensaio, ocorreu uma maior evaporação da água no caso da microemulsão múltipla gelificada, o que leva a concluir que esta formulação demonstra propriedades pouco oclusivas. O baixo poder oclusivo observado poderá ser devido à baixa densidade do miristato de isopropilo (único componente hidrófobo presente na microemulsão múltipla).

Tal como a microemulsão M3_6, os silicones como o dimeticone e o ciclometicone, apesar de formarem uma película protetora à superfície da pele, são totalmente permeáveis ao vapor de água e, por isso, não se verifica também um efeito oclusivo considerável. Esta propriedade deve-se à própria estrutura dos silicones que são cadeias de polímeros independentes umas das outras (Barata, 2002).

3. Conclusões

Atualmente, têm sido realizados vários estudos relacionados com a administração de proteínas que consistem na utilização de sistemas especializados, de forma a melhorar a sua biocompatibilidade e biodisponibilidade. Todavia, as proteínas apresentam dificuldades ao nível da administração cutânea, uma vez que apresentam elevadas massas moleculares e estruturas muito complexas e, por isso, uma das estratégias para ultrapassar estas limitações consiste na utilização de nanossistemas que apresentam uma composição semelhante à pele humana, como é o caso dos lipossomas e das microemulsões.

Neste trabalho, numa fase inicial foram preparadas microemulsões simples O/A com e sem albumina. Essas microemulsões foram caracterizadas relativamente às características organoléticas, ao tamanho das gotículas da fase interna e ao pH. Posteriormente, foram preparadas microemulsões múltiplas A/O/A com e sem albumina, que foram caracterizadas relativamente às características organoléticas, ao tamanho das gotículas da fase interna, ao pH, à estabilidade acelerada por centrifugação e ao teor de albumina. A análise organolética revelou que todas as microemulsões preparadas apresentaram um aspeto branco e homogéneo. No que se refere ao tamanho das gotículas da fase interna, em geral, as microemulsões múltiplas A/O/A apresentaram valores relativamente mais baixos (após a preparação e ao longo do tempo de armazenamento) e, portanto, demonstraram maior estabilidade física do que as microemulsões simples O/A. No que ao pH diz respeito, todas as microemulsões preparadas apresentaram valores adequados para a aplicação na pele, após a preparação e ao fim de alguns meses de armazenamento. Os estudos de estabilidade revelaram que as microemulsões múltiplas com e sem albumina são estáveis quando expostas à força gravítica utilizada no ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação. Relativamente ao teor de albumina, verificou-se um decréscimo muito acentuado ao fim de 30 dias, no caso da microemulsão múltipla A/O/A armazenada a 20°C, demonstrando uma menor estabilidade química, em comparação com a microemulsão múltipla A/O/A armazenada a 5°C. Estes resultados permitem concluir que à temperatura ambiente, a albumina incorporada na fase aquosa interna da microemulsão múltipla, poder-se-á ter degradado, pelo que a formulação desenvolvida deverá ser armazenada a baixas temperaturas (5°C).

Posteriormente, as microemulsões foram gelificadas com o agente gelificante PFC®, e foram submetidas à análise das características organoléticas, a ensaios de reologia, textura, libertação *in vitro* de albumina e efeito oclusivo. No que diz respeito à análise organolética, todas as microemulsões gelificadas exibiram um aspeto homogéneo e adequado para serem aplicadas na pele.

Relativamente ao comportamento reológico, todas as microemulsões gelificadas revelaram um comportamento reofluidificante com tensão de cedência, o qual se manteve praticamente sem alterações após o armazenamento, evidenciando a estabilidade física das formulações desenvolvidas. Além disso, apesar dos valores de viscosidade não se terem alterado de forma considerável ao longo do tempo, é de notar que as microemulsões múltiplas gelificadas, armazenadas a 5°C, exibiram sempre uma maior viscosidade, comparativamente às que foram armazenadas a 20°C.

Quanto aos parâmetros de textura, a firmeza e a adesividade aumentaram ligeiramente ao longo dos 30 dias de armazenamento, no caso das microemulsões múltiplas gelificadas armazenadas a 5°C, mantendo, no entanto, valores adequados para a remoção do recipiente de acondicionamento e aplicação na pele.

No que diz respeito à libertação *in vitro*, houve praticamente uma total libertação da albumina ao fim de 3 horas de ensaio, o que pode ser indicativo de que esta proteína poderá ter passado para a fase aquosa mais externa da microemulsão múltipla, pelo que o efeito de barreira da fase hidrófoba intermédia constituída pelo miristato de isopropilo não foi verificado.

O teste de oclusão mostrou que a microemulsão múltipla gelificada apresentou um fator de oclusão relativamente baixo em comparação com a vaselina, que foi utilizada como excipiente oclusivo de referência. Este baixo poder de oclusão pode ter ocorrido devido à baixa densidade do miristato de isopropilo.

Num trabalho futuro seria pertinente utilizar outras técnicas de preparação para tentar diminuir o tamanho e a uniformidade das gotículas da fase interna da microemulsão múltipla e, porventura, avaliar este parâmetro durante um maior período de armazenamento. Seria também importante realizar estudos de permeação *in vitro*, utilizando células de difusão para avaliar o efeito da microemulsão desenvolvida na capacidade de promoção da penetração da albumina através da pele.

Em suma, as microemulsões desenvolvidas neste trabalho poderão constituir sistemas promissores para a promoção da penetração cutânea de proteínas, tais como os fatores de crescimento utilizados na cicatrização e regeneração da pele.

4. Referências bibliográficas

Aggarwal N, Goindi S, Khurana R. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013 Mai; 105 (1): 158 - 66.

Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. *Acta Derm Venereol* 2013 Mai; 93 (1): 261 - 67.

Allen LV, Popovich NG, Ansel HC. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 Jul; 59 (1): 478 - 90.

Amin N, Das B. A review on formulation and characterization of nanoemulsion. *Int J Curr Pharm Res* 2019 Jul; 11 (4): 1 - 5.

Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharm Res* 2011 Mai; 28 (5): 978 - 85.

Arianto A, Cindy C. Preparation and Evaluation of Sunflower Oil Nanoemulsion as a Sunscreen. *Open Access Maced J Med Sci* 2019 Nov; 7 (22): 3757 - 61.

Atrux-Tallau N, Lasselin J, Han SH, Delmas T, Bibette J. Quantitative analysis of ligand effects on bioefficacy of nanoemulsion encapsulating depigmenting active. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014 Out; 122 (1): 390 - 95.

Aulton ME. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

Avendano-Gomez JR, Grossiord JL, Clausse D. Study of mass transfer in oil-water-oil multiple emulsions by differential scanning calorimetry. *J Colloid Interface Sci* 2005 Out; 290 (1): 533 - 45.

Azeem A, Rizwan M, Ahmad FJ, Khan ZI, Khar RK, Aqil M, et al. Emerging role of microemulsions in cosmetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2008 Fev; 2 (3): 275 - 89.

Barata EAF. *A Cosmetologia - Princípios Básicos*. 2ª ed. Lisboa: Fim de Século; 2002.

Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol* 2012 Mai; 30 (3): 257 - 62.

Barrie C, Timothy M. Transdermal Penetration Enhancers: Applications, Limitations, and Potencial. J Pharm Science 1999 Oct; 88 (1): 955 - 58.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic CM. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen 2008 Sep; 16 (1): 585 - 601.

Basheer HS, Noordin MI, Ghareeb M. Characterization of Microemulsions Prepared using Isopropyl Palmitate with various Surfactants and Cosurfactants. Trop J Pharm Res 2013 Jun; 12 (3): 305 - 10.

Bauer K, Neuber C, Schmid A, Volker KM: US20026426078. 2002.

Benigni M, Pescina S, Grimaudo MA, Padula C, Santi P, Nicoli S. Development of microemulsions of suitable viscosity for cyclosporine skin delivery. Int J Pharm 2018 Jul; 545 (1-2): 197 - 205.

Berry N. Development and stability of microemulsions as carriers for nutraceuticals [dissertação]. Nova Deli: Universidade de Deli; 2011.

Bhardwaj U, Burgess DJ. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. Int J Pharm 2010 Mar; 388 (1): 287 - 94.

Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. Prog Lipid Res 2003 Jan; 42 (1): 1 - 36.

Bringel FA. Avaliação morfofuncional de pele humana conservada em glicerol e submetida à radiação gama: estudo em ratos atômicos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.

Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, et al. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. Ann Surg 1988 Dec; 208 (1): 788 - 94.

Butnariu MV, Giuchici CV. The use of some nanoemulsions based on aqueous propolis and lycopene extract in the skin's protective mechanisms against UVA radiation. J Nanobiotechnol 2011 Feb; 9 (1): 3.

Carlotti ME, Gallarate M, Rossatto V. O/W microemulsion as a vehicle for sunscreens. J Cosmet Sci 2003 Sep; 54 (5): 451 - 62.

Castro AG, Covas JA, Diogo AC. Reologia e suas aplicações industriais. 1ª ed. Lisboa: Instituto Piaget; 2001.

Choi JS, Leng KW, Yoo HS. *In vivo* wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials* 2008 Feb; 29 (1): 587 - 96.

Choi JS, Choi SH, Yoo HS. Coaxial electrospun nanofibers for treatment of diabetic ulcers with binary release of multiple growth factors. *J Mater Chem* 2011 Mar; 21 (1): 5258 - 67.

Choi SW, Pangen R, Park JW. Nanoemulsion-Based Hydrogel for Topical Delivery of Highly Skin-Permeable Growth Factor Combinations: Preparation and *In Vitro* Evaluation. *J Nanosci Nanotechnol* 2017 Abr; 17 (4): 2363 - 69;

Chu Y, Yu D, Wang P, Xu J, Li D, Ding M. Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. *Wound Repair Regen* 2010 Set; 18 (1): 499 - 505.

Costa CK, Oliveira AB, Zanin SMW, Miguel MD. Um estudo da pele seca: produtos emulsionados para seu tratamento e busca de sensorial agradável. *Visão Acadêmica* 2004 Jun; 5 (2): 69 - 78.

Degim Z. Use of microparticulate systems to accelerate skin wound healing. *J Drug Target* 2007 Jul; 16 (1): 437 - 48.

Dong X, Xu J, Wang W, Luo H, Liang X, Zhang L, et al. Repair effect of diabetic ulcers with recombinant human epidermal growth factor loaded by sustained-release microspheres. *Sci China C Life Sci* 2008 Nov; 51 (1): 1039 - 44.

Drogul A, Arslan SA, Tirnaksiz F. Water/oil type microemulsion systems containing lidocaine hydrochloride: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J Microencap* 2014 Abr; 31 (5): 1 - 13.

Fernandez P, André V, Rieger J, Kuhnle A. Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids Surf* 2004 Dez; 251 (1): 53 - 8.

Foldvari M, Baca-Estrada ME, He Z, Hu J, Attah-Poku S, King M. Dermal and transdermal delivery of protein pharmaceuticals: lipid-based delivery systems for interferon alpha. *Biotechnol Appl Biochem* 2010 Out; 30 (2): 129 - 37.

Gainza G, Aguirre JJ, Pedraz JL, Hernández RM, Igartua M. rhEGF-Loaded PLGA-Alginate microspheres enhance the healing of full thickness excisional wounds in diabetised wistar rats. *Eur J Pharm Sci* 2013 Nov; 50 (1): 243 - 52.

Gainza G, Pastor M, Aguirre JJ, Villullas S, Pedraz JL, Hernandez RM, et al. A novel strategy for the treatment of chronic wounds based on the topical administration of rhEGF-loaded lipid

nanoparticles: *In vitro* bioactivity and *in vivo* effectiveness in healing-impaired db/db mice. J Control Release 2014 Jul; 185 (1): 51 - 61.

Gainza G, Villullas S, Pedraz JL, Hernandez RM, Igartua M. Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. Nanomedicine 2015 Ago; 11 (6): 1551 - 73.

Gaspar LR, Campos PMB. Rheological behavior and SPF of sunscreens. Int J Pharm 2003 Jan; 250 (1): 35 - 44.

Getie M, Wohlrab J, Neubert RH. Dermal delivery of desmopressin acetate using colloidal carrier systems. J Pharm Pharmacol 2005 Abr; 57 (1): 423 - 27.

Gharbavi M, Manjili HK, Amani J, Sharafi A. *In vivo* and *in vitro* biocompatibility study of novel microemulsion hybridized with bovine serum albumin as nanocarrier for drug delivery. Heliyon 2019 Jun; 5 (6): e01858.

Gordon R. Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. Semin Oncol Nurs 2013 Ago; 29 (3): 160 - 69.

Gratieri T, Gelfuso GM, Rocha EM, Sarmento VH, Freitas O, Lopez RFV. A poloxamer/chitosan *in situ* forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. Eur J Pharm Biopharm 2010 Jun; 75 (1): 186 - 93.

Haritha SP, Rao KP, Chakravarthi V. A brief introduction to methods of preparation, applications and characterization of nanoemulsion drug delivery system. Indian J Res Pharm Biotechnol 2013; 1 (1): 25 - 38.

Jain K, Kumar RS, Sood S, Gowthamarajan K. Enhanced oral bioavailability of atorvastatin via oil-in-water nanoemulsion using aqueous titration method. J Pharm Sci Res 2013 Jan; 5 (1): 18 - 25.

Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. Biotech 2015 Abr; 5 (1): 123 - 27.

Kalluri H, Banga AK. Transdermal delivery of proteins. AAPS Pharm Sci Tech 2011 Mar; 12 (1): 431 - 41.

Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. Eur J Dermatol 2002 Nov; 12 (4): 390 - 99.

- Kentish S, Wooster TJ, Ashokkumar M, Balachandran S, Mawson R, Simons L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2008 Abr; 9 (1): 170 - 75.
- Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci* 2006 Nov; 123 (1): 369 - 85.
- Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and physiology of the skin. *J Dermatol Nurs* 2011 Jul; 3 (4): 203 - 13.
- Kommanaboyina B, Rhodes CT. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Dev Ind Pharm* 1999 Jul; 25 (7): 857 - 68.
- Krambeck K. Desenvolvimento de Preparações Cosméticas contendo Vitamina C [dissertação]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2009.
- Kupper S, Kłosowska-Chomiczewska I, Szumala P. Collagen and hyaluronic acid hydrogel in water-in-oil microemulsion delivery systems. *Carbohydr Polym* 2017 Nov; 175 (1): 347 - 54.
- Lakshmi J, Kumar BA, Gupta S. Investigation of Microemulsion as a Potencial Carrier for Advanced Transdermal Delivery: An Overview. *Inter J Phar Sci Rev* 2013 Jun; 20 (1): 51 - 59.
- Langasco R, Tanriverdi ST, Özer Ö, Roldo M, Cossu M, Rassu G, et al. Prolonged skin retention of clobetasol propionate by bio-based microemulsions: a potential tool for scalp psoriasis treatment. *Drug Dev Ind Pharm* 2018 Mar; 44 (3): 398 - 406.
- Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2000 Dez; 45 (1): 89 - 121.
- Leão KMM, Reis LVC, Speranza P, Rodrigues AP, Ribeiro APB, Macedo JA. Physicochemical characterization and antimicrobial activity in novel systems containing buriti oil and structured lipids nanoemulsions. *Biotechnol Rep* 2019 Dez; 24 (1): e00365.
- Lee CH, Moturi V, Lee Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J Control Release* 2009 Jun; 136 (1): 88 - 98.
- Lopes CM, Souto EB. *Novas Formas Farmacêuticas Para Administração de Fármacos*. 1ª ed. Porto: Universidade Fernando Pessoa; 2011.
- Lopes LB. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics* 2014 Mar; 6 (1): 52 - 77.

Losi P, Briganti E, Magera A, Spiller D, Ristori C, Battolla B, et al. Tissue response to poly(ether)urethane-polydimethylsiloxane-fibrin composite scaffolds for controlled delivery of pro-angiogenic growth factors. *Biomaterials* 2010 Jul; 31 (1): 5336 - 44.

Lu GW, Gao P. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*. 1^a ed. Norwich: William Andrew; 2010.

Maibach HI. *Skin Permeation – Fundamentals and Application*. 1^a ed. Wheaton: Allured Publishing Corporation; 1993.

Majuru S, Oyewumi MO. Nanotechnology in Drug Development and Life Cycle Management. In: De Villiers MM, Aramwit P, Know GS, editors. *Nanotechnology in Drug Delivery*. Nova Iorque: Springer; 2009. p. 597 - 620.

Malakar J, Sen SO, Nayak AK, Sen KK. Development and evaluation of microemulsions for transdermal delivery of insulin. *ISRN Pharm* 2011 Jul; 2011 (1): 780150.

Malcolmson C, Lawrence MJ. A comparison between nonionic micelles and microemulsions as a means of incorporating the poorly water soluble drug diazepam. *J Pharm Pharmacol* 1990 Dez; 42 (1): 6.

Mark SW, Baldwin SP. Materials for protein delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 1998 Ago; 33 (1): 71 - 86.

Martins MR, Veiga F. Permeation enhancers in transdermal drug delivery systems: a new application of cyclodextrins. *Braz J Pharm Sci* 2002 Jul; 38 (1): 33 - 54.

Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1996 Out; 4 (1): 411 - 20.

McClements DJ. *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press; 2005.

McClements DJ. Nanoemulsions *versus* microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 2012 Jan; 8 (6): 1719 - 29.

McEvoy E, Donegan S, et al. *Encyclopedia of Separation Science*. 1^a ed. Amsterdam: Elsevier Science; 2000.

Meigel WN, Gay S, Weber L. Dermal architecture and collagen type distribution. *Arch Dermatol Res* 1977 Jan; 259 (1): 1 - 10.

Miastkowska M, Lasoń E, Sikora E, Wolińska-Kennard K. Preparation and Characterization of Water-Based Nano-Perfumes. *Nanomaterials* 2018 Nov; 8 (12): 981.

Mine S, Fortunel NO, Pagoon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: A new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS One* 2008 Dez; 3 (12): e4066.

Ming-Ren T, Chiu GNC. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilization techniques in liposomal manufacturing. *Asia J Pharm Sci* 2013 Abr; 8 (1): 88 - 95.

Mitri K, Shegokar R, Gohla S. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. *Int J Pharm* 2011 Jul; 414 (1): 267 - 75.

Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev* 2002 Nov; 54 (1): 131 - 55.

Muroyama A, Lechler T. Polarity and stratification of the epidermis. *Semin Cell Dev Biol* 2012 Out; 23 (1): 890 - 96.

Naderali E, Khaki AA, Rad JS, Ali-Hemmati A, Rahmati M, Charoudeh HN. Regulation and modulation of PTEN activity. *Mol Biol Rep* 2018 Ago; 45 (6): 2869 - 81.

Nastiti CMRR, Ponto T, Abd E, Grice JE, Benson HAE, Roberts MS. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. *Pharmaceutics* 2017 Dez; 9 (4): 37.

Neubert RHH. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2011 Jan; 77 (1): 1 - 2.

Parekh K. Preparation, Characterization, and *In Vitro* Protein Release Studies in Pharmaceutically relevant Lecithin Microemulsions [dissertação]. Ohio: Universidade de Toledo; 2011.

Philippova OE, Hourdet D, Audebert R, Khokhlov AR. pH-Responsive Gels of Hydrophobically Modified Poly(acrylic acid). *Macromolecules* 1997 Dez; 30 (26): 8278 - 85.

Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol* 2008 Jun; 26 (1): 1261 - 68.

Prista L, Morgado R, Alves AC. Tecnologia Farmacêutica I Volume. 7ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2008.

Resende E. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados contendo ácido ursólico: investigação da atividade citotóxica, antioxidante, antidegradação da matriz celular, toxicidade e permeação cutânea *ex vivo* e *in vivo* [tese de doutoramento]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2013.

Rippa AL, Kalabusheva EP, Vorotelyak EA. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells* 2019 Jun; 8 (6): 607.

Rocha-Filho PA, Maruno M, Oliveira B, Bernardi DS, Gumiero VC, Pereira TA. Nanoemulsions as a vehicle for drugs and cosmetics. *Nanosci Technol* 2014 Jan; 1 (1): 5.

Rod SR, Philip T, Trent D. *Anatomia & Fisiologia*. 8^a ed. Lisboa: Lusociência; 2011.

Roger M, Fullard N, Costello L, Bradbury S, Markiewicz E, O'Reilly S, et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J Anat* 2019 Abr; 234 (4): 438 - 55.

Russell-Jones G, Himes R. Water-in-oil microemulsions for effective transdermal delivery of proteins. *Expert Opin Drug Deliv* 2011 Abr; 8 (4): 537 - 46.

Santos P. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e microemulgeles contendo ibuprofeno [dissertação]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2015.

Schulze E, Witt M, Fink T, Hofer A, Funk RH. Immunohistochemical detection of human skin nerve fibers. *Acta Histochem* 1997 Ago; 99 (1): 301 - 9.

Sharma D, Jaggi AS, Bali A. Clinical evidence and mechanisms of growth factors in idiopathic and diabetes-induced carpal tunnel syndrome. *Eur J Pharmacol* 2018 Out; 837 (1): 156 - 63.

Shinoda K, Lindman B. Organized surfactant systems: microemulsions. *Langmuir* 1987 Mar; 3 (1): 135 - 49.

Silva JA, Santana DP, Bedor DGC, Borba VFC, Lira AAM, Egito EST. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Quim Nova* 2009 Jul; 32 (1): 1389 - 93.

Silver FH, Freeman JW, DeVore D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. *Skin Res Technol* 2001 Fev; 7 (1): 18 - 23.

Singh V, Sharma H, Veerma R, Javed A, Singh M. Topical non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) microemulsions: Rationale, review and future prospective. *Asian J Pharm* 2013 Jan; 7 (1): 1.

Smith MM, Melrose J. Proteoglycans in normal and healing skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015 Mar; 4 (3): 152 - 73.

Sole I, Pey CM, Maestro A, Gonzalez C, Porras M, Solans C, et al. Nanoemulsions prepared by phase inversion composition method: preparation variables and scale up. *J Colloid Interface Sci* 2010 Abr; 344 (1): 417 - 23.

Stahl J, Wohler M, Kietzmann M. The effect of formulation vehicles on the *in vitro* percutaneous permeation of ibuprofen. BMC Pharmacol 2011 Dez; 11 (1): 12.

Steinstrasser I, Merkle HP. Dermal metabolism of topically applied drugs: pathways and models reconsidered. Pharm Acta Helv 1995 Abr; 70 (1): 3 - 24.

Stücker M, Struk A, Altmeyer P, Herde M, Baumgärtl H, Lübberts DW . The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. J Physiol 2002 Fev; 538 (1): 985 - 94.

Syed Azhar SNA, Ashari SE, Salim N. Development of a kojic monooleate-enriched oil-in-water nanoemulsion as a potential carrier for hyperpigmentation treatment. Int J Nanomedicine 2018 Out; 13 (1): 6465 - 79.

Teeranachaideekul V, Souto EB, Junyaprasert VB, Müller RH. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q(10) - development, physicochemical characterization and *in vitro* release studies. Eur J Pharm Biopharm 2007 Ago; 67 (1): 141 - 8.

Tiaka EK, Papanas N, Manolakis AC, Georgiadis GS. Epidermal growth factor in the treatment of diabetic foot ulcers: an update. Perspect Vasc Surg Endovasc Ther 2012 Mar; 24 (1): 37 - 44.

Tichota DM, Silva AC, Sousa Lobo JM, Amaral MH. Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration. Int J Nanomedicine 2014 Ago; 9 (1): 3855 - 64.

Yadav SK, Mishra M, Tiwari A, Shukla A. Emulgel: a new approach for enhanced topical drug delivery. Int J Curr Pharm Res 2017 Dez; 9 (1): 15 - 19.

Ye M, Kim S, Park K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. J Control Release 2010 Set; 146 (1): 241 - 60.

Yousef SA, Mohammed YH, Namjoshi S, Grice JE, Benson HAE, Sakran W, et al. Mechanistic Evaluation of Enhanced Curcumin Delivery through Human Skin *In Vitro* from Optimised Nanoemulsion Formulations Fabricated with Different Penetration Enhancers. Pharmaceutics 2019 Dez; 11 (12): e639.

Yukuyama MN, Ghisleni DD, Pinto TJ, Bou-Chacra NA. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics--a review. Int J Cosmet Sci 2016 Fev; 38 (1): 13 - 24.

Walsh G. Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and Applications. 1^a ed. John Wiley & Sons Ltd: Chichester; 2007.

Watkins J. Skin rashes, part 1: Skin structure and taking a dermatological history. *Nurs Pract* 2013 Set; 24 (1): 30 - 3.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Ver* 2003 Jul; 83 (1): 835 - 70.

Zachar CL. Pharmaceutically Relevant Microemulsions with Potential Topical, Ophthalmic, and Parenteral Applications [dissertação]. Ohio: Universidade de Toledo; 2010.