

INÊS SOFIA MAGALHÃES CALAMOTE

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES
ANTIENVELHECIMENTO CONSTITUÍDAS POR
FITOQUÍMICOS PARA ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA**

Orientadora: Prof^a. Doutora Catarina Pereira Leite

UNIVERSIDADE LÚSOFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIA

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

LISBOA

2022

INÊS SOFIA MAGALHÃES CALAMOTE

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES
ANTIENVELHECIMENTO CONSTITUÍDAS POR
FITOQUÍMICOS PARA ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 11 de janeiro de 2022, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº. 355/2021, de 15 de dezembro de 2021, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof^ª. Doutora Catarina Fialho Rosado

Orientadora:

Prof^ª. Doutora Catarina Pereira Leite

UNIVERSIDADE LÚSOFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIA

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

LISBOA

2022

Agradecimentos

O fim da dissertação marca o fim de um duro, mas bonito percurso de sete anos. Percurso esse que foi muito feliz devido às pessoas que me rodeiam. De uma forma geral, tenho de agradecer a todos o carinho e a motivação que me deram ao longo destes anos. De uma forma individual, quero agradecer àqueles que, de alguma forma, marcaram um bocadinho mais o meu trajeto.

Começando por aquela que foi a base destes meses de trabalho, a Professora Catarina Leite. Agradeço toda a ajuda, a disponibilidade e acima de tudo, a paciência. Agradeço por nunca me ter deixado desmotivar e por me ter mostrado, que num estudo, tudo depende de nós, exceto os resultados que obtemos. O meu mais sincero e profundo obrigado, Professora.

Os meus pais. Uma página de agradecimentos não chegaria. Eles são os meus principais impulsionadores. Obrigada por tornarem este percurso possível, por nunca me deixarem desistir, mesmo nos momentos mais difíceis e por sempre acreditarem em mim e no meu potencial.

Os meus irmãos e sobrinhos. Agradeço toda a preocupação que demonstraram e o apoio e carinho que me deram ao longo destes anos.

A minha pessoa, o André. Agradeço por ser o meu pilar, por me dar a mão em todos os momentos e por me fazer acreditar que já faltava pouco, quando ainda faltava muito.

Os companheiros e amigos, Daniela, Pedro F. e Pedro M. Agradeço à Daniela, pela amizade e companheirismo de anos, por me ouvir sempre e por ter sido a minha fonte de positivismo. Agradeço aos Pedrinhos, pelo apoio desde o primeiro dia, pelas gargalhadas e boa disposição e por todos os momentos partilhados. Sem vocês os três, este percurso não teria sido a mesma coisa.

A amiga Nogal. Agradeço todas as palavras bonitas que me confortaram nos momentos difíceis. Obrigada pela amizade e apoio.

Agradeço a todos os que se cruzaram no meu caminho e que acrescentaram algo a este percurso.

Por fim, agradeço à Universidade Lusófona (COFAC) e ao Instituto Lusófono de Investigação e Desenvolvimento (ILIND) pelo suporte financeiro referente ao projeto *“Exploiting the potential of dehydroabietic acid formulations to tackle skin ageing (DA4SAGE)”* com a referência COFAC/ILIND/CBIOS/2/2020.

Resumo

Atualmente, a crescente preocupação com os cuidados da pele, por forma a prevenir e retardar os efeitos do envelhecimento da pele, fez com que as indústrias farmacêutica e cosmética se dedicassem à investigação de compostos e produtos antienvelhecimento. A procura, por parte dos utilizadores, de produtos inovadores, naturais, eficazes e seguros tem fomentado o estudo de inúmeros fitoquímicos quanto às suas propriedades antienvelhecimento.

O ácido gálico (AG) e o ácido desidroabiético (ADA) são exemplos de fitoquímicos com estas propriedades. No entanto, as suas características físico-químicas condicionam a sua aplicação na pele. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de formulações semissólidas convencionais e nanoformulações para veicular o AG e o ADA para administração cutânea, tendo em vista a otimização da sua eficácia e estabilidade. Para tal, as formulações semissólidas produzidas consistiram num creme do tipo óleo em água (O/A) para incorporar o ADA e num hidrogel para incorporar o AG, de acordo com as suas propriedades lipofílicas e hidrofílicas, respetivamente. Em relação às nanoformulações, foram desenvolvidas nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) para a veiculação de ambos. A caracterização das formulações desenvolvidas consistiu no estudo das características organoléticas, do pH, da viscosidade aparente e, no caso das SLN, também do diâmetro hidrodinâmico (D_h) e do índice de polidispersão (PDI). As formulações semissólidas foram armazenadas a 5, 25 e 40 (± 2) °C, enquanto as SLN foram mantidas à temperatura de 25 (± 2) °C, durante 30 dias.

As formulações semissólidas apresentaram valores de pH e de viscosidade estáveis e compatíveis com a aplicação na pele, ao longo dos 30 dias. Contudo, no hidrogel com AG verificou-se uma alteração de coloração, de amarelo para castanho, que sugere a oxidação do composto. Com a utilização das SLN esta instabilidade não se verificou. Após a produção, as SLN apresentaram valores de D_h (300-400 nm) e de PDI ($<0,2$) favoráveis para a aplicação na pele. Uma vez que os valores destes parâmetros aumentaram durante o armazenamento e o pH e a viscosidade das nanoformulações foram reduzidos, seria favorável otimizar as formulações contendo SLN em trabalhos futuros.

No geral, este trabalho preliminar demonstrou a potencialidade da nanotecnologia para proteção de fitoquímicos da degradação e a possibilidade de veiculação de fitoquímicos em formulações convencionais e formulações contendo SLN.

Palavras-chave: antienvelhecimento, fitoquímicos, ácido gálico, ácido desidroabiético, formulações semissólidas e nanopartículas lipídicas sólidas.

Abstract

Nowadays, the growing concern with skin care, in order to prevent and delay the effects of skin aging, has led the pharmaceutical and cosmetic industries to focus on the investigation of antiaging compounds and products. The users' demand for innovative, natural, efficacious, and safe products has triggered the study of various phytochemicals concerning their antiaging properties.

Gallic acid (GA) and dehydroabietic acid (DAA) are examples of phytochemicals with these properties. However, their physicochemical characteristics affect their application on the skin. In this sense, this work aimed to develop conventional semisolid formulations, as well as nanotechnology-based formulations to load GA and DAA, in order to optimizing their efficacy and stability. For this purpose, regarding conventional formulations, a O/W cream was produced to load DAA, while a hydrogel was produced to load GA, according to their lipophilic and hydrophilic properties, respectively. Moreover, solid lipid nanoparticles (SLN) were developed to load both phytochemicals. All formulations were characterized in terms of organoleptic properties, pH, viscosity, and, in the case of SLN-containing formulations, hydrodynamic diameter (D_h) and polydispersity index (PDI). The semi-solid formulations were stored at 5, 25 and 40 (± 2) °C, while the SLN were kept at 25 (± 2) °C, for 30 days.

The semisolid formulations displayed pH and viscosity values that were stable and compatible with skin applications over the 30 days. However, in the hydrogel with GA there was a color change, from yellow to brown, which suggests the oxidation of the compound. With the use of SLNs, this instability was not observed. After production, SLN showed favorable D_h (300-400 nm) and PDI (<0.2) values for skin applications. Since the values of these parameters increased during storage and the pH and viscosity of the nanoformulations were reduced, it would be favorable to optimize the SLN-containing formulations in future work.

Overall, this preliminary work demonstrated the potential of nanotechnology for protecting phytochemicals from degradation and the possibility of loading phytochemicals in conventional formulations and SLN-containing formulations.

Keywords: antiaging, phytochemicals, gallic acid, dehydroabietic acid, semisolid formulations, and solid lipid nanoparticles.

Abreviaturas

ADA	Ácido Desidroabiético
AG	Ácido Gálico
A/O	Água em Óleo
AP-1	Proteína Ativadora 1
D _h	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	Método de Espectroscopia de Correlação Fotónica
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Etrato Córneo
ERK	Proteína Cinase mediada por Sinais Extracelulares
ERO	Espécies Reativas de Oxigénio
JNK	Cinase Amino-terminal c-Jun
MAPK	Cinase Ativada por Mitógenos p38
MITF	Fator de Transcrição associado à Microftalmia
MMP	Metaloproteínases da Matriz
NF- κ B	Fator κ B de Transcrição Nuclear
NLC	Transportadores Lipídicos Nanoestruturados
O/A	Óleo em Água
PDI	Índice de Polidispersão
Rpm	Rotação/minuto
SA	Substância Ativa
SLN	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
UV	Ultravioleta

Índice Geral

Conteúdo

Capítulo I. Introdução.....	1
1. Pele	2
1.1. Anatomia e Fisiologia da Pele	2
1.1.1. Hipoderme.....	3
1.1.2. Derme.....	3
1.1.3. Epiderme	4
1.1.4. Anexos Cutâneos.....	6
2. Envelhecimento da Pele	8
2.1. Envelhecimento Intrínseco	8
2.2. Envelhecimento Extrínseco	11
3. Substâncias Antienvhecimento	16
3.1. Ácido Gálico	16
3.2. Ácido Desidroabiético.....	18
4. Administração Cutânea.....	20
4.1. Formas Farmacêuticas Semissólidas	22
4.2. Nanopartículas Lipídicas	24
5. Motivações e Objetivos	28
Capítulo II. Materiais e Métodos	30
1. Materiais	31
2. Produção das Formulações Semissólidas	31
2.1. Produção dos Geles.....	31
2.2. Produção dos Cremes.....	32
2.3. Estudo da Estabilidade das Formulações Semissólidas	33
2.3.1. Avaliação das Características Organoléticas	33
2.3.2. Determinação do pH	33
2.3.3. Determinação da Viscosidade	33
3. Produção das Nanoformulações	34
3.1. Produção de Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	34
3.2. Estudo da Estabilidade das Nanoformulações.....	34
3.2.1. Avaliação das Características Organoléticas e Determinação do pH.....	35

3.2.2. Determinação da Viscosidade	35
3.2.3. Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico e do Índice de Polidispersão	35
Capítulo III. Resultados e Discussão	36
1. Formulações Semissólidas	37
1.1. Escolha do Tipo de Formulação	37
1.2. Formulação semissólida para veicular o Ácido Gálico	39
1.2.1. Caracterização da formulação	39
1.2.2. Estudo de Estabilidade	40
1.2.2.1. Características Organoléticas	40
1.2.2.2. pH	42
1.2.2.3. Viscosidade	42
1.3. Formulação semissólida para veicular o Ácido Desidroabiético	44
1.3.1. Caracterização da formulação	44
1.3.2. Estudo de Estabilidade	45
1.3.2.1. Características Organoléticas	45
1.3.2.2. pH	46
1.3.2.3. Viscosidade	47
2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas	49
2.1. Escolha do Tipo de Nanopartículas	49
2.2. Caracterização das Nanopartículas Lipídicas Sólidas	50
2.3. Estudo de Estabilidade	52
2.3.1. Características Organoléticas	52
2.3.2. pH	52
2.3.3. Viscosidade	53
2.3.4. Diâmetro Hidrodinâmico e Índice de Polidispersão	54
Capítulo IV. Conclusão	56
Capítulo V. Referências Bibliográficas	58

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema da estrutura da pele	2
Figura 2 - Esquema dos estratos da epiderme	5
Figura 3 - Fórmula estrutural do ácido gálico	16
Figura 4 - Fórmula estrutural do ácido desidroabiético	18
Figura 5 - Vias de permeação cutânea	20
Figura 6 - Representação esquemática das SLN e dos NLC	27
Figura 7 - Representação gráfica da variação de pH dos geles controlo (A) e com AG (B) em função da duração (dia 0, 3, 7, 14 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento	42
Figura 8 - Representação gráfica da variação da viscosidade dos geles controlo (A) e com AG (B) em função da duração (dia 0, 3, 7, 14 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento	43
Figura 9 - Representação gráfica da variação de pH dos cremes O/A controlo (A) e com ADA (B) em função da duração (dia 0, 3, 7, 14 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento	46
Figura 10 - Representação gráfica da variação da viscosidade dos cremes O/A controlo (A) e com ADA (B) em função da duração (dia 0, 7, 14 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento	47
Figura 11 - Representação gráfica da variação de pH das SLN controlo e com AG ou ADA em função da duração (dia 0, 7, 14 e 30) de armazenamento à temperatura ambiente	52
Figura 12 - Representação gráfica da variação da viscosidade das SLN controlo e com AG ou ADA em função da duração (dia 0, 7, 14 e 30) de armazenamento à temperatura ambiente	53
Figura 13 - Representação gráfica da variação do diâmetro hidrodinâmico (A) e do índice de polidispersão (B) das SLN controlo e com AG ou ADA em função da duração (dia 0, 7, 14 e 30) de armazenamento à temperatura ambiente	54

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Manifestações histológicas do envelhecimento intrínseco.....	10
Tabela 2 - Manifestações clínicas e histológicas do fotoenvelhecimento	14
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas do ácido gálico	17
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas do ácido desidroabiético	19
Tabela 5 - Fatores químicos, físicos e biológicos que influenciam a permeação de substâncias na pele	21
Tabela 6 - Composição qualitativa e quantitativa (%m/v) do gel preparado sem AG (controlo) e com AG.....	31
Tabela 7 - Composição qualitativa e quantitativa (%m/v) do creme O/A preparado sem ADA (controlo) e com ADA.....	32
Tabela 8 - Composição qualitativa e quantitativa (%m/v) das nanopartículas lipídicas sólidas preparadas sem AG ou ADA (controlo) e com AG ou ADA.....	34
Tabela 9 - Características organoléticas, pH e viscosidade dos geles controlo e com AG imediatamente após a produção	39
Tabela 10 - Características organoléticas dos geles controlo e com AG em função da duração (dia 0, 7 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento.....	41
Tabela 11 - Características organoléticas, pH e viscosidade dos cremes O/A controlo e com ADA imediatamente após a preparação	44
Tabela 12 - Características organoléticas dos cremes controlo e com AG em função da duração (dia 0, 7 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento.....	45
Tabela 13 - Características organoléticas, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, pH e viscosidade das SLN desenvolvidas na ausência (controlo) e na presença de AG ou ADA	50

Capítulo I. Introdução

1. Pele

A pele, em conjunto com os compartimentos anexos, isto é, os pelos, as unhas e as glândulas sudoríparas e sebáceas constituem o sistema tegumentar. Este sistema estabelece a fronteira entre o organismo e o meio exterior, permitindo em paralelo a sua interação (Seeley, Stephens, & Tate, 2008).

A pele (Figura 1) corresponde a cerca de 15% do peso corporal sendo, por isso, o maior órgão do corpo humano. Esta é constituída por uma complexa combinação de estruturas com várias funções, tais como, a proteção contra a abrasão, a radiação ultravioleta (UV) e a entrada de microrganismos; a prevenção da desidratação, através da redução da perda de água; a deteção do calor, do frio, do tato, da pressão e da dor; a regulação da temperatura corporal, pelo controlo do fluxo sanguíneo; a produção de vitamina D, pela exposição à radiação UV; e a excreção de pequenas quantidades de substâncias (Kolarsick & Kolarsick, 2011; Seeley et al., 2008).

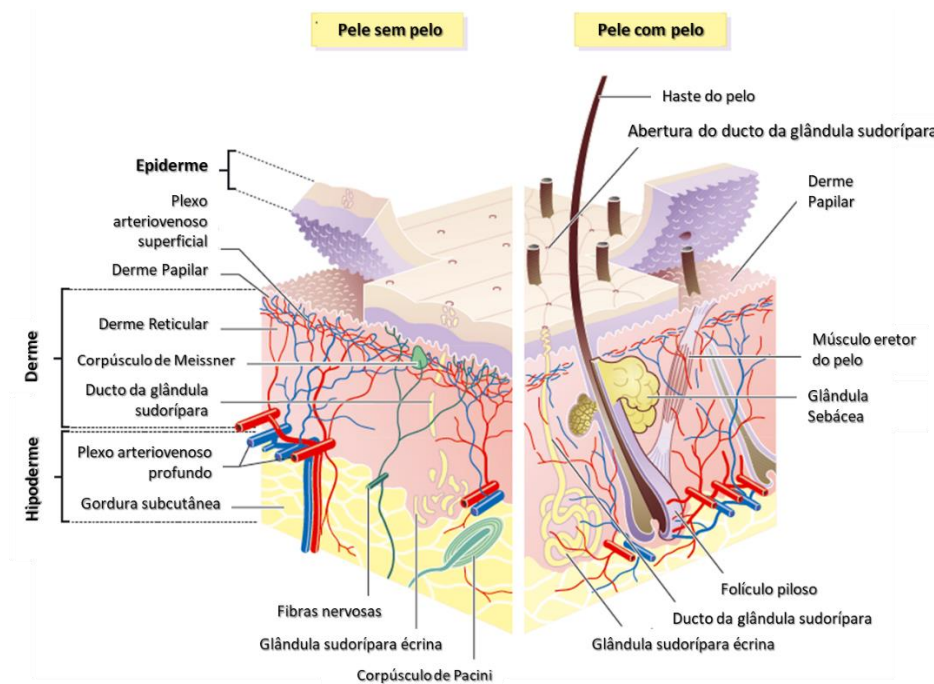


Figura 1 - Esquema da estrutura da pele. Adaptado de (Weller, Savin, Hunter, & Dahl, 2008).

1.1. Anatomia e Fisiologia da Pele

No que diz respeito à sua constituição, a pele encontra-se organizada em 3 camadas: a hipoderme, a derme e a epiderme (Kanitakis, 2002; Kolarsick & Kolarsick, 2011).

1.1.1. Hipoderme

A Hipoderme é a camada mais profunda da pele e está estruturalmente e funcionalmente ligada à derme por intermédio de redes nervosas e vasculares. É composta por tecido conjuntivo laxo, com fibras de colagénio e de elastina, e vários tipos de células como pré-adipócitos, adipócitos, macrófagos, leucócitos e fibroblastos (Avram, Avram, & James, 2005; Graham, Eckersley, Ozols, Mellody, & Sherratt, 2019). A sua espessura varia com a sua localização anatómica, idade, sexo, raça, estado endócrino e nutricional (Haake, Scott, & Holbrook, 2001)

Esta camada é responsável pela termorregulação, isolamento, armazenamento de nutrientes e proteção dos tecidos mais profundos. Mecanicamente, esta camada permite que a pele sobrejacente se mova como um todo, atenuando e dispersando a pressão externa aplicada (Graham et al., 2019; Shen et al., 2003).

1.1.2. Derme

A derme é a camada de tecido conjuntivo que se encontra entre a hipoderme e a epiderme (Losquadro, 2017). Esta é composta essencialmente por matriz extracelular e fibroblastos (Shin et al., 2019). Os fibroblastos são responsáveis pela síntese de colagénio, elastina e outras proteínas que compõem a derme, bem como pela sua degradação. A derme contém vasos linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas (McLafferty, Hendry, & Alistair, 2012).

Está dividida em 2 camadas, a reticular, mais profunda, e a papilar, mais superficial. A camada reticular é composta por tecido conjuntivo denso e contém as fibras de colagénio e elastina, enquanto a camada papilar é composta por papilas e é onde se encontram os nervos e capilares que nutrem a epiderme (Brown & Krishnamurthy, 2020).

O colagénio e a elastina estão dispostos em redes de fibras com elevada resistência e elasticidade, o que confere à camada a capacidade de estiramento e contração (McLafferty et al., 2012). Existem 18 subtipos de colagénio, dos quais 11 estão presentes na pele. O tipo I é o mais abundante, representando 80 a 85% do colagénio total, enquanto o tipo III representa 10 a 15% e o tipo V representa menos de 5% do colagénio total (Losquadro, 2017). Os fibroblastos sintetizam cadeias polipeptídicas individuais de colagénio designadas de pró-colagénio. Posteriormente, as várias moléculas de pró-colagénio ligam-se através de ligações cruzadas catalisadas enzimaticamente, formando a rede dérmica tridimensional (Draeos, 2016).

Em diferentes proporções, a elastina e a fibrilina compõem as fibras elásticas (Ross & Pawlina, 2012). Estas podem ser divididas em 2 tipos: as fibras oxitalâmicas e as fibras

elaúnicas. As fibras oxitalâmicas são constituídas apenas por fibrilina, estão dispostas perpendicularmente e encontram-se na camada papilar, enquanto as fibras elaúnicas são constituídas por uma rede dispersa de elastina rodeada de microfibrilas de fibrilina, estão dispostas paralelamente e encontram-se perto da junção das camadas papilar e reticular (Strydom, Maltha, Kuijpers-jagtman, & Hoff, 2012).

Outros componentes existentes na derme são os proteoglicanos e os glucosaminoglicanos, como é o caso do ácido hialurónico, que além de envolverem e incorporarem os elementos da derme, também mantêm a elasticidade e hidratação da pele, devido à sua capacidade absorvente de água (Brown & Krishnamurthy, 2020; Robert, Robert, & Renard, 2010).

Na transição entre a derme e a epiderme existe uma membrana basal porosa designada de junção dermo-epidérmica (Kanitakis, 2002). Esta membrana desempenha um papel importante no suporte da epiderme, regula as trocas metabólicas entre as duas camadas, suporta a migração dos queratinócitos nos processos de cicatrização e auxilia nos processos imunológicos e inflamatórios, ao permitir a passagem de células como os linfócitos T, os monócitos e as células de *Langerhans* (Monteiro-Riviere, 2010). É constituída maioritariamente, por queratinócitos basais, por fibroblastos dérmicos, em menores quantidades, e por colagénio do tipo VII (Kolarsick & Kolarsick, 2011). A adesão entre as duas camadas é mantida devido à existência de hemidesmosomas (McGrath, Eady, & Pope, 2004).

1.1.3. Epiderme

A epiderme é a camada mais superficial, constituída por epitélio pavimentoso estratificado que se renova continuamente. Não possui vasos sanguíneos, pelo que a oxigenação e a passagem de substâncias é feita por difusão através dos capilares da derme. Na sua maioria, a epiderme é constituída por queratinócitos, responsáveis pela produção de queratina, que confere a esta camada a capacidade de resistir à abrasão e diminuir a perda de água. Em menores quantidades é constituída por outras células, tais como, os melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, que confere pigmentação à pele; as células de *Langerhans*, envolvidas na resposta imunitária; e as células de Merkel, encarregues de detetar o tato e a pressão superficial (McLafferty et al., 2012; Seeley et al., 2008).

Os queratinócitos são produzidos nas camadas mais profundas por mitose. Estes, à medida que novas células se formam, movem-se para as diferentes camadas mais à superfície, sofrendo diferenciação morfológica e bioquímica, o que leva à alteração da sua forma e composição. O processo designa-se por queratinização e termina com a morte

celular na camada mais superficial, originando células anucleadas e achatadas, denominadas de corneócitos (Shetty & Gokul, 2012).

Ao longo da epiderme, à medida que as células se vão diferenciando, é possível distinguir fases de transição diferentes, designadas por camadas ou estratos (Figura 2).

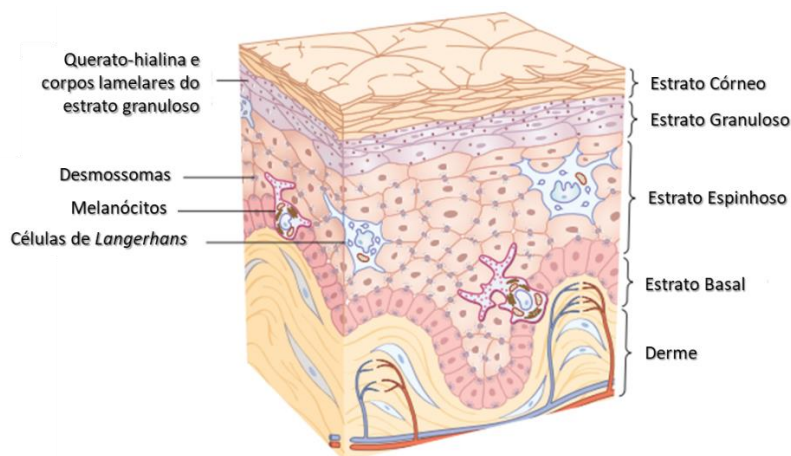


Figura 2 - Esquema dos estratos da epiderme. Adaptado de (Draelos, 2016).

O estrato basal, o mais profundo, assenta sobre a membrana basal, que o fixa à derme. É constituído por células indiferenciadas e proliferativas, em constante divisão mitótica, por hemidesmossomas, que permitem a adesão do estrato à membrana basal, e por desmossomas, que mantêm a união dos queratinócitos (Marks & Miller, 2019; Seeley et al., 2008; Staska & Pike, 2016). Neste estrato, há também um conjunto de recetores transmembranares designados de integrinas. Estes têm um papel importante na adesão, migração, proliferação e diferenciação dos queratinócitos (Hegde & Raghavan, 2013).

Em seguida, surge o estrato espinhoso que é constituído por células poligonais. À medida que estas se movem para a superfície vão ficando achatadas e ocorre quebra e formação de novos desmossomas. No interior dos queratinócitos produzem-se mais fibras de queratina e corpos lamelares, que são organelos ligados à membrana e preenchidos por lípidos e enzimas hidrolíticas (Haake et al., 2001).

O estrato granuloso é constituído por células achatadas, que contêm grânulos proteicos de querato-hialina no seu citoplasma, e por enzimas lisossomais (Kolarsick & Kolarsick, 2011). A querato-hialina é formada por proteínas, como a involucrina e a loricrina, responsáveis pela formação do envelope das células do estrato córneo (EC), e a profilagrina, precursora da filagrina, proteína importante na agregação de queratina no EC (Baroni et al., 2012; Weller et al., 2008).

Ao longo desta camada ocorrem várias alterações, nomeadamente a nível dos corpos lamelares, que libertam o seu conteúdo lipídico para o espaço intercelular e dos queratinócitos. Nestes, o núcleo e outros organelos degeneram, ocorrendo morte celular, a membrana celular é substituída por um envelope celular composto por proteínas e lípidos ligados covalentemente e os filamentos intermediários de queratina agregam-se, formando microfibrilas (Seeley et al., 2008; Wickett & Visscher, 2006).

O estrato lúcido é uma região fina e translúcida, constituída por células mortas com elevadas quantidades de eleidina, uma proteína resultante da transformação da queratohialina, que confere a aparência transparente às células (Biga et al., 2017; A. P. Silva, Silva, & Hernandez-Blazquez, 2008). Esta camada encontra-se presente apenas na pele das palmas das mãos, plantas dos pés e dedos.

O EC é o estrato mais superficial e apresenta-se como a principal barreira contra a perda de água e a penetração de substâncias exógenas (Haake et al., 2001). Este divide-se em 2 substratos, o *disjunctum* e o *compactum*. É constituído por corneócitos, que contêm no seu interior queratina e filagrina, e por uma matriz lipídica intercelular rica em ácidos gordos, ceramidas e colesterol. A ligação entre os corneócitos é possível devido à existência de corneodesmosomas. Existe ainda, uma variedade de enzimas lipolíticas e proteolíticas, envolvidas na degradação dos corneodesmosomas e no processamento dos lípidos (Hwa, Bauer, & Cohen, 2011; Menon, Cleary, & Lane, 2012; Pouillot, Dayan, Polla, Polla, & Polla, 2008; Wickett & Visscher, 2006).

1.1.4. Anexos Cutâneos

Como referido anteriormente, fazem parte dos anexos cutâneos, os pelos, as unhas e as glândulas sebáceas e sudoríparas. Estes desempenham um importante papel no tato, na termorregulação, na transpiração e na excreção (Zhang et al., 2015).

Os folículos pilosos estão distribuídos por todo o corpo, exceto nas palmas das mãos e nas plantas dos pés. Possuem uma bainha radicular externa, que ajuda a proteger o pelo em crescimento, e uma bainha radicular interna. Na base do folículo encontra-se a papila dérmica, rica em vasos sanguíneos e nervos sensoriais, e que contém no seu interior o bolbo capilar, local de origem do pelo em crescimento e onde se insere o músculo eretor do pelo. No interior do folículo, existe uma estrutura importante, designada de protuberância capilar, onde se encontram as células-tronco epiteliais e os melanócitos. Estruturalmente, o pelo encontra-se dividido em 3 camadas: a medula interna, o córtex que envolve a medula e a cutícula externa composta por queratina (Lai-Cheong & McGrath, 2017).

O crescimento do folículo é dinâmico e baseia-se em 3 fases (Gilaberte, Prieto-Torres, Pastushenko, & Juarranz, 2016; Hirt & Paus, 2019):

- Anagénesse – Nesta fase existe um crescimento ativo e constante do pelo. Cerca de 84% dos pelos se encontram nesta fase e pode durar entre 3 e 10 anos;
- Catagénesse – Nesta fase o crescimento do pelo cessa. Ocorre perda de células por apoptose, com paragem da atividade mitótica na matriz e da produção de melanina pelos melanócitos. Dura cerca de 2 a 3 semanas;
- Telogénese – É a fase final, na qual não há produção ativa de pelo. Dura aproximadamente 3 a 4 meses. É seguida por uma nova fase anagénesse.

As unhas consistem em estruturas epiteliais queratinizadas com elevada dureza. Estas protegem as extremidades dos dedos, auxiliam no manuseamento de objetos e aumentam a sensibilidade ao toque. Pertencem ao EC e são compostas por duas partes, a raiz, coberta pela pele, e o corpo da unha, visível. As células ungueais são produzidas na matriz ungueal e estendem-se sobre o leito ungueal. Em relação ao seu crescimento, as unhas crescem continuamente e não têm uma fase de repouso, contrariamente ao que acontece nos pelos (Berker, 2013b, 2013a; Seeley et al., 2008).

As glândulas sebáceas consistem em glândulas alveolares que produzem e secretam uma substância oleosa, de cor branca e rica em lípidos designada de sebo. As glândulas encontram-se unidas por um canal à parte superior dos folículos pilosos, a partir do qual o sebo impregna o pelo e a superfície da pele, protegendo contra microrganismos (Seeley et al., 2008; Staska & Pike, 2016).

As glândulas sudoríparas são estruturas tubulares importantes na regulação da temperatura corporal. Existem 2 tipos de glândulas, as écrinas e as apócrinas (Kobielak, Kandyba, & Leung, 2015; Marks & Miller, 2019). As glândulas écrinas são as mais abundantes, encontram-se distribuídas por toda a superfície corporal, e a sua ativação é desencadeada por estímulos emocionais e térmicos. O suor écrino é uma mistura de água e eletrólitos e a inervação colinérgica é responsável pela sua secreção. As glândulas apócrinas podem ser encontradas em regiões da pele que contenham folículo piloso, como as axilas, as aureolas mamárias e região anogenital. O suor apócrino possui uma composição rica em lípidos e a sua secreção é dependente da estimulação androgénica. Apesar de inodoro, a ação de bactérias na superfície da pele faz com que o suor apócrino seja responsável pelo odor corporal (Kobielak et al., 2015; Marks & Miller, 2019).

2. Envelhecimento da Pele

O envelhecimento é um processo degenerativo complexo, no qual a integridade fisiológica é reduzida gradualmente, levando à perda de quase todas as funções fisiológicas e ao aumento da suscetibilidade do indivíduo (Corrêa et al., 2018). No caso do sistema tegumentar, o envelhecimento envolve a pele e os sistemas de suporte da pele, resultando em mudanças estruturais e bioquímicas na percepção neurosensorial, na permeabilidade, na resposta a lesões e na capacidade de reparação, o que conduz ao aumento da incidência de algumas doenças na pele (M. A. Farage, Miller, Elsner, & Maicach, 2013; Sjerobabski-Masnec & Situm, 2010). Uma consequência do envelhecimento da pele é a perda de funções, uma vez que ocorrem alterações na função barreira do EC e no metabolismo de lípidos, com o consequente declínio da capacidade de retenção de água, da quantidade de secreção de sebo e do fluxo sanguíneo (Yagi & Yonei, 2018).

As mudanças que ocorrem na pele envelhecida são o resultado de fatores intrínsecos, relacionados com fatores genéticos e mudanças fisiológicas que ocorrem ao longo do tempo, e fatores extrínsecos, relacionados com fatores ambientais que aceleram o processo de envelhecimento da pele (Rinnerthaler, Bischof, Streubel, Trost, & Richter, 2015).

2.1. Envelhecimento Intrínseco

O envelhecimento intrínseco afeta todas as áreas da pele e é dependente do tempo. É caracterizado por uma pele sem manchas, lisa, mais seca e menos elástica com rugas finas e linhas de expressão exageradas (Kammeyer & Luiten, 2015; Puizina-Ivié, 2008). As mudanças que ocorrem resultam da acumulação de danos oxidativos, causados pelas espécies reativas de oxigénio (ERO), do encurtamento dos telómeros, das modificações ocorridas em fatores de crescimento e da diminuição da atividade hormonal (Helfrich, Sachs, & Voorhees, 2008; Puizina-Ivié, 2008).

As ERO são moléculas formadas tanto a partir de vias intrínsecas, como extrínsecas. São exemplos de vias intrínsecas a cadeia transportadora de eletrões mitocondrial, as oxidases de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, a xantina oxidoreductase, as várias oxidases peroxissomais, as enzimas do citocromo P450 e as cicloxigenases e lipoxigenases. A radiação UV, os xenobióticos e a poluição ambiental são as principais vias extrínsecas que estimulam a formação de ERO (Naidoo & Birch-Machin, 2017; Rinnerthaler et al., 2015). As ERO mais frequentemente encontradas nas células são o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxilo ($OH^\cdot$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o oxigénio singleto (1O_2) (Ahsanuddin, Lam, & Baron, 2016). As lesões causadas pelas ERO afetam

constituintes celulares, como lípidos, proteínas, enzimas, membranas e o ácido desoxirribonucleico (ADN) (Puizina-Ivié, 2008). A oxidação induzida pelas ERO leva a peroxidação lipídica, que resulta em alterações na fluidez da membrana plasmática e perda de moléculas, com consequente perda de funções. Estas podem também intensificar a atividade da fosfolipase, inativar enzimas, causar a degradação de proteínas e originar mutações devido a modificações, deleções e quebras das cadeias simples ou duplas do ADN (Stojilković, Pavlović, & Arsić, 2014).

Os telómeros são estruturas localizadas nas extremidades dos cromossomas que desempenham um papel importante na proteção do ADN cromossómico, impedindo a sua degradação ou fusão, e no emparelhamento de cromossomas homólogos (Buckingham & Klingelutz, 2011; Ishikawa et al., 2016). À medida que ocorrem divisões celulares, o comprimento dos telómeros vai diminuindo, até se tornarem extremamente curtos, o que leva as células a entrar num processo de senescência celular. As células senescentes perdem a capacidade de divisão e, na pele, as mais afetadas são os queratinócitos, os fibroblastos e os melanócitos (Kosmadaki & Gilchrest, 2004). Estes fatores contribuem para a perda da capacidade replicativa das células e para a deterioração da matriz extracelular.

O envelhecimento intrínseco é ainda influenciado pelas modificações nos fatores de crescimento e pela diminuição da atividade hormonal. As hormonas sexuais com maior impacto no envelhecimento são o estrogénio, a testosterona, a dehidroepiandrosterona e o seu derivado sulfatado (Phillips, Demircay, & Sahu, 2001). Os queratinócitos, as células de *Langerhans*, os melanócitos, as glândulas sebáceas e a síntese de colagénio e de ácido hialurónico são influenciados pela diminuição destas hormonas (Sator, Schmidt, Rabe, & Zouboulis, 2004).

A síntese e a secreção de algumas moléculas envolvidas na sinalização celular, como as citocinas e quimiocinas, diminuem, resultando na deterioração de algumas funções da pele. Na epiderme, a expressão e síntese dos recetores da família da Interleucina-1 diminui, bem como os recetores da vitamina D e os recetores β -adrenérgicos. A nível dos fibroblastos, estes apresentam uma diminuição de recetores para o fator de crescimento, derivado de plaquetas e para o fator de crescimento epidérmico (Gilchrest & Krutmann, 2006; Puizina-Ivié, 2008)

Histologicamente, uma das alterações mais marcantes é o achatamento da junção dermo-epidérmica. Este achatamento leva à diminuição da superfície de contacto entre a epiderme e a derme e, consequentemente, à redução da troca de nutrientes e metabolitos entre as duas camadas. Na tabela 1, encontram-se descritas as restantes modificações histológicas que derivam do envelhecimento intrínseco.

Tabela 1 - Manifestações histológicas do envelhecimento intrínseco. Adaptado de (Ayer & Griffiths, 2019; M. A. Farage et al., 2013; M. A. Farage, Miller, & Maibach, 2010; Gilchrist & Krutmann, 2006; Nigam & Knight, 2017; Puizina-Ivić, 2008; Sjerobabski-Masneć & Situm, 2010; Tobin, 2016).

Epiderme	• Redução da taxa de descamação e aumento do tamanho dos corneócitos • Diminuição dos lípidos intercelulares e da capacidade de retenção de água • Alteração da forma e tamanho dos queratinócitos • Diminuição do número de melanócitos e células de <i>Langerhans</i>
Derme	• Aumento da rigidez e diminuição da elasticidade e da extensibilidade • Diminuição da espessura da derme • Diminuição do número de fibroblastos e mastócitos • Diminuição da quantidade de glucosaminoglicanos, principalmente de ácido hialurónico • Diminuição da síntese de colagénio e de elastina, desorganização dos feixes de colagénio e degradação das fibras de elastina • Diminuição da vascularização e encurtamento da rede de capilares • Diminuição da densidade dos corpúsculos de <i>Pacini</i> e <i>Meissner</i> e perda da inervação sensorial e autónoma
Hipoderme	• Redistribuição, redução do tamanho e perda de função dos adipócitos • Acumulação de lipofuscina nos músculos (pigmento que marca o dano celular e determina a idade avançada da célula)
Anexos cutâneos	• Diminuição dos folículos pilosos • Despigmentação dos pelos e cabelos, por perda e alteração da função de melanócitos (diminuição da atividade da tirosinase) • Conversão de pelo terminal (pelo grosso e longo) em pelo velo (pelo fino e curto) • Diminuição do número de glândulas écrinas e apócrinas e da produção de suor • Diminuição da produção de sebo pelas glândulas sebáceas • Diminuição do crescimento das unhas

2.2. Envelhecimento Extrínseco

O envelhecimento extrínseco não é condicionado pelo decorrer do tempo, como acontece no envelhecimento intrínseco, mas por fatores externos, como a exposição à radiação UV, o tabagismo e a poluição ambiental (S. H. Yu & Baron, 2013). Estima-se que cerca de 80% dos efeitos do envelhecimento extrínseco são causados pela exposição crónica à radiação UV, sendo, por isso, muitas vezes designado de fotoenvelhecimento. Normalmente as zonas mais afetadas pelo envelhecimento extrínseco são as mais expostas, como é o caso do rosto, tórax, braços e mãos (Langton, Sherratt, Griffiths, & Watson, 2010).

O envelhecimento da pele causado pela radiação é um processo cumulativo, que depende do grau de exposição (frequência, duração e intensidade) e da proteção natural obtida através da pigmentação da pele (Sjerobabski-Masnec & Situm, 2010). A exposição à radiação UV inicia um conjunto de respostas moleculares e celulares que resultam em modificações internas (Langton et al., 2010).

A radiação UV subdivide-se em 3 tipos, a radiação UVC, UVB e UVA. A radiação UVC é extremamente nociva, uma vez que contém mais energia que a radiação UVA e UVB. No entanto, esta radiação fica retida na camada de ozono e não atinge a superfície terrestre, pelo que não apresenta risco para a pele (American Cancer Society, 2019). A radiação UVB tem mais energia que UVA e penetra a epiderme, causando queimaduras solares. Esta radiação, ao promover a formação de dímeros de timina e pirimidina, provoca danos diretos no ADN. Danos estes que interferem com a replicação, interrompendo a transcrição e induzindo mutações no gene supressor de tumores p53. Estas mutações tornam as células resistentes à apoptose e alteram o ciclo celular, uma vez que as células entram em mitose sem que ocorram mecanismos de reparação do ADN. O risco de ocorrerem modificações nos queratinócitos e melanócitos aumenta, podendo levar ao desenvolvimento de queratose actínica e, posteriormente, a cancro de pele (Baumann, 2007; Bosch et al., 2015; Mesa-Arango, Flórez-Muñoz, & Sanclemente, 2017). A radiação UVA, apesar de conter menos energia que as restantes, é capaz de penetrar tanto a epiderme como a derme, onde pode causar danos na matriz extracelular e no tecido conjuntivo. É a principal responsável pelo envelhecimento da pele. Esta radiação atua indiretamente, ao estimular a produção de ERO. Estes, por sua vez, afetam a integridade do colagénio, aumentando a sua degradação e diminuindo a sua síntese (S. Silva, Leonardi, & Michniak-kohn, 2017).

A produção de ERO induz as vias de sinalização associadas a cinases intracelulares, como a cinase ativada por mitógenos p38 (MAPK), a cinase amino-terminal c-Jun (JNK) e a

cinase mediada por sinais extracelulares (ERK) (Rinnerthaler et al., 2015). Ao serem ativadas, estas aumentam a expressão e a ativação de fatores de transcrição, como a proteína ativadora 1 (AP-1) e o fator κ B de transcrição nuclear (NF- κ B) (Landau, 2007; Rabe, Mamelak, McElgunn, Morison, & Sauder, 2006; Stout & Birch-Machin, 2019).

A AP-1 inibe o fator de transformação do crescimento β (TGF- β), responsável pela síntese de colagénio, e controla a transcrição dos genes que expressam as metaloproteínases da matriz (MMPs), responsáveis pela degradação da matriz extracelular. De entre as várias MMPs existentes, a MMP-1, a MMP-3 e a MMP-9 são as mais importantes na degradação do colagénio. A MMP-1 é a protéase que inicia a clivagem das fibras de colagénio (tipo I e III). Posteriormente à clivagem, o colagénio é degradado pela MMP-3 e MMP-9. Na pele, os queratinócitos e os fibroblastos são os principais produtores de MMPs. As MMPs são reguladas pelos inibidores teciduais endógenos específicos de metaloproteínases. Contudo, a quantidade destes tende a diminuir com o envelhecimento (Bosch et al., 2015; Shin et al., 2019). Ocorre também a redução de colagénio VII na pele fotoenvelhecida. Deste modo, a radiação UV contribui para a degradação do colagénio da pele e prejudica tanto a integridade da derme, como da junção dermo-epidérmica (Landau, 2007; Rabe et al., 2006).

A ativação do NF- κ B induz a expressão de citocinas inflamatórias, como a interleucina-1 e interleucina-6, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o fator de crescimento epidérmico, que atraem neutrófilos contendo MMP-8, MMP-1 e MMP-9 (Poon, Kang, & Chien, 2015).

Além da degradação do colagénio, a síntese a decorrer também é influenciada. A expressão do gene de pró-colagénio diminui, levando à diminuição da formação de colagénio tipo I na derme papilar. Esta redução da expressão deve-se ao aumento da AP-1 e, conseqüente, diminuição da expressão do TGF- β tipo II (K.-A. Hwang, Yi, & Choi, 2011). A AP-1 é constituída por duas subunidades: a c-Fos, expressa constitutivamente, e a c-Jun, induzida pela radiação UV. A expressão excessiva de c-Jun diminui a produção de colagénio tipo I. Por último, o colagénio danificado, bem como a má adesão dos fibroblastos a este colagénio, desregula a síntese de novo colagénio (Landau, 2007; Rabe et al., 2006).

A acumulação de ERO levam à ativação de moléculas imunossupressoras, como as interleucinas, e à alteração da morfologia celular, da função e da quantidade das células de *Langerhans* e linfócitos T (Mesa-Arango et al., 2017). A imunossupressão resultante pode desencadear o desenvolvimento de carcinomas na pele e de infeções virais, como o aparecimento recorrente de herpes (Bosset et al., 2003).

A exposição à radiação UV tem um impacto negativo na pigmentação da pele, uma vez que desencadeia o aumento da síntese de melanina. A radiação induz a transcrição do gene que expressa a proteína pro-opiomelanocortina e ativa a cascata de transcrição do fator associado à microftalmia (MITF), aumentando a expressão de enzimas envolvidas na melanogénese. Também a ativação de outras vias desencadeadas pelo aumento de interleucinas, $TNF-\alpha$, $TGF-\beta$, fatores de crescimento, derivados endoteliais e fatores de crescimento nervosos contribuem para este aumento e, consequentemente, para as alterações pigmentares. Nas lesões hiperpigmentadas, a libertação de fatores inflamatórios aumenta os níveis de produção e/ou secreção de endotelina-I e do fator de células estaminais. Estes estão envolvidos na ativação de cascatas de sinalização intracelulares específicas que levam os melanócitos a estimularem a produção de tirosinase (D’Orazio, Jarrett, Amaro-Ortiz, & Scott, 2013; Imokawa & Ishida, 2014).

Por último, a radiação UV é responsável por algumas alterações a nível vascular. A angiogénese é estimulada pela regulação positiva do fator de crescimento endotelial, resultado da ativação da via MAPK/ERK, e pela regulação negativa do *thrombospond m-1*, induzida pela ativação da via Fosfoinositídeo 3-cinase/Proteína Cinase B na epiderme (M. Kim & Park, 2016).

Clinicamente, uma pele fotoenvelhecida apresenta rugas acentuadas, menor elasticidade, alterações de pigmentação, secura e flacidez. Histologicamente, a espessura da epiderme aumenta, nomeadamente, a espessura do EC, devido à redução da degradação dos corneodesmosomas. Nos queratinócitos, a diferenciação é afetada pelo aumento da expressão da involucrina e a proliferação e adesão são prejudicadas pela diminuição das integrinas. Na derme e na junção dermo-epidérmica ocorrem várias alterações. A quantidade de fibrilina na camada superior da derme é reduzida, bem como a quantidade de colagénio do tipo VII na junção dermo-epidérmica. Há um aumento significativo de glucosaminoglicanos e proteoglicanos na derme, contudo não são funcionais. Mudanças no conteúdo de colagénio e de elastina também se verificam. Por um lado, há diminuição do conteúdo de colagénio, por outro, há aumento do conteúdo de elastina (M. Kim & Park, 2016; Makrantonaki & Zouboulis, 2011). As principais manifestações clínicas e histológicas do fotoenvelhecimento encontram-se descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Manifestações clínicas e histológicas do fotoenvelhecimento. Adaptado de (Bernardo, 2018; Gilchrest & Krutmann, 2006).

Manifestações Clínicas		Manifestações Histológicas
Queratose Actínica		Atipia nuclear; Perda da diferenciação progressiva e organizada dos queratinócitos; Hiperplasia e/ou hipoplasia irregular da epiderme; Inflamação da derme.
Elastose Solar		Desintegração das fibras elásticas; Acumulação de fibras elásticas amorfas, espessas, enroladas e fragmentadas.
Rugas		Degradação e, consequente, diminuição do colagénio; Aumento de MMPs; Diminuição da quantidade de matriz extracelular; Diminuição da gordura subcutânea.
Alterações de Pigmentação	Eférides (sardas)	Hiperpigmentação da camada basal com melanócitos maiores, fortemente dopa-positivos e com numerosas dendrites.
	Lentigo Solar	Queratinócitos basais e do EC com elevado conteúdo melanossómico; Aumento da melanogénese; Elongação das cristas epiteliais.
	Hipomelanose Guttata	Redução de melanócitos dopa-positivos; Distribuição irregular e morfologia anormal dos melanócitos; atrofia da epiderme.
Pseudocicatrices Estelares		Ausência de pigmentação na epiderme; Colagénio dérmico fragmentado e alterado.
Alterações Vasculares	Telangiectasia	Dilatação dos vasos sanguíneos.
	Púrpura Senil	Diminuição do tecido conjuntivo de suporte aos capilares; Aumento da inflamação perivascular e extravasamento de sangue para a derme.
Hiperplasia Sebácea		Hiperplasia das glândulas sebáceas.

O tabagismo, como referido anteriormente, é também responsável pelo envelhecimento extrínseco. O tabaco é constituído por várias substâncias, sendo uma das principais a nicotina, que é um agonista da acetilcolina. A acetilcolina é um neurotransmissor sintetizado, secretado e degradado nos queratinócitos. Possui dois recetores diferentes, o

nicotínico e o muscarínico, ambos presentes na pele. A nicotina liga-se especificamente ao recetor nicotínico, levando ao aumento da adesão célula a célula e, consequentemente, à inibição da migração dos queratinócitos. A acetilcolina, através dos recetores nicotínicos, também controla as últimas etapas da diferenciação dos queratinócitos na epiderme. Esse efeito é mediado pela expressão de genes e pelo influxo de cálcio, que pode resultar na descamação e renovação da pele. Uma vez que a nicotina estimula o influxo de cálcio, a diferenciação também é comprometida (Rahvar, Maibach, & Maibach, 2013).

O tabaco influencia o conteúdo de colagénio, ao induzir as MMPs. Estas, por sua vez, ativam o recetor de aril hidrocarboneto, um fator de transcrição dependente de ligante que medeia a toxicidade de vários contaminantes. A sua ativação desencadeia vias de sinalização que envolvem a matriz extracelular e culminam na degradação do colagénio (Mesa-Arango et al., 2017; Rahvar et al., 2013). Outras consequências são a vasoconstrição causada pela nicotina e a diminuição do fluxo sanguíneo, que contribui para a redução das trocas de oxigénio e nutrientes nos tecidos cutâneos (M. Farage, Miller, Elsner, & Maibach, 2008). A pele de um fumador é caracterizada por rugas acentuadas, flacidez, perda de elasticidade, pele atópica, contornos faciais mais salientes, principalmente na zona da boca, e tez levemente laranja ou vermelha (Rahvar et al., 2013).

A poluição ambiental é outro dos fatores apontados para o envelhecimento extrínseco. A pele, como barreira externa, está em contacto direto com diversos poluentes do ar. Os efeitos descritos, que decorrem da exposição aos poluentes, incluem alterações de pigmentação, como lentigos, e a formação de rugas. As alterações de pigmentação parecem estar associadas às partículas transportadas pelo ar. Os efeitos causados por estas partículas devem-se principalmente à produção de ERO. Além disso, estas podem transportar produtos químicos orgânicos e metais capazes de atingir a mitocôndria e produzir ERO diretamente, levando ao envelhecimento da pele por danos mitocondriais. O aumento do ozono junto ao solo pode ser responsável pela formação de rugas. Alguns estudos desenvolvidos em ratos demonstraram que este gás atua como um agente oxidante, capaz de induzir a expressão da MMP-9 e afetar o metabolismo do colagénio. Outra via de indução é através dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que são transportados pelas partículas e ativam o recetor de aril hidrocarboneto (Krutmann, Schikowski, Morita, & Berneburg, 2021; Vierkötter & Krutmann, 2012).

3. Substâncias Antienvelhecimento

Atualmente é cada vez maior a preocupação em minimizar os sinais da idade na pele, principalmente no rosto. A finalidade dos produtos antienvelhecimento centra-se na obtenção de uma pele saudável, lisa e sem manchas. Para tal, recorre-se à utilização de substâncias capazes de reverter os sinais dérmicos e epidérmicos associados tanto ao envelhecimento intrínseco, como extrínseco (Ganceviciene, Liakou, Theodoridis, Makrantonaki, & Zouboulis, 2012). Estas substâncias podem ser organizadas de acordo com a sua atuação na pele, nomeadamente (Lorencini, Brohem, Dieamant, Zanchin, & Maibach, 2014; Puizina-Ivić, Mirić, Čarija, Karlica, & Marasović, 2010):

- Compostos que atuam na proliferação e diferenciação dos queratinócitos, auxiliando na proteção contra as agressões mecânicas e químicas;
- Compostos que atuam na manutenção da hidratação cutânea, através do equilíbrio de água e iões;
- Compostos que atuam ao nível da matriz extracelular dérmica;
- Compostos que atuam como antioxidantes, melhorando a proteção contra a radiação UV e a atividade antioxidante da pele;
- Compostos que atuam nas alterações de pigmentação.

Tendo em conta o âmbito desta dissertação, importa referir mais pormenorizadamente duas substâncias com propriedades antienvelhecimento, nomeadamente o ácido gálico (AG) e o ácido desidroabiético (ADA).

3.1. Ácido Gálico

O AG (Figura 3) é um composto fenólico, que pode ser encontrado na forma livre ou na forma de galotanino, como constituinte dos taninos (Fitzpatrick & Woldemariam, 2017). O AG e os seus derivados estão presentes em vários extratos de plantas como *Camellia sinensis* L., *Arctostaphylos uva-ursi* L., *Corylus avellana*, *Oenothera biennis* e *Vitis vinifera* L., e encontram-se distribuídos pelas diferentes partes da planta como a casca, a folha, o fruto, a raiz e as sementes (Fitzpatrick & Woldemariam, 2017; Zanwar, Badole, Shende, Hegde, & Bodhankar, 2014).

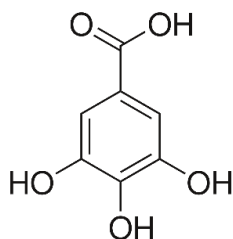


Figura 3 - Fórmula estrutural do ácido gálico. Adaptado de (Dogan, 2008).

A molécula de AG contém um anel aromático, ao qual estão ligados três grupos hidroxilo e um grupo carboxilo (Badhani, Sharma, & Kakkar, 2015; Goldberg & Stefan Rokem, 2019). Na tabela 3 estão apresentadas algumas propriedades físico-químicas do AG.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas do ácido gálico. Adaptado de (National Center for Biotechnology Information, 2004; Royal Society of Chemistry, 2021; The Human Metabolome Database, 2007).

Propriedades físico-químicas	
Fórmula química	C ₇ H ₆ O ₅
Peso Molecular	170,12 g/mol
Densidade	1,69 g/cm ³
Solubilidade em água	1,19x10 ⁴ mg/L (20 °C)
Constante de Ionização (pKa)	4,40
Coefficiente de Partição (logP)	0,70-0,96
Ponto de Fusão	258-265 °C

O AG tem demonstrado inúmeras atividades farmacológicas, como anti-inflamatório, antimicrobiano, anti-histamínico e anticancerígeno (Kashif, Akhtar, & Mustafa, 2017; Rosas, Correa, & Graças Henriques, 2019). Vários estudos indicam que o seu poder antioxidante fornece uma proteção eficaz contra os danos oxidativos provocados por ERO, permitindo retardar ou até evitar o envelhecimento mediado por estas (Badhani et al., 2015; Rahimifard et al., 2020).

Em relação à sua ação na pele, Alonso et al. (2016) concluíram que o AG inibe a peroxidação lipídica no EC causada pela radiação UV, comprovando a sua ação antioxidante (Alonso et al., 2016). Hwang et al. (2014) estudaram os seus efeitos protetores contra o fotoenvelhecimento e constataram que a produção de ERO e os níveis de interleucina-6 e MMP-1 diminuíram, enquanto, a expressão de pró-colagénio tipo I aumentou. A atividade da AP-1 foi também inibida. Assim, o AG diminuiu a espessura e a secura da pele, bem como a formação de rugas, devido à inibição da secreção de MMP-1 e ao aumento dos níveis de elastina, pró-colagénio tipo I e TGF- β (E. Hwang et al., 2014). O AG demonstrou também resultados positivos no tratamento das alterações de pigmentação

na pele (Kashif et al., 2017). Kumar et al. (2012) observaram que diminui a expressão de genes reguladores da melanogénese como a tirosinase, a proteína relacionada à tirosinase e o dopacromo tautomerase, tanto a nível da transcrição, como da tradução. Mais ainda, inibe a expressão do MITF ao regular a cascata de sinalização da proteína cinase *A/cAMP response element-binding protein* mediada pela adenosina 3',5'-monofosfato cíclico. O AG ao fosforilar a Proteína Cinase B e a ERK, ativa-as, induzindo a degradação proteossomal do MITF, que é essencial para a diferenciação e desenvolvimento dos melanócitos e responsável pela transcrição específica dos genes que expressam as enzimas envolvidas na melanogénese (Kumar et al., 2013; Shibahara, 2001).

3.2. Ácido Desidroabiético

O ADA (Figura 4) é um ácido resínico do tipo abiético (Rebola, 2015). Pode encontrar-se na colofónia, um produto resultante da destilação da resina de plantas como *Pinus*, *Picea*, *Larix* e *Abies* (E. Kim et al., 2019; Rahimifard et al., 2020).

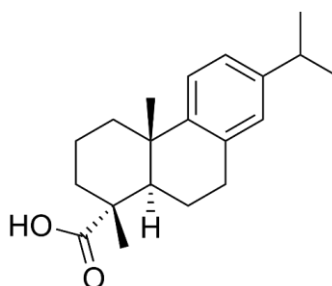


Figura 4 - Fórmula estrutural do ácido desidroabiético. Adaptado de (Mitani, Fujioka, Uchida, & Kataoka, 2007).

A molécula de ADA consiste numa estrutura tricíclica, composta por um anel aromático, à qual se encontram ligados, em diferentes posições, um grupo carboxilo, dois grupos metilo e um grupo isopropilo (Rebola, 2015). A pH inferiores ao pKa estimado, o ADA encontra-se na forma não ionizada (COOH), com solubilidade aquosa reduzida (Luong, Rigby, Male, & Bouvrette, 1999). Na tabela 4 é possível observar algumas características físico-químicas do ADA.

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas do ácido desidroabiético. Adaptado de (Kamaya, Tokita, & Suzuki, 2005; National Center for Biotechnology Information, 2005; Peng & Roberts, 2000; U.S. Environmental Protection Agency, 2021).

Propriedades físico-químicas	
Fórmula química	C ₂₀ H ₂₈ O ₂
Peso Molecular	300,4 g/mol
Densidade	1,06 g/cm ³
Solubilidade em água	5,11 mg/L (20 °C)
Constante de Ionização (pKa)	5,7-7,25
Coefficiente de Partição (logP)	4,80-6,52
Ponto de Fusão	159-171 °C

O ADA possui uma variedade de atividades farmacológicas, nomeadamente antiulcerosas, antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias e anticancerígenas (Huang et al., 2020). Melhora a diabetes e as dislipidemias, ao estimular a captação de glicose dependente de insulina nos adipócitos e ao ativar o recetor dos proliferadores de peroxissoma tipo gama. Também atua como modulador químico abrindo os canais de potássio ativados por cálcio de elevada condutância, possibilitando o tratamento de acidentes vasculares cerebrais agudos, epilepsia, asma, hipertensão, hipermotilidade gástrica e psicoses (J. Kim et al., 2015).

Relativamente às suas propriedades antienvhecimento, Park et al. (2019) observaram que o ADA diminuiu a secreção de MMP-1, através da inibição da via de sinalização JNK, que resultou no aumento dos níveis de pró-colagénio tipo I nos fibroblastos. Também a quantidade, o diâmetro e a disposição das fibras de colagénio na derme melhoraram significativamente (Park et al., 2019). J. Kim et al. (2015) constataram que os efeitos causados por este composto, como a diminuição da acumulação do pigmento lipofuscina e a diminuição da secreção de colagénio nos fibroblastos da derme, são mediados pela ativação da proteína *Sirtuin 1*, essencial no atraso do envelhecimento das células (Corrêa et al., 2018; J. Kim et al., 2015; Lee, Lee, Lee, & Min, 2019). Além disso, Wang et al. (2014) demonstraram que o ADA é capaz de reverter diversas respostas celulares estimuladas pelo TNF- α , como a apoptose induzida dos fibroblastos dérmicos, através da inativação da proteína *forkhead box O1* (Wang, Yu, & Gu, 2014).

4. Administração Cutânea

A administração de fármacos através da pele oferece vantagens em relação a outras vias de administração, como a oral, uma vez que evita o efeito de primeira passagem e a degradação das substâncias ativas (SA) no trato gastrointestinal (Vianna, Silva, & Hamerski, 2010). Adicionalmente, esta via permite a utilização de fármacos com janelas terapêuticas estreitas e tempos de semivida curtos, uma vez que possibilita a manutenção e controlo das concentrações plasmáticas, diminuindo a probabilidade de existirem efeitos adversos sistémicos. A adesão por parte dos utilizadores também pode ser maior, pela facilidade de aplicação (D. Singh, Mital, & Kaur, 2016).

No entanto, para que a administração cutânea seja bem-sucedida é importante contornar as suas limitações. Estas são a baixa permeabilidade causada pelo EC, que pode resultar em níveis subterapêuticos; a possibilidade de irritação local ou reações alérgicas e a intra e intervariabilidade existente na permeação cutânea entre diferentes indivíduos, que leva a diferentes repostas biológicas (Madhusudhan, Gowda, & Gupta, 2020).

Para que as formulações tenham sucesso terapêutico quando aplicadas na pele, estas devem permitir a distribuição do fármaco desde o EC (lipofílico) até à circulação sistémica, passando pela epiderme viável e pela derme, por difusão passiva (Walters, 2002; Zsikó et al., 2019). A difusão pelo EC pode ser feita através da via transepidérmica ou da via anexial (Figura 5) (Hwa et al., 2011; Ng & Lau, 2015; Trommer & Neubert, 2006).

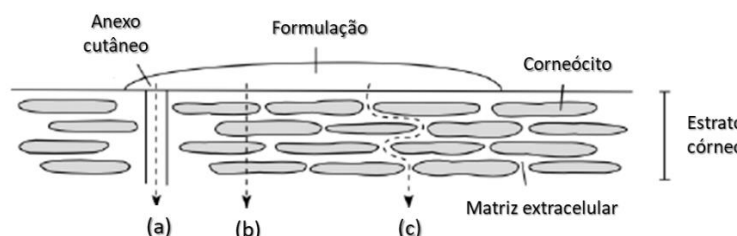


Figura 5 - Vias de permeação cutânea. (a): Via anexial; (b): Via transcelular; (c): Via intercelular. Adaptado de (Ng & Lau, 2015).

A via transepidérmica pode ser dividida nas vias transcelular (preferencial para substâncias polares e hidrofílicas) e intercelular (preferencial para substâncias lipofílicas) (Ng & Lau, 2015; Supe & Takudage, 2021). A via transcelular é a mais direta, uma vez que as substâncias atravessam diretamente os corneócitos e a matriz extracelular. Contudo, apesar de ser o caminho mais curto, as substâncias podem encontrar resistência à permeação. A via intercelular é a que ocorre mais frequentemente e consiste na passagem das substâncias pela matriz extracelular, contornando os corneócitos (Benson, 2012; Hwa et al., 2011; Supe & Takudage, 2021).

A via anexial consiste na passagem de substâncias pelos diferentes anexos cutâneos, ou seja, através do folículo piloso, das glândulas sebáceas e das sudoríparas. Esta via é mais utilizada para substâncias com elevado peso molecular (N'Da, 2014). Acreditava-se que esta via era pouco importante, visto que os anexos representam apenas 0,1% da superfície total da pele. Contudo, estudos recentes demonstraram que os folículos pilosos podem ter um papel importante na permeação de fármacos (Helfrich et al., 2008; Hwa et al., 2011; Uchechi, Ogbonna, & Attama, 2014).

Na administração cutânea, são vários os fatores que podem afetar a absorção das SA e, por consequência, a sua biodisponibilidade (Tabela 5). Estes podem estar relacionados com fatores biológicos, ou seja, características fisiológicas do indivíduo e da pele, e com fatores químicos e físicos, como, as propriedades físico-químicas da SA ou da forma farmacêutica utilizada para veicular a mesma (J. A. Silva, Apolinário, Souza, Damasceno, & Medeiros, 2010).

Tabela 5 - Fatores químicos, físicos e biológicos que influenciam a permeação de substâncias na pele. Adaptado de (Pouillot et al., 2008).

Fatores Químicos e Físicos	Fatores Biológicos
Peso molecular	Idade
Concentração	Anatomia e Histologia da Pele
Coeficiente de Partição	Metabolismo da Pele
Variações de pH	Condições Fisiopatológicas da Pele
Solventes	Hidratação da Pele
Temperatura	Interações Substância-Pele

De modo a contornar ou modular as limitações inerentes à administração cutânea e aumentar a absorção das SA ao longo das camadas da pele, têm vindo a ser desenvolvidas diversas estratégias. Estas podem consistir em abordagens físicas, entre as quais, a iontoforese ou a eletroporação e em abordagens químicas, com a utilização de promotores de permeação como álcoois, agentes tensioativos, ou de pró-fármacos. Outras abordagens como a sobressaturação da SA e a utilização de nano e microformulações também têm vindo a ser consideradas (Bharkatiya & Nema, 2009).

4.1. Formas Farmacêuticas Semissólidas

As formulações cutâneas têm como objetivo principal fornecer concentrações terapêuticas eficazes de SA nas diferentes camadas da pele (Nair, Jacob, Al-Dhubiab, Attimarad, & Harsha, 2013). Estas formulações podem ser classificadas em: formulações sólidas, semissólidas e líquidas. Dentro da categoria das formulações sólidas estão os pós cutâneos e das formulações líquidas estão as loções e os linimentos. No entanto, as formulações semissólidas são as mais utilizadas (Garg, Rath, & Goyal, 2015).

As formas farmacêuticas semissólidas apresentam um aspeto homogéneo e consistência mole. São dotadas de propriedades plásticas que permitem a modificação da sua forma quando aplicada uma força mecânica mínima, adaptando-se à superfície da pele e, devido ao seu comportamento tixotrópico, quando a força cessa, a sua consistência é recuperada para valores próximos dos normais. Estas também apresentam um comportamento termorreversível, uma vez que a viscosidade tende a diminuir com o aumento da temperatura. Por estas razões, é importante que estas formulações possuam uma determinada adesividade que as mantenha fixas no local de aplicação (Alves, Ramos, & Prista, 1990).

A aplicação de formulações semissólidas contendo SA pode ter diferentes locais de ação na pele. Se o pretendido for a administração da SA à superfície da pele, trata-se de uma formulação epidérmica. Se a formulação for projetada para que a SA alcance as camadas mais profundas da pele, como a epiderme viável e a derme, é endodérmica. Por último, se o objetivo for a SA chegar à circulação sistémica, a formulação é diadérmica (Trommer & Neubert, 2006).

Além da classificação quanto à ação terapêutica, as formas farmacêuticas semissólidas podem ser classificadas de acordo com os excipientes utilizados em: pomadas propriamente ditas, pastas, cremes e geles. As bases utilizadas nestas podem ser hidrófobas, absorventes, hidrossolúveis e miscíveis em óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (Ueda et al., 2009; Weiss, 2011). A escolha da base depende de vários fatores, como a ação desejada, a natureza, a estabilidade e a biodisponibilidade da SA a incorporar (Ueda et al., 2009).

As pomadas propriamente ditas possuem uma ação protetora ou emoliente da pele, onde um determinado grau de oclusão é desejado, para evitar a perda transepidérmica da água e aumentar a retenção da mesma à superfície da pele (Babu, Vital, Nirupama, Devi, & Devi, 2017; Bora, Deshmukh, & Swain, 2014; Weiss, 2011). Podem apresentar uma aparência opaca ou translúcida, elevada viscosidade e textura bastante oleosa.

Normalmente, contêm menos de 20% de água e mais de 50% de hidrocarbonetos, ceras ou polietilenoglicol (Mayba & Gooderham, 2018; Ueda et al., 2009).

As pastas conferem uma ação protetora antissética à pele (Babu et al., 2017). São formulações que contêm uma elevada quantidade (normalmente 50%) de substâncias pulverulentas dispersas numa base adequada (Ueda et al., 2009). Comparativamente com as pomadas, as pastas são menos oleosas, mais absorventes e mais consistentes (Bora et al., 2014; Garg et al., 2015).

Os cremes têm propriedades humectantes e emolientes, sendo utilizados, por norma, quando não é necessário um efeito oclusivo (Mayba & Gooderham, 2018; Weiss, 2011). São emulsões compostas por duas fases distintas, uma fase interna ou dispersa e uma fase externa ou dispersante. Consoante a lipofilia ou hidrofilia da fase externa, estes sistemas podem ser classificados O/A ou A/O (Prista, Alves, Morgado, & Lobo, 2003). A SA é dispersa entre as diferentes fases de acordo com o seu coeficiente de partição (Mayba & Gooderham, 2018). Normalmente, contêm bases solúveis em água. Em comparação com as pomadas, os cremes são significativamente menos oleosos, menos viscosos e mais fáceis de espalhar na pele (Garg et al., 2015). Devido à sua textura e espalhabilidade, estes são preferidos pelos utilizadores. Contudo, têm menor poder hidratante por não exercerem um efeito oclusivo (Mayba & Gooderham, 2018).

Os geles podem apresentar propriedades emolientes e refrescantes. Estes são desenvolvidos a partir da adição de grandes quantidades de líquidos, como água, álcool ou propilenoglicol a uma rede de partículas sólidas coloidais, que podem ser polímeros orgânicos de origem natural ou sintética (Babu et al., 2017; Weiss, 2011). Como estes polímeros são responsáveis pela gelificação da formulação, normalmente designam-se de agentes gelificantes (Bhowmik, Gopinath, Kumar, Duraivel, & Kumar, 2012; Mayba & Gooderham, 2018). A maioria dos geles são preparados com carbómeros, um tipo de polímero orgânico, que conferem uma aparência esteticamente agradável e são facilmente removidos da pele com água. Estas características, bem como a facilidade de aplicação, são vantagens que contribuem para a sua utilização. Dependendo da natureza dos seus constituintes, a aparência dos geles pode variar de transparente a opaco (Bhowmik et al., 2012; Gad, 2008).

Os geles podem ser classificados em oleogeles ou hidrogeles. Nos oleogeles os excipientes são gordurosos e consistem em parafina líquida e óleos diversos. A gelificação ocorre através da adição de polietileno, anidrido silícico, sabões de alumínio ou de zinco, entre outros. Nos hidrogeles são utilizados excipientes como a água, a glicerina e o propilenoglicol. Neste caso, a gelificação ocorre por intermédio de substâncias como gomas,

amido, derivados de celulose, silicatos de alumínio e magnésio, pectina, alginatos, carbopols®, álcool polivinílico, entre outros (Alves et al., 1990; Bora et al., 2014; Gad, 2008).

Os excipientes utilizados são de extrema importância, uma vez que podem afetar a absorção e, conseqüentemente, a ação da SA incorporada. Estes desempenham diferentes funções que, por sua vez, determinam o tipo, a estrutura e a estabilidade da base semissólida. Devem obedecer aos padrões de qualidade impostos e ser inertes. Não devem causar irritação, sensibilização ou perturbação irreversível no EC, como tal, quaisquer possíveis interações fisiológicas devem ser bem estabelecidas. Os excipientes mais utilizados incluem solventes, agentes viscosificantes, agentes emulsivos, promotores da permeação, conservantes, entre outros (Schwinn & Jackson, 2020).

São vários os ensaios de controlo de qualidade que podem ser realizados nas formulações semissólidas, nomeadamente, nos geles e nos cremes. Estes podem incluir a avaliação das características organolépticas (aspeto, cor e odor) e a determinação do pH, da consistência (dureza, espalhabilidade, plasticidade, viscosidade), do poder de absorção de água, da tensão interfacial, da facilidade de cedência medicamentosa, entre outros (Alves et al., 1990).

4.2. Nanopartículas Lipídicas

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica tem procurado alternativas para contornar algumas limitações que as formas farmacêuticas convencionais apresentam, tais como: elevadas dosagens, reduzida biodisponibilidade, efeito de primeira passagem, intolerâncias, instabilidades e variações dos níveis plasmáticos de SA (Mudshinge, Deore, Patil, & Bhalgat, 2011). Uma das alternativas encontradas foi a utilização da nanotecnologia para o desenvolvimento de sistemas com características que permitissem controlar e melhorar a libertação de fármacos. A pele é um exemplo onde o recurso a sistemas nanoparticulados apresenta bons resultados. Nesta, as principais vantagens da utilização de nanopartículas incluem o aumento da estabilidade dos compostos, a diminuição da dosagem necessária para exercer a ação pretendida, a melhoria do direcionamento da SA para o local de ação e a libertação controlada de SA para a obtenção de um efeito prolongado (Lohani, Verma, Joshi, Yadav, & Karki, 2018; A. C. Santos et al., 2019).

Na pele, os sistemas mais utilizados são os lipídicos, uma vez que a existência da base lipídica facilita a entrada das nanopartículas e a libertação da SA (Deltreggia et al., 2019). As nanopartículas lipídicas são um exemplo deste tipo de sistemas e podem dividir-se em nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e em transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC). Foram desenvolvidos como alternativa a outros sistemas coloidais (lipossomas, nanoemulsões, etc), por apresentarem inúmeras vantagens, como por

exemplo: natureza biocompatível e biodegradável dos materiais; versatilidade; baixo custo e facilidade de produção a nível industrial; baixo potencial de toxicidade; aumento da estabilidade química de SA; possibilidade de libertação controlada e modificada da SA; aumento da solubilidade da SA; e boa estabilidade durante o armazenamento (Ghasemiyeh & Mohammadi-Samani, 2018; Guimarães & Ré, 2011; Pardeike, Hommoss, & Müller, 2009; D. K. Patel, Tripathy, Nair, & Kesharwani, 2013).

As nanopartículas lipídicas são dispersões aquosas coloidais, com tamanhos que podem variar de 40 a 1000 nm (A. Silva, Amaral, Lobo, & Lopes, 2015). Apresentam uma estrutura semelhante a nanoemulsões O/A, contudo, distinguem-se destas pela natureza lipídica. Os lípidos líquidos utilizados nas nanoemulsões são substituídos por lípidos sólidos à temperatura ambiente e corporal (Guimarães & Ré, 2011; A. Silva et al., 2015; Uchechi et al., 2014). Esta substituição permite obter uma libertação controlada da SA, uma vez que a mobilidade desta é menor numa matriz sólida (Mehnert & Mader, 2001). À matriz lipídica podem ser adicionados agentes tensioativos ou polímeros que evitam a agregação das partículas lipídicas (Guimarães & Ré, 2011). A possibilidade de variar o tamanho e de modificar a polaridade da superfície destas nanopartículas permite melhorar a penetração na pele (Uchechi et al., 2014).

As SLN (Figura 6) foram a primeira geração de nanopartículas lipídicas a ser desenvolvida. A sua matriz apresenta uma estrutura cristalina perfeita, constituída por lípidos sólidos, em percentagens compreendidas entre 0,1% a 30% (m/m), dispersos em meio aquoso e revestida por agentes tensioativos, em percentagens compreendidas entre 0,5% a 5% (m/m), que proporcionam a estabilidade do sistema (Fireman, Toledano, Neimann, Loboda, & Dayan, 2011; Pardeike et al., 2009). Se a percentagem de lípidos sólidos ultrapassar os 30% pode ocorrer a formação de um creme (Müller, Radtke, & Wissing, 2002).

Existem três modelos diferentes para a incorporação de SA nas SLN: (1) Modelo da matriz homogénea, obtida quando se aplica o método de homogeneização a frio ou quando SA altamente lipofílicas são incorporadas às SLN através do método de homogeneização a quente; (2) Modelo “parede de fármaco”, no qual se forma uma parede externa rica em SA, devido à separação de fases durante o processo de arrefecimento; e (3) Modelo “núcleo de fármaco”, no qual, também devido à separação de fases, se forma uma camada interna rica em SA, que favorece a libertação controlada da SA. O tipo de estrutura obtida depende dos componentes da formulação e do método de produção adotado (Müller et al., 2002; Naseri, Valizadeh, & Zakeri-Milani, 2015; Eliana B. Souto & Müller, 2007; Ved & Shrotriya, 2014).

Apesar das vantagens mencionadas em relação às nanopartículas lipídicas, as SLN apresentam algumas limitações, tais como: capacidade limitada de encapsular SA; presença de elevadas quantidades de água, que podem evaporar ao longo do tempo e resultar no aumento da consistência da formulação; libertação inicial da SA rápida; possibilidade de expulsão da SA do interior das SLN durante o armazenamento, devido a alterações polimórficas na estrutura cristalina dos lípidos; e problemas de estabilidade por agregação das nanopartículas (Ghasemiyeh & Mohammadi-Samani, 2018; S. Gupta, Kesarla, & Omri, 2013; Nikam, Chavan, & Sharma, 2014).

Para ultrapassar estas limitações foi desenvolvida uma segunda geração de nanopartículas lipídicas, os NLC (Figura 6). Estes diferem das SLN, pelo facto da sua matriz apresentar uma estrutura cristalina com imperfeições e ser constituída por uma mistura de um lípido líquido com um lípido sólido, estabilizada pela presença de um agente tensioativo (Fang, A. Al-Suwayeh, & Fang, 2012). A mistura do lípido sólido com o lípido líquido deve ser obtida em proporções de 70:30 até 99,9:0,1 (Beloqui, Solinís, Rodríguez-Gascón, Almeida, & Préat, 2016; Pardeike et al., 2009). A presença do lípido líquido faz com que a matriz resultante apresente um ponto de fusão menor em comparação ao lípido sólido puro, contudo esta permanece sólida tanto à temperatura ambiente como corporal (Ghasemiyeh & Mohammadi-Samani, 2018; Guimarães & Ré, 2011; Naseri et al., 2015).

Como referido, este tipo de nanopartículas lipídicas surgiu para melhorar alguns aspetos relacionados com as SLN. A mistura de um lípido líquido com um sólido origina uma matriz lipídica desorganizada, que melhora a eficiência de encapsulação de SA. O risco de expulsão da SA durante a produção e armazenamento é minimizado e o teor de água presente é menor. Estes apresentam ainda perfis de libertação mais controláveis (Müller, Petersen, Hommoss, & Pardeike, 2007; Tamjidi, Shahedi, Varshosaz, & Nasirpour, 2013).

Existem três modelos diferentes de NLC, tendo em consideração a estrutura interna da sua matriz lipídica: (1) Modelo de cristal imperfeito, no qual a matriz possui uma série de imperfeições, resultante da mistura de um lípido sólido com uma pequena quantidade de lípido líquido. Este modelo permite encapsular uma maior quantidade de SA; (2) Modelo amorfo, no qual se forma uma matriz amorfa constituída por lípidos que não sofreram um processo de recristalização. Este modelo minimiza a expulsão das moléculas ao longo do armazenamento; (3) Modelo múltiplo, no qual a matriz formada consiste numa emulsão do tipo óleo em lípido sólido em água. Este modelo melhora a capacidade de encapsulação de SA, cuja solubilidade seja maior no lípido líquido que no lípido sólido (Haider, Abidin, Kamal, & Orive, 2020; Khosa, Reddi, & Saha, 2018; Eliana B. Souto & Müller, 2007; Surya Tej et al., 2016).

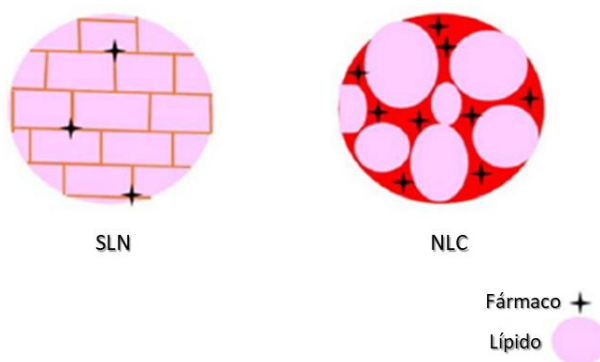


Figura 6 - Representação esquemática das SLN e dos NLC. Adaptado de (Ghasemiyeh & Mohammadi-Samani, 2018).

Ao desenvolver nanopartículas lipídicas, o objetivo principal é obter nanoformulações com qualidade, eficácia e segurança, que superem as propriedades das formulações cutâneas convencionais. Deste modo, após a sua produção, alguns parâmetros da formulação devem ser estudados uma vez que podem ter um impacto direto no seu desempenho. Alguns dos parâmetros a caracterizar são: tamanho e distribuição do tamanho das partículas, potencial zeta, grau de cristalização e polimorfismos, eficiência de encapsulação, comportamento durante a permeação cutânea e tempo de retenção na pele, viscosidade e pH (Andonova & Peneva, 2017; G. Kakadia & R. Conway, 2014; A. C. Santos et al., 2019; Weller et al., 2008; Yadav, Khatak, & Singh Sara, 2017).

5. Motivações e Objetivos

A pele é um órgão que, devido à sua localização e extensão, está constantemente exposta a fatores ambientais externos, como a radiação UV, o tabagismo e a poluição. Estes fatores afetam a sua integridade e contribuem, em conjunto com fatores internos genéticos e fisiológicos, para o seu envelhecimento (Fussell & Kelly, 2020; Gu, Han, Jiang, & Zhang, 2020; Morita, 2007).

O envelhecimento da pele ocorre em todas as camadas que a compõem e consiste em mudanças estruturais e bioquímicas que levam à perda de funções, à diminuição da permeabilidade, com o declínio da capacidade de retenção de água, à diminuição da resposta a lesões e dos mecanismos de reparação e, consequentemente, ao aumento da incidência de doenças da pele (M. A. Farage et al., 2013; Yagi & Yonei, 2018). As manifestações clínicas do envelhecimento cutâneo diferem entre o envelhecimento intrínseco e extrínseco. A pele intrinsecamente envelhecida torna-se fina e atrófica e apresenta rugas finas, elasticidade reduzida e seca, enquanto a pele extrinsecamente envelhecida torna-se mais espessa e áspera e apresenta rugas profundas, opacidade e alterações de pigmentação (Zouboulis, Makrantonaki, & Nikolakis, 2019).

A preocupação crescente da sociedade atual com os cuidados da pele para prevenir e retardar os efeitos do envelhecimento, fez com que, nos últimos anos, a indústria farmacêutica e cosmética se dedicasse a encontrar soluções para estas necessidades. Deste modo, surgiu um novo mercado de consumo, com uma diversidade de compostos e produtos com propriedades antienvhecimento (Han, Chien, & Kang, 2014; Poon et al., 2015). Ainda assim, a indústria continua à procura de novos compostos, entre os quais os ativos naturais têm ganho especial relevância (Corrêa et al., 2018). A pesquisa de compostos naturais com propriedades antienvhecimento está em expansão e inúmeros fitoquímicos extraídos de matrizes vegetais estão a ser investigados (Aguilar-Toalá, Hernández-Mendoza, González-Córdova, Vallejo-Cordoba, & Liceaga, 2019). Este investimento é justificado pela tendência eco que se tem verificado nos últimos anos, na qual os consumidores procuram produtos que combinem a inovação com o natural e sustentável (B. Santos, 2020).

O AG e o ADA são fitoquímicos com propriedades antienvhecimento reconhecidas, contudo as suas características físico-químicas condicionam a sua utilização na pele. A permeação de substâncias na pele envolve um processo complexo de entrada e partição ao longo das camadas, que pode ser afetado pelas propriedades físico-químicas das substâncias. No caso do AG e do ADA, as suas solubilidades e coeficientes de partição

podem ser um desafio à administração cutânea, uma vez que se encontram fora dos preconizados para uma permeação eficaz.

Assim, a aplicação eficiente destes compostos na pele vai depender do sucesso do desenvolvimento de formulações, que são fundamentais para garantir a administração da dose correta, potenciar a ação terapêutica e promover a adesão dos consumidores (Perrie & Rades, 2009; Weiss, 2011). Para este efeito, as formas farmacêuticas semissólidas têm sido as formulações mais utilizadas para aplicação na pele, devido às suas propriedades mecânicas e organoléticas, como a viscosidade e a textura, que permitem a aplicação e permanência na pele e contribuem para a preferência dos utilizadores (Chang, Raw, Lionberger, & Yu, 2013; Fakhry & Hassan, 2013; Teixeira et al., 2019)

Nos últimos anos, na área da cosmética e, em particular, nos produtos antienvelhecimento, a nanotecnologia tem desempenhado um papel importante na entrega de SA na pele (Salvioni et al., 2021). A variedade de nanopartículas existentes no mercado, à base de lípidos, polímeros ou metais, aumenta a possibilidade de desenvolver nanoformulações com características compatíveis, tanto com as SA utilizadas, como com a pele (Basavaraj, 2012; Khezri, Saeedi, & Maleki Dizaj, 2018). O interesse pelas nanopartículas lipídicas, como as SLN e as NLC, tem aumentado devido à sua compatibilidade com a composição lipídica do EC. Além disto, outros benefícios como a inexistência de toxicidade, o direcionamento e libertação controlada de SA, o efeito oclusivo e o aumento da hidratação da pele, contribuem para que estas sejam incorporadas em formulações para a pele (Basavaraj, 2012).

Deste modo, a presente dissertação teve como objetivo geral o desenvolvimento de formulações semissólidas e nanoformulações para veicular o AG e o ADA para administração cutânea, tendo em vista a otimização da eficácia e estabilidade destes compostos. Designadamente, os objetivos específicos desta dissertação foram:

- a) Desenvolvimento de um hidrogel para veicular o AG e de um creme do tipo O/A para veicular o ADA;
- b) Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas, especificamente de SLN, para veicular cada um dos compostos;
- c) Caracterização das formulações desenvolvidas quanto às características organoléticas, pH, viscosidade e, no caso das formulações contendo SLN, quanto ao diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão;
- d) Avaliação do efeito do armazenamento a várias temperaturas durante 30 dias nas propriedades físico-químicas inicialmente caracterizadas.

Capítulo II. Materiais e Métodos

1. Materiais

As SA utilizadas na presente investigação foram o ácido gálico monohidratado, adquirido na Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) e o ácido desidroabiético, adquirido na FUJIFILM Wako Chemicals (Osaka, Japão) seguido de purificação tal como descrito anteriormente (Neto et al., 2021).

Para a produção dos geles, utilizou-se Carbopol® 940, propilenoglicol e trietanolamina, adquiridos na José M. Vaz Pereira, S.A (Lisboa, Portugal); metilparabeno, obtido na AppliChem GmbH (Darmstadt, Alemanha); e água destilada.

Para a produção dos cremes, utilizou-se glicerina, adquirida na Laborspirit, Lda (Santo Antão do Tojal, Portugal); ácido esteárico, obtido na Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA); álcool cetílico, obtido na Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha); Lanolina, adquirida em José M. Vaz Pereira (Lisboa, Portugal); metilparabeno, produzido pela AppliChem GmbH (Darmstadt, Alemanha); trietanolamina, fornecida por José M. Vaz Pereira, S.A (Lisboa, Portugal); e água destilada.

Para a produção das nanopartículas lipídicas sólidas foi utilizado ácido esteárico e Tween® 80, ambos obtidos na Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) e água destilada.

2. Produção das Formulações Semissólidas

2.1. Produção dos Geles

Os geles foram preparados na ausência (controlo) e na presença de AG de acordo com as composições qualitativas e quantitativas descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição qualitativa e quantitativa (%m/v) do gel preparado sem AG (controlo) e com AG.

Componentes	Gel controlo	Gel com AG
AG	0	0,5
Carbopol® 940	1	1
Propilenoglicol	3	3
Metilparabeno	0,2	0,2
Trietanolamina	qbp pH 7,4	qbp pH 7,4
Água Destilada	qbp 100	qbp 100

Para a preparação dos geles, colocou-se num almofariz de porcelana o carbopol® pesado e adicionaram-se quantidades crescentes de água (até cerca de 30% do conteúdo total), para dispensar o polímero e obter uma mucilagem homogénea e translúcida. Após a dispersão, transferiu-se o preparado para um copo graduado, incorporou-se o metilparabeno, já dissolvido no propilenoglicol, e completou-se o volume com água destilada até 100 mL. Por fim, utilizou-se a trietanolamina para ajustar o pH a $7,4 \pm 0,5$. No caso do gel com AG, a SA foi dissolvida no propilenoglicol juntamente com o metilparabeno. O restante procedimento de preparação do gel foi similar ao anterior. Todas as formulações foram produzidas em triplicado.

2.2. Produção dos Cremes

Os cremes O/A foram preparados na ausência (controlo) e presença de ADA de acordo com as composições qualitativas e quantitativas descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição qualitativa e quantitativa (%m/v) do creme O/A preparado sem ADA (controlo) e com ADA.

Componentes	Creme O/A controlo	Creme O/A com ADA
ADA	0	0,5
Ácido esteárico	3	3
Álcool cetílico	1,5	1,5
Lanolina	3	3
Solução aquosa de trietanolamina a 10 %	2,25	2,25
Glicerina	7	7
Metilparabeno	0,2	0,2
Água Destilada	100	100

Na preparação dos cremes foram pesadas em separado as duas fases, a oleosa (lanolina, ácido esteárico e álcool cetílico) e a aquosa (solução aquosa de trietanolamina a 10%, glicerina, metilparabeno e água destilada). De seguida, foram colocadas a aquecer a 70 °C no banho de água *Termofin* (JP SELECTA®, Barcelona, Espanha) até a fase oleosa fundir completamente e ocorrer o equilíbrio de temperatura em ambas as fases. Quando se

verificou que ambas as fases se encontravam à mesma temperatura adicionou-se a fase aquosa à fase oleosa, com agitação rápida e contínua, até completa homogeneização da mistura. Para a agitação, recorreu-se ao equipamento *dual-speed mixer RW 20.n* (IKA® LABORTECHNIK, Staufen, Alemanha), a uma velocidade de 400 rotações/minuto (rpm). Quanto ao creme O/A com ADA, a SA foi adicionada à fase oleosa antes da fusão e posterior adição da fase aquosa, tal como realizado no caso do creme O/A controlo. Todas as formulações foram produzidas em triplicado.

2.3. Estudo da Estabilidade das Formulações Semissólidas

O estudo de estabilidade das formulações desenvolvidas teve uma duração de 30 dias, no qual se procedeu à análise das características organoléticas, do pH e da viscosidade. As formulações foram armazenadas em frascos de vidro âmbar a três temperaturas distintas: temperatura ambiente (23 ± 2 °C), ambiente refrigerado (5 ± 2 °C) e ambiente aquecido (40 ± 2 °C). As análises foram efetuadas nos dias 0, 3, 7, 14 e 30, sendo que se deixava equilibrar as amostras à temperatura ambiente antes de proceder a cada uma das análises.

2.3.1. Avaliação das Características Organoléticas

A avaliação das características organoléticas consistiu na análise visual da coloração, consistência e homogeneidade das formulações, com o objetivo de avaliar de forma rápida e simples a qualidade das preparações e detetar possíveis alterações macroscópicas.

2.3.2. Determinação do pH

O pH das formulações em estudo foi avaliado pelo método potenciométrico, utilizando o medidor de pH *744 pH Meter* (Metrohm, São Paulo, Brasil). De modo a evitar erros de medição, o equipamento foi, previamente, calibrado com soluções tampão a pH 4 e 7. Cada formulação foi analisada em triplicado.

2.3.3. Determinação da Viscosidade

A viscosidade dos geles (controlo e com AG) e do creme O/A controlo foi determinada com recurso ao viscosímetro rotativo *DV-I+ Viscometer* (Brookfield Ametek, Middleboro, MA, EUA). A medição da viscosidade dos geles foi executada à velocidade de 1 rpm utilizando o *spindle* S6, enquanto a viscosidade do creme O/A foi avaliada a 50 rpm com o mesmo *spindle*. Cada amostra foi analisada em triplicado.

A viscosidade do creme O/A com ADA foi determinada, utilizando o reómetro rotativo *DV3T Rheometer* (Brookfield Ametek, Middleboro, MA, EUA). A medição foi efetuada à

velocidade de 1 rpm com o *spindle* 34, com exceção das amostras a 5 °C, que foram medidas a 0,5 rpm com o mesmo *spindle*. Cada amostra foi analisada em triplicado.

3. Produção das Nanoformulações

3.1. Produção de Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Neste trabalho foram desenvolvidas três nanoformulações diferentes, as SLN controlo, as SLN com AG e as SLN com ADA. Estas foram preparadas de acordo com as composições qualitativas e quantitativas descritas na Tabela 8.

Tabela 8 - Composição qualitativa e quantitativa (%m/v) das nanopartículas lipídicas sólidas preparadas sem AG ou ADA (controlo) e com AG ou ADA.

Componentes	SLN controlo	SLN com AG ou ADA
AG/ADA	0	0,5
Ácido Esteárico	5	5
<i>Tween</i> [®] 80	2	2
Água Destilada	100	100

Para a preparação das SLN, foram pesadas em separado as duas fases, nomeadamente a lipídica (ácido esteárico, *Tween*[®] 80 e AG ou ADA) e a aquosa (água destilada). Posteriormente, os tubos de formulação com os componentes foram colocados a aquecer a 75 °C, no banho de água *Termofin* (JP SELECTA[®], Barcelona, Espanha), até a fase lipídica fundir completamente e ocorrer o equilíbrio de temperatura em ambas as fases. Quando tal se verificou, a fase aquosa foi adicionada à fase lipídica e procedeu-se à emulsificação por meio de sonicação, utilizando o *Q125 Sonicator* (Qsonica Sonicators, Newtown, CT, EUA) com uma amplitude de 70%, durante 5 minutos. Por fim, as formulações foram arrefecidas até atingirem a temperatura ambiente. Todas as nanoformulações foram produzidas em triplicado.

3.2. Estudo da Estabilidade das Nanoformulações

O estudo de estabilidade das nanoformulações desenvolvidas teve uma duração de 30 dias, no qual se procedeu à análise das características organoléticas, do pH, da viscosidade, do diâmetro hidrodinâmico (D_h) e do índice de polidispersão (PDI). As amostras foram armazenadas em frascos de vidro, à temperatura ambiente (23 ± 2 °C). As análises foram efetuadas nos dias 0, 7, 14 e 30.

3.2.1. Avaliação das Características Organoléticas e Determinação do pH

Para as nanoformulações, a avaliação das características organoléticas e a determinação do pH foram realizadas como se encontra descrito na secção 2.3.1 e 2.3.2.

3.2.2. Determinação da Viscosidade

A determinação da viscosidade das nanoformulações foi realizada no reómetro rotativo *DV3T Rheometer* (Brookfield Ametek, Middleboro, MA, EUA), utilizando o *spindle* 18, a uma velocidade de 250 rpm. Cada amostra foi analisada em triplicado.

3.2.3. Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico e do Índice de Polidispersão

Para a caracterização do D_h e do PDI recorreu-se ao método de espectroscopia de correlação fotónica (DLS), utilizando o *DelsaTM Nano C* (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, EUA). Foram analisadas três réplicas de cada nanoformulação preparada de forma independente, sendo que as nanoformulações foram diluídas em água destilada (50x) antes de se proceder à análise.

Capítulo III. Resultados e Discussão

1. Formulações Semissólidas

1.1. Escolha do Tipo de Formulação

Este trabalho teve como objetivo central o desenvolvimento de formulações inovadoras para a administração tópica de substâncias com propriedades antienvelhecimento. Como tal, foi necessário à partida escolher os tipos de formulação a desenvolver de forma a ocorrer uma difusão eficaz dos compostos até ao local de ação, que neste caso será a epiderme e a derme.

Os aspetos que foram tidos em consideração para a escolha das formulações foram: as características físico-químicas das substâncias em estudo, como a solubilidade em água e o coeficiente de partição, e os vários tipos de formulações que têm vindo a ser desenvolvidas para administração cutânea.

A solubilidade é importante por duas razões, em primeiro lugar, porque deve existir compatibilidade entre a SA e o tipo de formulação, isto é, se a SA é hidrofílica, a formulação também deve apresentar propriedades hidrofílicas de modo a facilitar a incorporação desta. Em segundo lugar, porque o sistema desenvolvido deve apresentar uma solubilidade capaz de atravessar as diferentes camadas da pele, de modo a exercer a sua ação. Por exemplo, o EC favorece a passagem de substâncias lipofílicas, enquanto as camadas abaixo deste favorecem a passagem de substâncias hidrofílicas. Por esta razão, é importante que os sistemas apresentem solubilidades adequadas para que consigam atravessá-las (Jankowski, Dyja, & Sarecka-Hujar, 2017; N'Da, 2014).

Em relação ao coeficiente de partição, valores de $\log P$ negativos indicam que a substância é hidrofílica, enquanto valores de $\log P$ positivos, indicam que a substância é lipofílica. Vários estudos têm demonstrado que moléculas com valores de $\log P$ compreendidos entre 1 e 3, exibem propriedades hidrofílicas e lipofílicas suficientes para obter uma permeação transdérmica adequada, uma vez que são capazes de atravessar o EC de natureza lipídica e as restantes camadas da epiderme de natureza hidrofílica (N'Da, 2014).

O AG apresenta um $\log P$ inferior a 1 (entre 0,70 e 0,96) e solubilidade em água de $1,19 \times 10^4$ mg/L, o que significa que é uma substância de natureza maioritariamente hidrofílica (National Center for Biotechnology Information, 2004; Royal Society of Chemistry, 2021; The Human Metabolome Database, 2007). Assim, formulação escolhida foi um hidrogel. O elevado teor em água (entre 70% e 99%) fornece aos hidrogéis uma excelente biocompatibilidade com os tecidos, aumentando a hidratação do EC e uma maior capacidade de incorporar facilmente substâncias hidrofílicas (Li & Mooney, 2016). A

hidratação da pele é uma forma fácil de entregar eficazmente substâncias hidrofílicas. A água, devido ao seu carácter polar, interage com os principais grupos polares da camada lipídica do EC, alterando a sua organização e aumentando a sua fluidez. Este aumento leva a uma maior permeabilidade (B. Kim et al., 2020). Para além disso, o propilenoglicol adicionado ao hidrogel atua como promotor da permeação, ao ser capaz de atravessar os lípidos do EC e, assim, aumentar o coeficiente de partição pele/formulação (Jankowski et al., 2017).

O ADA apresenta propriedades físico-químicas opostas ao AG, com valores de $\log P$ compreendidos entre 4,80 e 6,52 e uma solubilidade em água de 5,11 mg/L, o que faz com que esta substância seja de natureza lipofílica (Peng & Roberts, 2000; U.S. Environmental Protection Agency, 2021). Estes valores de $\log P$ não se encontram dentro dos ideais, o que significa que o ADA pode ficar retido no EC e não conseguir exercer a sua ação. Substâncias lipofílicas como esta, apresentam normalmente taxas de libertação e difusão maiores em formulações hidrofóbicas. Contudo, uma vez que a ação pretendida ocorre nas camadas mais profundas da pele, é necessário que a formulação apresente algumas propriedades hidrofílicas.

Deste modo, a formulação escolhida para o ADA foi um creme do tipo O/A. O ADA foi adicionado à fase interna oleosa devido à sua solubilidade elevada em excipientes apolares. A utilização de uma formulação bifásica permite adicionar excipientes miscíveis em água ou hidrofóbicos, com funções de solvente e de promotor de permeação, que podem melhorar a solubilidade de substâncias lipofílicas na formulação e aumentar a permeabilidade dos lípidos que constituem o EC, de modo que as substâncias consigam atravessar mais facilmente a barreira cutânea (Jankowski et al., 2017). Um exemplo são os agentes emulsivos que podem também atuar como agentes solubilizantes, porque por um lado, facilitam a dissolução de substâncias lipofílicas, ao reduzir a tensão superficial entre as duas fases e diminuir a energia necessária para dispersar (Prista et al., 2003). Por outro lado, por conseguirem penetrar nos lípidos do EC, alterar a sua organização e, assim, aumentar a solubilidade do composto nestes. Na formulação com ADA, os agentes emulsivos utilizados foram o ácido esteárico, o álcool cetílico e a trietanolamina.

1.2. Formulação semissólida para veicular o Ácido Gálico

1.2.1. Caracterização da formulação

Tal com o referido anteriormente, optou-se por veicular o AG recorrendo a um hidrogel, com base nas propriedades maioritariamente hidrofílicas deste composto. O hidrogel foi então produzido na presença e ausência de AG, tendo-se procedido à caracterização do hidrogel quanto às características organoléticas, pH e viscosidade (tabela 9).

Tabela 9 - Características organoléticas, pH e viscosidade dos geles controlo e com AG imediatamente após a produção.

Formulação	Características Organoléticas	pH	Viscosidade (mPa.s)
Gel Controlo		7,5 ± 0,1	7,7 (± 0,9) x10 ⁵
Gel com AG		7,42 ± 0,01	3,69 (± 0,06) x10 ⁵

No que diz respeito às características organoléticas, ambos os geles produzidos apresentaram um aspeto homogéneo e translúcido, tal como esperado, mas com colorações diferentes. O gel controlo apresentou uma coloração transparente, típica de um hidrogel de Carbopol® 940, enquanto o gel com AG sofreu alterações na coloração à medida que o pH foi ajustado com trietanolamina. Inicialmente, apresentava uma ligeira tonalidade amarela, característica do AG, que se foi intensificando. Esta alteração da coloração pode dever-se ao facto do AG sofrer oxidação a pH neutro e básico, dando origem a compostos de tonalidade mais escura (Eslami, Pasanphan, Wagner, & Buettner, 2010; Pant, Özkasikci, Fürtauer, & Reinelt, 2019; Sakalauskas, Ziaunys, & Smirnovas, 2020).

Em relação aos valores de pH, estes foram obtidos com a adição da trietanolamina, que neutraliza os grupos carboxílicos do Carbopol® 940. Esta neutralização ioniza as moléculas do carbómero, gerando cargas negativas ao longo do polímero. A repulsão eletrostática resultante cria a estrutura tridimensional do gel (Islam, Rodríguez-Hornedo, Ciotti, & Ackermann, 2004). Para a obtenção da viscosidade ideal os valores de pH devem

estar compreendidos entre 6-8 (Melo, Domingues, & Lima, 2018), pelo que os resultados obtidos se encontram dentro do intervalo aceitável. Apesar de se encontrarem acima dos valores de pH da pele (4-6), formulações cutâneas com estes valores de pH não são suscetíveis de causar irritações, tal como descrito anteriormente (Aiyalu, Govindarjan, & Ramasamy, 2016; Ali & Yosipovitch, 2013; Leonida & Kumar, 2016).

Facilmente, o pH dos hidrogeles pode ser ajustado para um determinado valor. A formulação deve apresentar um valor de pH que seja compatível com a pele, para não interferir com a sua integridade e com a SA, para garantir a sua estabilidade. Em relação à SA, o pH pode afetar a sua solubilidade e ionização, provocando alterações na capacidade de permeação. No caso do AG, como se trata de um ácido fraco, o aumento do pH pode levar à sua ionização e aumento da solubilidade (Jankowski et al., 2017).

Os valores de viscosidade encontram-se na mesma ordem de grandeza, apesar do gel com AG apresentar um valor ligeiramente mais baixo, comparativamente com o gel controlo. Esta diferença pode dever-se à variação de pH, uma vez que o gel controlo apresenta um pH ligeiramente mais alto e, quanto mais alto é este valor, mais viscoso se torna o sistema, e à adição do AG, uma vez que pode ocorrer diminuição da viscosidade quando SA ácidas são adicionadas a geles à base de Carbopol®, tal como descrito anteriormente (Gasperi, 2015).

Os valores elevados de viscosidade obtidos podem estar relacionados com o facto da viscosidade aparente dos geles de Carbopol® variar com a velocidade de rotação aplicada no viscosímetro, dado que quanto menor for a velocidade, maiores são os valores de viscosidade (Alves et al., 1990; Lubrizol, 2008). Neste caso, a velocidade utilizada foi baixa (1 rpm).

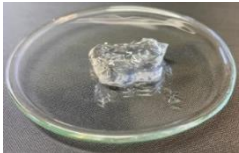
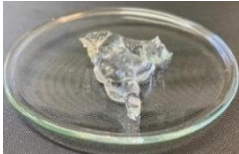
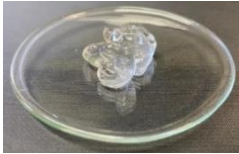
1.2.2. Estudo de Estabilidade

1.2.2.1. Características Organoléticas

A variação das características organoléticas dos geles armazenados a 5, 25 ou 40 °C durante 30 dias encontra-se representada na tabela 10. O gel controlo manteve um aspeto homogéneo, transparente e brilhante, não tendo sido observadas alterações durante todo o período de armazenamento às diferentes temperaturas. Por outro lado, o gel com AG, apesar de manter o aspeto homogéneo e translúcido, apresentou alterações na coloração, isto é, foi escurecendo para uma tonalidade castanha, ainda que menos intensa quando o armazenamento foi realizado em ambiente refrigerado. Tóth et al. (2014) e, mais tarde, Pant et al. (2019) reportaram também esta alteração da coloração do AG ao longo do tempo em

meios com pH semelhantes (Pant et al., 2019; Tóth et al., 2014). Contudo, mais estudos são necessários para investigar o mecanismo de oxidação do AG.

Tabela 10 - Características organoléticas dos geles controlo e com AG em função da duração (dia 0, 7 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento.

Temperatura	Formulação	Dia 0	Dia 7	Dia 30
25 °C	Gel Controlo		N.D.	
5 °C			N.D.	
40 °C			N.D.	
25 °C	Gel com AG			
5 °C				
40 °C				

1.2.2.2. pH

A variação do valor de pH do gel controlo e com AG em função do tempo e temperatura de armazenamento está representada na Figura 7. Os valores de pH do gel controlo e do gel com AG não apresentaram variações pronunciadas ao longo do tempo independentemente da temperatura de armazenamento. Em ambos os casos, o intervalo de valores médios obtido encontra-se próximo do pH neutro (7,2-7,5) e manteve-se praticamente constante ao longo do tempo.

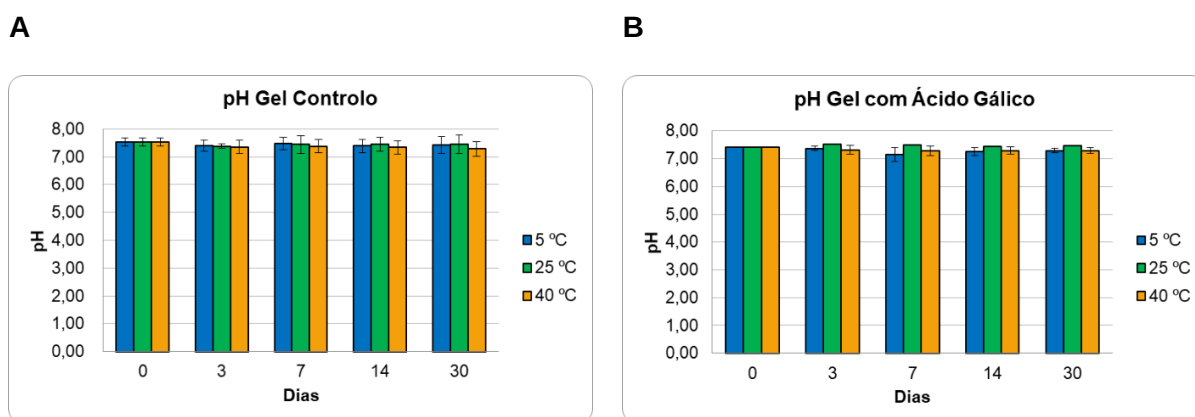


Figura 7 - Representação gráfica da variação de pH dos geles controlo (A) e com AG (B) em função da duração (dia 0, 3, 7, 14 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento.

1.2.2.3. Viscosidade

A variação da viscosidade dos geles controlo e com AG em função do tempo e da temperatura de armazenamento estão representadas na Figura 8. É possível observar que os valores de viscosidade do gel controlo foram superiores aos obtidos com o gel com AG. Esta diferença de valores na viscosidade entre os geles, devido à incorporação de AG, pode ser uma vantagem, uma vez que a viscosidade da formulação pode afetar a taxa de libertação, ao determinar o coeficiente de difusão da SA. A viscosidade é inversamente proporcional ao coeficiente de difusão, ou seja, quanto mais viscosa for a formulação, menor será o coeficiente de difusão e, consequentemente, a taxa de libertação da SA (Alves et al., 1990; Bolla, Clark, Juluri, Cheruvu, & Renukuntla, 2020; Y. Chen et al., 2021). Por outro lado, o facto dos geles apresentarem elevada viscosidade, tal como se verifica com os geles produzidos neste trabalho, pode ser benéfico quanto à adesividade das formulações à pele, uma vez que impede o escoamento do gel e, consequentemente, aumenta a permanência no local de aplicação. O aumento do tempo de contacto entre a pele e a formulação, melhora a permeação, pois o tempo disponível para a difusão da SA é prolongado (Binder, Mazál, Petz, Klang, & Valenta, 2019).

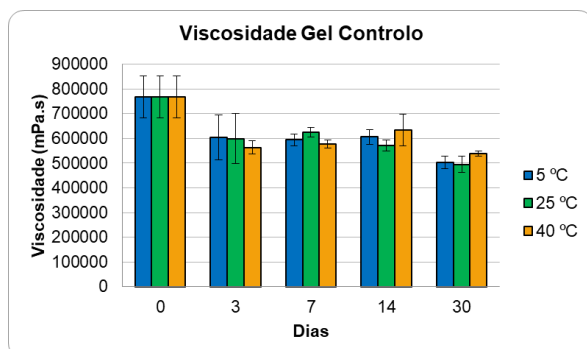
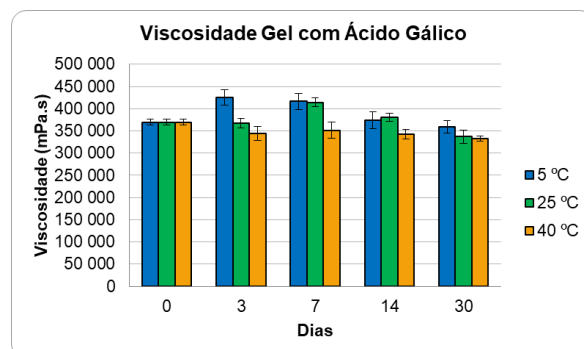
A**B**

Figura 8 - Representação gráfica da variação da viscosidade dos geles controlo (A) e com AG (B) em função da duração (dia 0, 3, 7, 14 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento.

Para além disso, verificou-se uma diminuição da viscosidade do gel controlo ao longo do tempo de armazenamento, a qual não se verificou no caso do gel com AG. Uma vez que o AG é um ácido fraco ($pK_a = 4,4$) que se encontra maioritariamente desprotonado e carregado negativamente a pH 7,4. A repulsão entre a carga negativa do AG e as cargas negativas do carbómero pode favorecer a manutenção da estrutura tridimensional do gel, evitando que a viscosidade diminua ao longo do tempo.

1.3. Formulação semissólida para veicular o Ácido Desidroabiético

1.3.1. Caracterização da formulação

A formulação semissólida escolhida para veicular o ADA foi um creme O/A, de acordo com as propriedades lipofílicas deste composto, conforme descrito anteriormente. O creme O/A foi então produzido na presença e ausência de ADA, tendo-se procedido à caracterização deste quanto às características organoléticas, pH e viscosidade (tabela 11).

Tabela 11 - Características organoléticas, pH e viscosidade dos cremes O/A controlo e com ADA imediatamente após a preparação.

Formulação	Características Organoléticas	pH	Viscosidade (mPa.s)
Creme Controlo		5,9 ± 0,2	5 (± 1) x10 ³
Creme com ADA		5,8 ± 0,2	5,1 (±0,6) x10 ⁴

Relativamente aos cremes desenvolvidos, as suas características organoléticas revelaram-se satisfatórias, já que ambos apresentaram uma tonalidade branca, aspeto brilhante e homogêneo, aparentemente com consistência adequada.

Os valores de pH obtidos para o creme O/A na ausência ou presença de ADA encontraram-se dentro do intervalo compatível com o pH da pele (4-6) (Aiyalu et al., 2016; Ali & Yosipovitch, 2013; Leonida & Kumar, 2016). Não foram observadas diferenças no pH das formulações, indicando que a adição do ADA não provocou alterações neste parâmetro.

A viscosidade foi o parâmetro que distinguiu as formulações, com o creme com ADA a apresentar maior viscosidade. Esta diferença pode ter sido provocada pela incorporação do ADA na formulação. Em relação aos valores de viscosidade obtidos, estudos indicam que após a produção, os cremes devem apresentar uma viscosidade superior a 10000 mPa.s, de modo a garantir a estabilidade da formulação, caso ocorra perda de viscosidade durante o período de armazenamento (Schwinn & Jackson, 2020). Tendo em conta este valor de referência, a viscosidade do creme de ADA foi aceitável, enquanto a viscosidade do creme controlo foi mais baixa do que o desejável. Estes resultados sugerem que no decorrer do

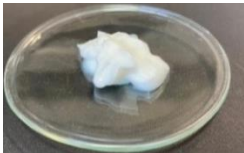
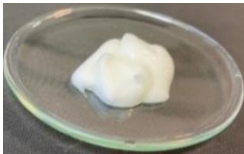
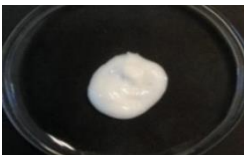
tempo, o creme controlo poderá apresentar problemas de estabilidade referentes à sua viscosidade.

1.3.2. Estudo de Estabilidade

1.3.2.1. Características Organoléticas

A variação das características organoléticas dos cremes O/A desenvolvidos e armazenados a 5, 25 ou 40 °C durante 30 dias encontra-se representada na tabela 12.

Tabela 12 - Características organoléticas dos cremes controlo e com AG em função da duração (dia 0, 7 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento.

Temperatura	Formulação	Dia 0	Dia 7	Dia 30
25 °C	Creme Controlo		N.D.	
5 °C			N.D.	
40 °C			N.D.	
25 °C	Creme com ADA			
5 °C				
40 °C				

As formulações mantiveram a sua aparência inicial, não tendo sido observadas alterações na cor ou na consistência, com exceção da amostra de creme controlo mantida à temperatura ambiente. Esta apresentou uma diminuição acentuada da consistência, tornando-se líquida e com aspeto leitoso. A mudança considerável de aspeto e consistência pode dever-se a fatores físicos, como a separação de fases, relacionada com a interação da fase dispersa com a fase contínua e o tamanho e distribuição das partículas da fase dispersa e a fatores químicos relacionados com alterações no pH, natureza e composição dos agentes emulsivos, processos fotoquímicos e contaminações microbianas derivadas de problemas de conservação (Maphosa & Jideani, 2018; Rangsansarid & Fukada, 2007). Difícilmente com a observação das características organoléticas é possível explicar a causa que levou a esta instabilidade, pelo que seriam necessários mais estudos para concluir qual o mecanismo inerente a esta transformação.

1.3.2.2. pH

A variação do pH dos cremes O/A em função do tempo e da temperatura de armazenamento está apresentada na Figura 9. Através da medição do pH é possível perceber se ocorreram alterações nos componentes do creme, como incompatibilidades ou degradação, que nem sempre são evidentes visualmente. Este pode indicar problemas de estabilidade entre os constituintes e a SA ou subseqüentes do processo de produção (Rosário et al., 2021).

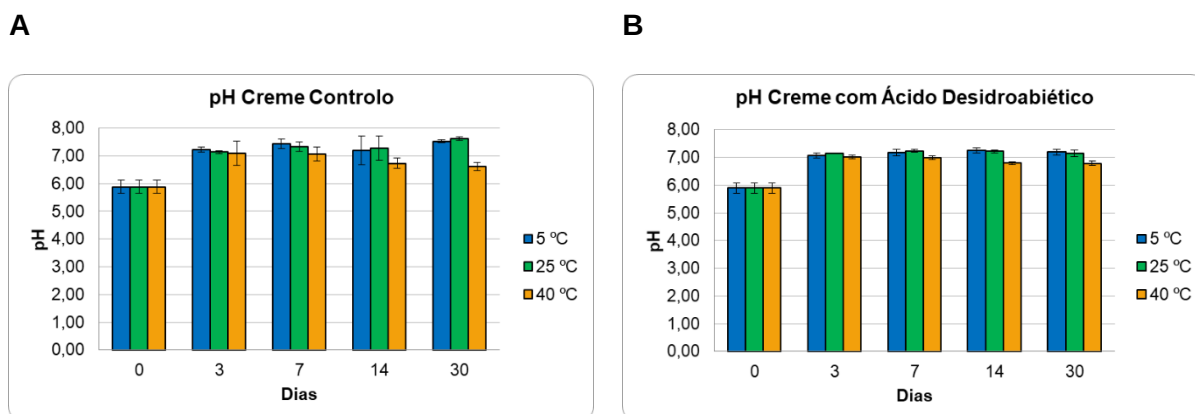


Figura 9 - Representação gráfica da variação de pH dos cremes O/A controlo (A) e com ADA (B) em função da duração (dia 0, 3, 7, 14 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento.

Apesar de ao terceiro dia se observar um aumento do pH para valores próximos do pH neutro, a partir dessa altura não houve diferenças pronunciadas do valor de pH ao longo do tempo. A subida de pH pode estar relacionada com a estabilização da mistura de trietanolamina com ácido esteárico, que forma um sabão iónico com pH 8 (Rowe, Sheskey,

& Owen, 2006). Relativamente aos valores obtidos, estes estão de acordo com outras investigações, por exemplo, Gupta et al (2015) realizaram um estudo sobre a formulação e avaliação da estabilidade de um creme à base de extratos naturais, contendo ácido esteárico e trietanolamina e obtiveram valores de pH próximos de 7 (6,2-6,9) (N. Gupta, Dubey, Prasad, & Roy, 2015). Também Maru & Lahoti (2018) realizaram um estudo idêntico, no qual a formulação protótipo utilizada apresentou um valor de pH próximo da neutralidade (7,22) (Maru & Lahoti, 2018). Em termos de compatibilidade com o pH da pele, valores de pH entre 6 e 7 são compatíveis, pelo que as formulações não apresentam risco de irritação cutânea (Aiyalu et al., 2016; Ali & Yosipovitch, 2013; Leonida & Kumar, 2016).

1.3.2.3. Viscosidade

A variação da viscosidade dos cremes O/A desenvolvidos em função do tempo e da temperatura de armazenamento está representada na Figura 10. A viscosidade é uma das variáveis que afeta a estabilidade de uma emulsão, existindo entre estas uma relação direta e linear, ou seja, quanto maior a viscosidade, mais estável é a emulsão. A viscosidade de uma formulação depende das suas propriedades físico-químicas e das condições de temperatura a que está submetida e pode ser alterada pela composição de lípidos, pela proporção entre a fase aquosa e oleosa, pela concentração dos agentes emulsivos ou pela adição de polímeros (Isaac et al., 2008; Milan, Milão, Souto, & Corte, 2007). A avaliação desta variável ajuda na determinação da consistência e fluidez apropriadas e na indicação do comportamento da formulação ao longo do tempo (Pinto, Oliveira, & Tescarollo, 2020).

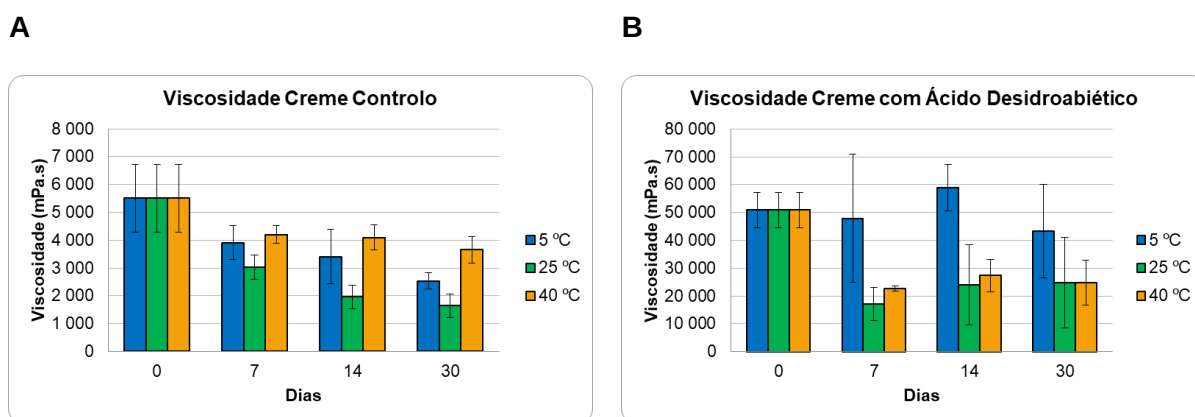


Figura 10 - Representação gráfica da variação da viscosidade dos cremes O/A controlo (A) e com ADA (B) em função da duração (dia 0, 7, 14 e 30) e da temperatura (5, 25 ou 40 °C) de armazenamento.

No creme controlo, verificou-se a diminuição acentuada da viscosidade do creme armazenado à temperatura de 25 °C para valores inferiores a 2000 mPa.s. Segundo dados obtidos em estudos de avaliação da estabilidade de cremes, as formulações podem ser

consideradas estáveis no decorrer do tempo quando apresentam valores superiores a 2000 mPa.s. Abaixo deste valor, os cremes tornam-se muito fluidos e perdem a sua utilidade (Schwinn & Jackson, 2020). É de notar que esta redução da viscosidade está em conformidade com o aspeto leitoso da formulação controlo armazenada à temperatura ambiente. A redução da viscosidade ao longo do tempo também se verificou quando o armazenamento foi realizado a 5 e 40 °C, tendo sido mais pronunciado no primeiro caso. Este resultado reforça a possibilidade de existir instabilidade na formulação, particularmente em ambiente refrigerado, uma vez que o expetável é a viscosidade diminuir com o aumento da temperatura (S. K. Singh, Nagpal, & Saini, 2014). Em contrapartida, o creme com ADA apresentou valores de viscosidade mais altos, bem como, um comportamento termorreversível esperado nos sistemas semissólidos, uma vez que o aumento da temperatura (de 5 para 25 °C) causou a diminuição da viscosidade. Contudo, sem nunca atingir valores inferiores a 2000 mPa.s, pelo que se pode considerar que esta formulação é estável ao longo do tempo.

2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas

2.1. Escolha do Tipo de Nanopartículas

Para além do desenvolvimento de formulações semissólidas, este trabalho teve também como objetivo o desenvolvimento de nanoformulações para veicular o AG e o ADA, para aplicação na pele.

Nesta investigação, a escolha das nanopartículas lipídicas, nomeadamente das SLN, assentou nas vantagens que estas apresentam quando são utilizadas em preparações para aplicação tópica. As SLN apresentam uma matriz lipídica compatível com a composição lipídica da pele, o que favorece a entrada das nanopartículas e, consequentemente, a libertação de SA (Deltreggia et al., 2019). Além da base lipídica, apresentam outras características, como o reduzido tamanho e a elevada área de superfície, que lhes confere propriedades adesivas que facilitam o contacto entre a SA e o EC e, consequentemente, aumentam a permeação desta através da pele. Estas propriedades contribuem também para um efeito oclusivo que, se tem verificado que, promove a hidratação da pele e o reforço da barreira lipídica (Bonifácio et al., 2013; Guimarães & Ré, 2011; Uchechi et al., 2014; Wissing & Müller, 2003). A taxa de oclusão é influenciada pelo grau de cristalização e pelo número e tamanho das partículas (Uchechi et al., 2014)

Por outro lado, a matriz lipídica sólida das SLN pode proteger SA instáveis de reações como, hidrólise ou oxidação. Isto é relevante no caso do AG, uma vez que é suscetível de sofrer oxidação. São vários os exemplos de compostos cuja estabilidade química melhorou com a utilização de SLN, como o retinol. Foram investigados os efeitos das SLN na estabilidade do retinol, através da utilização de nanoformulações contendo diferentes misturas de lípidos e surfactantes. O estudo revelou resultados positivos de estabilidade, no entanto, esta podia variar com os lípidos e surfactantes utilizados (D. Patel, Kumar, Kesharwani, & Mazumdar, 2015). Assim, para o desenvolvimento das SLN é também importante selecionar cuidadosamente os componentes, de modo a obter a estabilidade ideal das SA incorporadas.

Ademais, as nanopartículas lipídicas são boas candidatas para a incorporação de substâncias lipofílicas com coeficientes de partição elevados ($\log P > 3$), como é o caso do ADA (Y.-Q. Yu, Yang, Wu, & Fan, 2021). Desta forma, o transporte e entrega deste composto na pele pode melhorar significativamente com a utilização de SLN, com possibilidade de aumentar a biodisponibilidade do composto na pele.

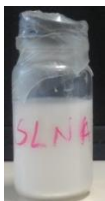
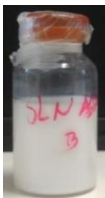
As SLN podem ainda ser usadas na produção de protetores solares, uma vez que a sua estrutura cristalina confere uma proteção física contra a radiação UV ao refleti-la,

atuando como um filtro solar físico. Inclusivamente, é observada uma ação sinérgica quando se encapsulam filtros solares químicos em SLN, bem como um aumento da duração do efeito protetor, uma vez que a libertação dos filtros químicos é controlada (Jain & Jain, 2010; Morabito, Shapley, Steeley, & Tripathi, 2011; Nikolić, Keck, Anselmi, & Müller, 2011). Este efeito protetor aliado aos efeitos do AG e do ADA, pode ser uma estratégia interessante no desenvolvimento de formulações antienvelhecimento, com a finalidade de retardar o fotoenvelhecimento da pele.

2.2. Caracterização das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Após a produção das SLN na ausência (controlo) e na presença de AG ou ADA foram avaliados diversos parâmetros físico-químicos como as características organoléticas, o D_h , o PDI, o pH e a viscosidade, cujos dados obtidos estão resumidos na tabela 13.

Tabela 13 - Características organoléticas, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, pH e viscosidade das SLN desenvolvidas na ausência (controlo) e na presença de AG ou ADA.

Formulação	Características Organoléticas	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão	pH	Viscosidade (mPa.s)
SLN Controlo		313 ± 10	$0,09 \pm 0,02$	$3,9 \pm 0,1$	$1,59 \pm 0,01$
SLN com AG		379 ± 10	$0,14 \pm 0,02$	$4,12 \pm 0,09$	$1,53 \pm 0,01$
SLN com ADA		300 ± 7	$0,16 \pm 0,03$	$3,10 \pm 0,03$	$1,46 \pm 0,01$

As nanoformulações desenvolvidas apresentavam características organoléticas semelhantes entre elas, com um aspeto branco leitoso e homogéneo. A coloração branca, característica das dispersões lipídicas, fornece-lhes efeitos clareadores vantajosos para a formulação, uma vez que permitem atenuar a coloração de certas SA coloridas, como é o caso da coenzima Q10 (coloração amarela), ou de SA que durante o armazenamento formam produtos intermediários coloridos, como acontece com as vitaminas ou o AG tal como se verificou anteriormente neste trabalho (E. B. Souto & Müller, 2008).

O D_h das formulações, relacionado com o tamanho das nanopartículas formadas, e o PDI, que mede a heterogeneidade dos tamanhos das nanopartículas, apresentaram valores inferiores a 400 nm e 0,25, respetivamente. Dados já reportados indicam que valores de D_h inferiores a 500 nm são aceitáveis para uma permeação eficaz na pele e que valores de PDI inferiores a 0,3 indicam nanopartículas com tamanhos homogéneos e baixa predisposição para agregação (Guo et al., 2018). Desta forma, as SLN desenvolvidas apresentam características aceitáveis para aplicação cutânea.

As nanoformulações produzidas apresentaram um intervalo de valores de pH entre 3 e 4. É importante, quando se desenvolve formulações para aplicação na pele, ter em consideração os valores de pH obtidos, pois se estas se tornarem extremamente ácidas ou alcalinas podem provocar efeitos indesejados (Jose, 2018). Assim, o pH das formulações é um fator importante a ter em consideração durante a produção, para evitar irritações ou alterações na barreira cutânea, que levem ao desenvolvimento de infeções na pele (Vazzana, Figueiro, Faggio, Santini, & Souto, 2017). Uma vez que o pH da pele se encontra entre valores de 4-6 (Aiyalu et al., 2016; Ali & Yosipovitch, 2013; Leonida & Kumar, 2016), estas formulações em princípio não causarão irritações, no entanto, estudos de biocompatibilidade serão necessários para verificar esta hipótese.

Comparativamente às formulações semissólidas desenvolvidas, as amostras de SLN apresentaram valores de viscosidade baixos. Isto deve-se ao facto de as dispersões de SLN serem constituídas, normalmente, por cerca de 10-20% (m/m) de matriz lipídica e 80-90% (m/m) de água. Como resultado, o elevado teor em água faz com que apresentem uma consistência líquida e, consequentemente, baixa viscosidade (inferior a 100 mPa.s) (E.B. Souto, Wissing, Barbosa, & Mu, 2004).

2.3. Estudo de Estabilidade

2.3.1. Características Organoléticas

As preparações mantiveram o seu aspeto branco leitoso e homogéneo, não tendo sido observadas variações neste parâmetro durante os 30 dias em que ocorreram os estudos de estabilidade à temperatura ambiente (25 °C).

É importante salientar que as nanoformulações contendo AG também mantiveram o seu aspeto inalterado, apesar dos problemas de estabilidade reportados anteriormente para este composto. No gel com AG foi visível a oxidação do composto ao longo do tempo, pela alteração da coloração da formulação de amarelo para castanho, mas tal não se verificou no caso das SLN. Assim, esta análise permite prever que a encapsulação do AG proporcionou proteção contra a oxidação, dado que não se verificaram problemas no aspeto visual das formulações. De facto, a estabilidade verificada nas amostras de SLN com AG pode estar relacionada com o pH das formulações. Enquanto o gel de AG apresentou um intervalo de valores de pH próximo de 7,4, as amostras de SLN com AG apresentaram valores mais baixos, na ordem dos 4,5. O AG tende a apresentar sinais de oxidação com o aumento do pH, principalmente a partir de valores próximos de 6 (Pant et al., 2019; Tóth et al., 2014). Assim, os valores de pH inferiores obtidos com a produção das SLN podem ser uma vantagem, pois o risco de ocorrerem reações de oxidação com o AG é menor.

2.3.2. pH

Na figura 11 está representada a variação de pH das diferentes nanoformulações contendo SLN em função do tempo de armazenamento à temperatura ambiente.

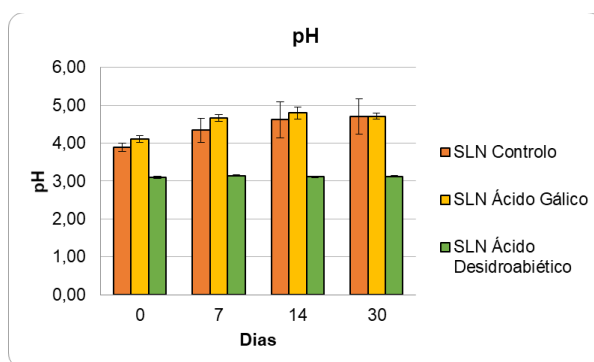


Figura 11 - Representação gráfica da variação de pH das SLN controlo e com AG ou ADA em função da duração (dia 0, 7, 14 e 30) de armazenamento à temperatura ambiente.

Os valores de pH das nanoformulações contendo SLN controlo e com AG sofreram um ligeiro aumento para valores próximos de 5, enquanto os das amostras de SLN com ADA mantiveram-se estáveis em valores próximos de 3. Apesar dos valores obtidos nas

amostras de SLN de ADA serem inferiores ao intervalo de valores de pH compatíveis com a pele (4-6), a pele é capaz de absorver pequenas quantidades de substâncias ácidas ou alcalinas devido à existência de um sistema tampão (Clares et al., 2014). Pelo que, em princípio, a formulação não causará irritações cutâneas.

O pH em nanoformulações contendo SLN é um parâmetro importante a considerar, visto que pode influenciar outros parâmetros, como o D_h , o PDI e o potencial zeta. Shah et al. (2014) avaliaram, com recurso ao tamanho da partícula e ao potencial zeta, a otimização e a estabilidade de SLN constituídas por ácido esteárico e *Tween*® 20. Um dos parâmetros estudados foi a influência do pH durante e após a preparação, através da adição de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, e concluíram que o D_h das formulações aumentava tanto em meio ácido como em meio básico. Relativamente aos valores do PDI, concluíram que apresentavam uma tendência oposta, ou seja, com a adição do ácido, os valores aumentavam e, com a adição da base, os valores diminuía. No caso do potencial zeta, este aumentava com a adição de base e diminuía com a adição do ácido, o que também se correlacionou com o aumento dos valores de PDI observados nessas formulações (Shah, Eldridge, Palombo, & Harding, 2014).

2.3.3. Viscosidade

Na Figura 12 está representada a variação de viscosidade das diferentes nanoformulações contendo SLN ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente.

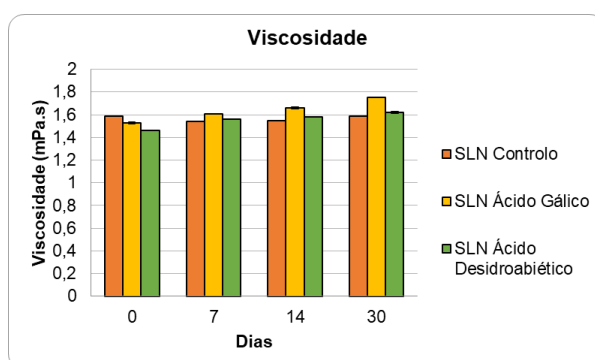


Figura 12 - Representação gráfica da variação da viscosidade das SLN controlo e com AG ou ADA em função da duração (dia 0, 7, 14 e 30) de armazenamento à temperatura ambiente.

As SLN com AG e com ADA apresentaram um ligeiro aumento da viscosidade ao longo do tempo, enquanto a viscosidade das SLN controlo oscilou à volta dos valores iniciais. Não obstante, este aumento não foi significativo para a alteração da consistência das formulações, tendo estas permanecido líquidas durante o armazenamento. A baixa viscosidade que as dispersões de SLN apresentam não é vantajosa para a aplicação tópica,

uma vez que diminui o tempo de contacto com o local de aplicação (Tichota, Silva, Sousa Lobo, & Amaral, 2014). Para melhorar esta condição, as SLN podem ser incorporadas em formas farmacêuticas semissólidas, como, por exemplo, hidrogéis, que aumentam a consistência das formulações finais, bem como, a estabilidade das nanopartículas incorporadas a longo prazo (Guimarães & Ré, 2011; E.B. Souto et al., 2004; Tichota et al., 2014).

A viscosidade das nanopartículas lipídicas pode ser influenciada pelo tipo e quantidade de lipídios utilizados (Khalil, El-Bary, Kassem, Ghorab, & Basha, 2013). Por exemplo, quanto maior a quantidade de ácido esteárico, maior é a viscosidade da fase interna e, conseqüentemente, menor é a eficiência da homogeneização, dificultando a redução do tamanho das partículas. Como resultado, as partículas podem aumentar de tamanho (C. C. Chen, Tsai, Huang, & Fang, 2010; Shah et al., 2014).

2.3.4. Diâmetro Hidrodinâmico e Índice de Polidispersão

A figura 13 representa a variação do D_h e do PDI das SLN produzidas na ausência (controlo) e presença de AG ou ADA ao longo da duração de armazenamento à temperatura ambiente. O D_h e o PDI de nanotransportadores são características físicas importantes a ter em conta durante o desenvolvimento, pois podem afetar as propriedades da formulação, o desempenho, o processo de produção, a estabilidade e a aparência do produto final (Danaei et al., 2018). Assim, é necessário analisar o possível efeito que estes parâmetros podem ter na libertação da SA e na permeação através das camadas da pele, bem como, monitorizar a estabilidade ao longo do tempo (Uchechi et al., 2014).

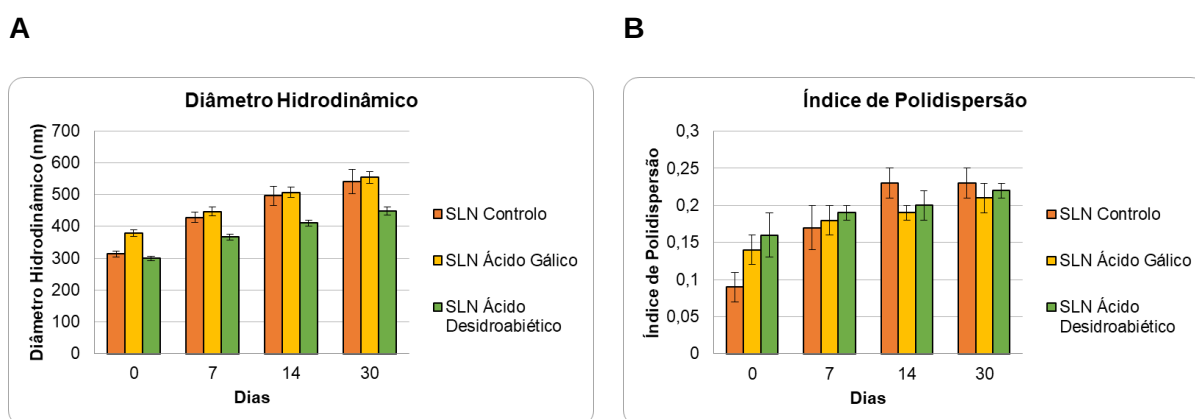


Figura 13 - Representação gráfica da variação do diâmetro hidrodinâmico (A) e do índice de polidispersão (B) das SLN controlo e com AG ou ADA em função da duração (dia 0, 7, 14 e 30) de armazenamento à temperatura ambiente.

Relativamente aos valores obtidos de D_n , todas as SLN apresentaram um aumento do tamanho das partículas, principalmente, as amostras de SLN controlo e com AG cujo aumento foi mais acentuado, ultrapassando os 500 nm. Este aumento é uma limitação, pois o tamanho reduzido das partículas, melhora o contacto entre estas e o EC e aumenta a permeação e a libertação controlada da SA na pele (Nafisi & Maibach, 2018).

O aumento do tamanho das partículas foi acompanhado pelo aumento dos valores de PDI, o que significa que existiu um aumento na variação da distribuição de tamanhos. No entanto, os valores obtidos foram sempre inferiores a 0,3, pelo que este aumento não reflete uma variação significativa quanto à homogeneidade de tamanhos nas nanoformulações. A distribuição dos tamanhos das partículas pode ser afetada por fatores relacionados com a produção, como a taxa de agitação, pela temperatura, pelo tipo e quantidade de agente dispersante e pela viscosidade, como referido anteriormente (Uchechi et al., 2014).

O aumento dos parâmetros estudados pode estar relacionado com o risco de agregação que as SLN apresentam. Durante o armazenamento, partículas isoladas podem-se difundir na dispersão e colidir, provocando a agregação das partículas. Esta instabilidade pode ocorrer devido ao tipo e quantidade de tensioativo utilizado. Assim, uma possível solução passaria por alterar o tipo de tensioativo utilizado, que neste estudo foi o *Tween*® 80, ou aumentar a sua concentração (Azar, Pezeshki, Ghanbarzadeh, Hamishehkar, & Mohammadi, 2020; Müller et al., 2002; D. Patel et al., 2015).

Capítulo IV. Conclusão

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver formulações semissólidas e nanoformulações contendo fitoquímicos com propriedades antienvelhecimento, nomeadamente o AG e o ADA, e estudar a estabilidade das formulações durante um determinado período de armazenamento.

Para tal, foi necessário proceder à escolha das formulações semissólidas e das nanopartículas para veicular as substâncias em estudo. No caso das formulações semissólidas, a escolha centrou-se principalmente nas propriedades físico-químicas das substâncias, como o coeficiente de partição e a solubilidade em água. Assim, a formulação desenvolvida para o AG foi um hidrogel, devido às suas propriedades maioritariamente hidrofílicas, e para o ADA foi um creme do tipo O/A, devido às suas propriedades lipofílicas. No caso das nanoformulações, as nanopartículas escolhidas foram as lipídicas, mais concretamente as SLN, pela sua biocompatibilidade e pelas características vantajosas que apresentam para a administração tópica.

Acerca dos resultados obtidos, o hidrogel com AG apresentou problemas de estabilidade durante a produção e armazenamento, associados à oxidação do AG e observados através da alteração da cor do gel. Enquanto, as formulações de SLN com AG não apresentaram alterações de coloração. Deste modo, é possível concluir que a incorporação do AG em SLN pode contribuir para o aumento da sua estabilidade, ao diminuir o risco de oxidação. Os valores de pH e viscosidade obtidos no hidrogel com AG foram adequados para a sua aplicação na pele e o mesmo se verificou para os valores de pH das SLN com AG. No entanto, os valores de viscosidade e de D_h obtidos não foram os ideais para aplicação na pele. A reduzida viscosidade das SLN pode diminuir o tempo de permanência da formulação na pele e o diâmetro elevado das partículas pode dificultar a permeação ao longo do EC.

Em relação ao creme e às SLN com ADA, conclui-se que estas formulações mantiveram a sua estabilidade ao longo do tempo estudado. Os valores de pH e viscosidade do creme corresponderam ao pretendido para a aplicação na pele. Porém, os valores de pH das formulações contendo SLN ficaram aquém do pretendido para utilização na pele. Os valores de viscosidade foram baixos, tal como observado nas SLN com AG.

Assim, no futuro seria interessante otimizar as formulações desenvolvidas, sobretudo no que diz respeito à estabilidade do AG e ao tamanho das nanopartículas. Seria também pertinente estudar a eficiência de encapsulação dos compostos nas SLN e a incorporação destas em formulações semissólidas. Por último, seria importante efetuar estudos de biocompatibilidade cutânea, bem como estudos de permeação, para determinar o perfil cinético da permeação dos compostos na pele.

Capítulo V. Referências Bibliográficas

- Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Liceaga, A. M. (2019). Potential role of natural bioactive peptides for development of cosmeceutical skin products. *Peptides*, 122, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170170>
- Ahsanuddin, S., Lam, M., & Baron, E. D. (2016). Aging and oxidative stress. *AIMS Molecular Science*, 3(2), 187–195. <https://doi.org/10.3934/molsci.2016.2.187>
- Aiyalu, R., Govindarjan, A., & Ramasamy, A. (2016). Formulation and evaluation of topical herbal gel for the treatment of arthritis in animal model. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(3), 493–507. <https://doi.org/10.1590/s1984-82502016000300015>
- Ali, S. M., & Yosipovitch, G. (2013). Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. *Acta Dermato-Venereologica*, 93, 261–267. <https://doi.org/10.2340/00015555-1531>
- Alonso, C., Martí, M., Barba, C., Lis, M., Rubio, L., & Coderch, L. (2016). Skin penetration and antioxidant effect of cosmeo-textiles with gallic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 156, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.01.014>
- Alves, A. C., Ramos, R. M., & Prista, L. V. N. (1990). *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica II* (3rd ed.; Fundação Calouste Gulbenkian, Ed.). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- American Cancer Society. (2019). Ultraviolet (UV) Radiation. Retrieved August 31, 2021, from Cancer A-Z website: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/radiation-exposure/uv-radiation.html>
- Andonova, V., & Peneva, P. (2017). Characterization Methods for Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC). *Current Pharmaceutical Design*, 23(43), 6630–6642. <https://doi.org/10.2174/1381612823666171115105721>
- Avram, A. S., Avram, M. M., & James, W. D. (2005). Subcutaneous fat in normal and diseased states. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(4), 671–683. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.05.015>
- Ayer, J., & Griffiths, C. E. M. (2019). Photoaging in Caucasians. In R. E. B. Watson & C. E. M. Griffiths (Eds.), *Cutaneous Photoaging* (pp. 1–30). European Society for Photobiology.
- Azar, F. A. N., Pezeshki, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., & Mohammadi, M. (2020). Nanostructured lipid carriers: Promising delivery systems for encapsulation of food ingredients. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100084>
- Babu, P. G. K., Vital, M., Nirupama, K., Devi, M. G., & Devi, P. U. (2017). Semisolid Dosage Forms. In *Indian Research Journal of Pharmacy and Science*.
- Badhani, B., Sharma, N., & Kakkar, R. (2015). Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Advances*, 5(35), 27540–27557. <https://doi.org/10.1039/c5ra01911g>
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30(3), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>
- Basavaraj, K. H. (2012). Nanotechnology in Medicine and Relevance to Dermatology: Present Concepts. *Indian Journal of Dermatology*, 57(3), 169–174. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.96186>
- Baumann, L. (2007). Skin ageing and its treatment. *Journal of Pathology*, 211(2), 241–251.

<https://doi.org/10.1002/path.2098>

- Beloqui, A., Solinís, M. Á., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A. J., & Prétat, V. (2016). Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(1), 143–161. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>
- Benson, H. A. E. (2012). Skin Structure, Function, and Permeation. In H. A. E. Benson & A. C. Watkinson (Eds.), *Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118140505>
- Berker, D. (2013a). Nail anatomy. *Clinics in Dermatology*, 31(5), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.06.006>
- Berker, D. (2013b). Nails and hair. *Medicine*, 41(7), 382–386. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.04.009>
- Bernardo, A. L. F. (2018). *Alterações Pigmentares no Fotoenvelhecimento Cutâneo*. Universidade de Coimbra.
- Bharkatiya, M., & Nema, R. (2009). Skin penetration enhancement techniques. *Journal of Young Pharmacists*, 1(2), 110–115. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.55741>
- Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B. P., Duraivel, S., & Kumar, K. P. S. (2012). Recent Advances In Novel Topical Drug Delivery System. *The Pharma Innovation*, 1(9), 12–31.
- Biga, L. M., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., Kemaster, M., ... Runyeon, J. (2017). Anatomy & Physiology. In *OpenStax Anatomy & Physiology*. Oregon State University. <https://doi.org/10.5399/osu/1116>
- Binder, L., Mazál, J., Petz, R., Klang, V., & Valenta, C. (2019). The role of viscosity on skin penetration from cellulose ether-based hydrogels. *Skin Research and Technology*, 25(5), 725–734. <https://doi.org/10.1111/srt.12709>
- Bolla, P. K., Clark, B. A., Juluri, A., Cheruvu, H. S., & Renukuntla, J. (2020). Evaluation of formulation parameters on permeation of ibuprofen from topical formulations using Strat-M® membrane. *Pharmaceutics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020151>
- Bonifácio, B. V., da Silva, P. B., Aparecido dos Santos Ramos, M., Maria Silveira Negri, K., Maria Bauab, T., & Chorilli, M. (2013). Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: A review. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.2147/IJN.S52634>
- Bora, A., Deshmukh, S., & Swain, K. (2014). Recent Advances in Semisolid Dosage Form. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(9), 3596–3609. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(9\).3596-09](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(9).3596-09)
- Bosch, R., Philips, N., Suárez-Pérez, J. A., Juarranz, A., Devmurari, A., Chalensouk-Khaosaat, J., & González, S. (2015). Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals. *Antioxidants*, 4(2), 248–268. <https://doi.org/10.3390/antiox4020248>
- Bosset, S., Bonnet-Duquennoy, M., Barré, P., Chalon, A., Kurfurst, R., Bonté, F., ... Fnicolas, J. (2003). Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities. *British Journal of Dermatology*, 149(4), 826–835. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05456.x>
- Brown, T. M., & Krishnamurthy, K. (2020). Histology, Dermis. Retrieved March 23, 2021, from StatPearls website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/#article->

20394.s1

- Buckingham, E. M., & Klingelutz, A. J. (2011). The role of telomeres in the ageing of human skin. *Experimental Dermatology*, 20(4), 297–302. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01242.x>. The
- Chang, R.-K., Raw, A., Lionberger, R., & Yu, L. (2013). Generic development of topical dermatologic products: Formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products. *The AAPS Journal*, 15(1), 41–52. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9411-0>
- Chen, C. C., Tsai, T. H., Huang, Z. R., & Fang, J. Y. (2010). Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(3), 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.12.008>
- Chen, Y., Lee, J. H., Meng, M., Cui, N., Dai, C. Y., Jia, Q., ... Jiang, H. B. (2021). An overview on thermosensitive oral gel based on poloxamer 407. *Materials*, 14(4522), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ma14164522>
- Clares, B., Calpena, A. C., Parra, A., Abrego, G., Alvarado, H., Fanguero, J. F., & Souto, E. B. (2014). Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: effect on skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 473(1–2), 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.001>
- Corrêa, R. C. G., Peralta, R. M., Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Bracht, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). New phytochemicals as potential human anti-aging compounds: Reality, promise, and challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(6), 942–957. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1233860>
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., ... Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Deltreggia, D. C., Silva, S. V., Oliveira, H. C., Salomão, P. A. V., Boff, S. R., Ferreira, K., & Rebelo, M. D. A. (2019). A Nanotecnologia como estratégia para permeação cutânea de fármacos. *Revista Saúde Em Foco*, 11, 812–824.
- Dogan, T. (2008). *The effects of hydrogen peroxide, gallic acid and resveratrol on growth and catalase production of Aspergillus fumigatus*. (Middle East Technical University). Middle East Technical University. <https://doi.org/10.13140/2.1.3495.7441>
- Draelos, Z. (2016). *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures* (2nd ed.). Chichester: WILEY Blackwell. <https://doi.org/10.1001/jama.1926.02670370006003>
- Eslami, A. C., Pasanphan, W., Wagner, B. A., & Buettner, G. R. (2010). Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study. *Chemistry Central Journal*, 4(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-4-15>
- Fakhry, K. R., & Hassan, K. A. M. (2013). Formulation and evaluation of diphenhydramine HCL release from different semi solid bases (cream, gel, and ointment). *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2(5), 1–5.

- Fang, C.-L., A. Al-Suwayeh, S., & Fang, J.-Y. (2012). Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Drug Delivery and Targeting. *Recent Patents on Nanotechnology*, 7(1), 41–55. <https://doi.org/10.2174/18722105130105>
- Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2013). Characteristics of the Aging Skin. *Advances in Wound Care*, 2(1), 5–10. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0356>
- Farage, M. A., Miller, K. W., & Maibach, H. I. (2010). *Textbook of Aging Skin* (1st ed.; T. Kemme & S. Fabiani, Eds.). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Farage, M., Miller, K., Elsner, P., & Maibach, H. (2008). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review. *International Journal of Cosmetic Science*, 30(2), 87–95. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2007.00415.x>
- Fireman, S., Toledano, O., Neimann, K., Loboda, N., & Dayan, N. (2011). A look at emerging delivery systems for topical drug products. *Dermatologic Therapy*, 24(5), 477–488. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2012.01464.x>
- Fitzpatrick, L. R., & Woldemariam, T. (2017). Small-Molecule Drugs for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III* (Vol. 5). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12404-7>
- Fussell, J. C., & Kelly, F. J. (2020). Oxidative contribution of air pollution to extrinsic skin ageing. *Free Radical Biology and Medicine*, 151(December 2019), 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.038>
- G. Kakadia, P., & R. Conway, B. (2014). Solid Lipid Nanoparticles: A Potential Approach for Dermal Drug Delivery. *American Journal of Pharmacological Sciences*, 2(5A), 1–7. <https://doi.org/10.12691/ajps-2-5a-1>
- Gad, S. C. (2008). Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes. In *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. <https://doi.org/10.1002/9780470259818>
- Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2012). Skin anti-aging strategies. *Dermato-Endocrinology*, 4(3). <https://doi.org/10.4161/derm.22804>
- Garg, T., Rath, G., & Goyal, A. K. (2015). Comprehensive review on additives of topical dosage forms for drug delivery. *Drug Delivery*, 22(8), 969–987. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.879355>
- Gasperi, E. N. (2015). Matérias-primas usadas na elaboração dos cosméticos, formas cosméticas. In *Cosmetologia I*. Indaial: Uniasselvi.
- Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Samani, S. (2018). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: Applications, advantages and disadvantages. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 288–303. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.235156>
- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. In *Nanoscience in Dermatology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
- Gilchrest, B. A., & Krutmann, J. (2006). *Skin aging* (M. P. Heidelberg, Ed.). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00105-003-0610-6>
- Goldberg, I., & Stefan Rokem, J. (2019). Organic and fatty acid production, microbial. *Encyclopedia of Microbiology*, 358–382. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13083-3>

- Graham, H. K., Eckersley, A., Ozols, M., Mellody, K. T., & Sherratt, M. J. (2019). Human Skin: Composition , Structure and Visualisation Methods. *Skin Biophysics, Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials*, 22, 1–18. https://doi.org/10.1007/978-3-030-13279-8_1
- Gu, Y., Han, J., Jiang, C., & Zhang, Y. (2020). Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing Research Reviews*, 59, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101036>
- Guimarães, K. L., & Ré, M. I. (2011). Lipid Nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (NLC). In R. Beck, S. Guterres, & A. Pohlmann (Eds.), *Nanocosmetics and Nanomedicines New Approaches for Skin Care* (pp. 101–122). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Guo, D., Dou, D., Li, X., Zhang, Q., Bhutto, Z. A., & Wang, L. (2018). Ivermectin-loaded solid lipid nanoparticles: preparation, characterisation, stability and transdermal behaviour. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(2), 255–262. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1307207>
- Gupta, N., Dubey, A., Prasad, P., & Roy, A. (2015). Formulation and Evaluation of Herbal Fairness Cream Comprising Hydroalcoholic Extracts of *Pleurotus ostreatus*, *Glycyrrhiza glabra* and *Camellia sinensis*. *Pharmaceutical and Biosciences Journal*, 3(3), 40–45. <https://doi.org/10.20510/ukjpb/3/i3/89410>
- Gupta, S., Kesarla, R., & Omri, A. (2013). Formulation Strategies to Improve the Bioavailability of Poorly Absorbed Drugs with Special Emphasis on Self-Emulsifying Systems. *ISRN Pharmaceutics*, 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/848043>
- Haake, A., Scott, G. A., & Holbrook, K. A. (2001). Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. In R. K. Freinkel & D. T. Woodley (Eds.), *The Biology of the Skin* (p. 432). The Parthenon Publishing Group.
- Haider, M., Abdin, S. M., Kamal, L., & Orive, G. (2020). Nanostructured lipid carriers for delivery of chemotherapeutics: A review. *Pharmaceutics*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030288>
- Han, A., Chien, A. L., & Kang, S. (2014). Photoaging. *Dermatologic Clinics*, 32(3), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.det.2014.03.015>
- Hegde, S., & Raghavan, S. (2013). A skin-depth analysis of integrins: Role of the integrin network in health and disease. *Cell Communication and Adhesion*, 20(6), 155–169. <https://doi.org/10.3109/15419061.2013.854334>
- Helfrich, Y. R., Sachs, D. L., & Voorhees, J. J. (2008). Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology Nursing / Dermatology Nurses' Association*, 20(3), 177–184.
- Hirt, P. A., & Paus, R. (2019). Healthy Hair (Anatomy, Biology, Morphogenesis, Cycling, and Function). In *Alopecia* (Vol. 20). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-54825-0.00001-6>
- Huang, L., Huang, R., Pang, F., Li, A., Huang, G., Zhou, X., ... Ma, X. (2020). Synthesis and biological evaluation of dehydroabiestic acid-pyrimidine hybrids as antitumor agents. *RSC Advances*, 10(31), 18008–18015. <https://doi.org/10.1039/d0ra02432e>
- Hwa, C., Bauer, E. A., & Cohen, D. E. (2011). Skin Biology. *Dermatologic Therapy*, 24, 464–470. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5739.56-b>
- Hwang, E., Park, S. Y., Lee, H. J., Lee, T. Y., Sun, Z. W., & Yi, T. H. (2014). Gallic acid regulates skin photoaging in UVB-exposed fibroblast and hairless mice. *Phytotherapy*

- Research*, 28(12), 1778–1788. <https://doi.org/10.1002/ptr.5198>
- Hwang, K.-A., Yi, B.-R., & Choi, K.-C. (2011). Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations. *Laboratory Animal Research*, 27(1), 1. <https://doi.org/10.5625/lar.2011.27.1.1>
- Imokawa, G., & Ishida, K. (2014). Inhibitors of intracellular signaling pathways that lead to stimulated epidermal pigmentation: Perspective of anti-pigmenting agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8293–8315. <https://doi.org/10.3390/ijms15058293>
- Isaac, V. L. ., Cefali, L. ., Chiari, B. G., Oliveira, C. C. L. G., Salgado, H. R. N., & Corrêa, M. . (2008). Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 29(1), 81–96.
- Ishikawa, N., Nakamura, K. I., Izumiyama-Shimomura, N., Aida, J., Matsuda, Y., Arai, T., & Takubo, K. (2016). Changes of telomere status with aging: An update. *Geriatrics and Gerontology International*, 16, 30–42. <https://doi.org/10.1111/ggi.12772>
- Islam, M. T., Rodríguez-Hornedo, N., Ciotti, S., & Ackermann, C. (2004). Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different pH. *Pharmaceutical Research*, 21(7), 1192–1199. <https://doi.org/10.1023/B>
- Jain, S. K., & Jain, N. K. (2010). Multiparticulate carriers for sun-screening agents. *International Journal of Cosmetic Science*, 32(2), 89–98. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00547.x>
- Jankowski, A., Dyja, R., & Sarecka-Hujar, B. (2017). Dermal and Transdermal Delivery of Active Substances from Semisolid Bases. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79(4), 488–500. Retrieved from <https://www.ijpsonline.com/articles/dermal-and-transdermal-delivery-of-active-substances-from-semisolid-bases-3353.html>
- Jose, J. (2018). Role of solid lipid nanoparticles as photoprotective agents in cosmetics. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 1–7. <https://doi.org/10.1111/jocd.12504>
- Kamaya, Y., Tokita, N., & Suzuki, K. (2005). Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(1), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.07.007>
- Kammeyer, A., & Luiten, R. M. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews*, 21, 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.01.001>
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, 12(4), 390–401.
- Kashif, M., Akhtar, N., & Mustafa, R. (2017). An overview of dermatological and cosmeceutical benefits of diospyros kaki and its phytoconstituents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(5), 650–662. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.06.004>
- Khalil, R. M., El-Bary, A. A., Kassem, M. A., Ghorab, M. M., & Basha, M. (2013). Influence of Formulation parameters on the physicochemical properties of Meloxicam-loaded solid lipid nanoparticles. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 12, 63–72. <https://doi.org/10.7123/01.EPJ.0000428643.74323.d9>
- Khan, B. A., Mahmood, T., Menaa, F., Shahzad, Y., Yousaf, A. M., Hussain, T., & Ray, S. D. (2018). New Perspectives on the Efficacy of Gallic Acid in Cosmetics & Nanocosmeceuticals. *Current Pharmaceutical Design*, 24(43). <https://doi.org/10.2174/1381612825666190118150614>
- Khezri, K., Saeedi, M., & Maleki Dizaj, S. (2018). Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations. *Biomedicine and*

- Pharmacotherapy*, 106, 1499–1505. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.084>
- Khosa, A., Reddi, S., & Saha, R. N. (2018). Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 103, 598–613. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.055>
- Kim, B., Cho, H.-E., Moon, S. H., Ahn, H.-J., Bae, S., Cho, H.-D., & An, S. (2020). Transdermal delivery systems in cosmetics. *Biomedical Dermatology*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s41702-020-0058-7>
- Kim, E., Kang, Y.-G., Kim, Y.-J., Lee, T. R., Yoo, B. C., Jo, M., ... Cho, J. Y. (2019). Dehydroabietic acid suppresses inflammatory response via suppression of Src-, Syk-, and TAK1-mediated pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071593>
- Kim, J., Kang, Y.-G., Lee, J., Choi, D., Cho, Y., Shin, J.-M., ... No, K. T. (2015). The natural phytochemical dehydroabietic acid is an anti-aging reagent that mediates the direct activation of SIRT1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 412, 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.006>
- Kim, M., & Park, H. J. (2016). Molecular Mechanisms of Skin Aging and Rejuvenation. In N. Shiomi (Ed.), *IntechOpen*. IntechOpen.
- Kobiela, K., Kandyba, E., & Leung, Y. (2015). Skin and Skin Appendage Regeneration. In *Translational Regenerative Medicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410396-2.00022-0>
- Kolarsick, P. A. J., & Kolarsick, M. A. (2011). Anatomy and physiology of the skin. *Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203–213. <https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>
- Kosmadaki, M. G., & Gilchrest, B. A. (2004). The role of telomeres in skin aging/photoaging. *Micron*, 35(3), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.11.002>
- Krutmann, J., Schikowski, T., Morita, A., & Berneburg, M. (2021). Environmentally-Induced (Extrinsic) Skin Aging: Exposomal Factors and Underlying Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 141(4), 1096–1103. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.12.011>
- Kumar, K. J. S., Vani, M. G., Wang, S. Y., Liao, J. W., Hsu, L. S., Yang, H. L., & Hseu, Y. C. (2013). In vitro and in vivo studies disclosed the depigmenting effects of gallic acid: A novel skin lightening agent for hyperpigmentary skin diseases. *BioFactors*, 39(3), 259–270. <https://doi.org/10.1002/biof.1064>
- Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2017). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, 45(6), 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.03.004>
- Landau, M. (2007). Exogenous factors in skin aging. *Current Problems in Dermatology*, 35, 1–13. <https://doi.org/10.1159/0000106405>
- Langton, A. K., Sherratt, M. J., Griffiths, C. E. M., & Watson, R. E. B. (2010). A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing. 330–339. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00574.x>
- Lee, S. H., Lee, J. H., Lee, H. Y., & Min, K. J. (2019). Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB Reports*, 52(1), 24–34. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.1.290>
- Leonida, M. D., & Kumar, I. (2016). *Biomaterials for Skin Regeneration*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Li, J., & Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature*

- Reviews Materials*, 1(12). <https://doi.org/10.1097/IOP.0b013e31819ac7c5>
- Lohani, A., Verma, A., Joshi, H., Yadav, N., & Karki, N. (2018). *Nanotechnology-Based Cosmeceuticals*. 2014.
- Lorencini, M., Brohem, C. A., Dieamant, G. C., Zanchin, N. I. T., & Maibach, H. I. (2014). Active ingredients against human epidermal aging. *Ageing Research Reviews*, 15(1), 100–115. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.03.002>
- Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 25(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001>
- Lubrizol. (2008). Flow and Suspension Properties. *Pharmaceutical Bulletin*, 7, 1–14. Retrieved from <https://www.lubrizol.com/-/media/Lubrizol/Health/Literature/Bulletin-07---Flow-and-Suspension-Properties.pdf>
- Luong, J. H. T., Rigby, T., Male, K. B., & Bouvrette, P. (1999). Separation of resin acids using cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 20(7), 1546–1554. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990601\)20:7<1546::AID-ELPS1546>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990601)20:7<1546::AID-ELPS1546>3.0.CO;2-B)
- Madhusudhan, S., Gowda, D. V., & Gupta, N. V. (2020). An overview on topical drug delivery system – Updated review. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 368–385. <https://doi.org/https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i1.1831>
- Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2011). *Molecular Mechanisms of Skin Aging State of the Art*. (June). <https://doi.org/10.1196/annals.1404.027>
- Maphosa, Y., & Jideani, V. A. (2018). Factors Affecting the Stability of Emulsions Stabilised by Biopolymers. *Science and Technology Behind Nanoemulsions*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75308>
- Marks, J. G., & Miller, J. J. (2019). Structure and function of the skin. In *Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology* (6th ed., pp. 2–10). Elsevier Inc. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2015-0-00881-4>
- Maru, A. D., & Lahoti, S. R. (2018). Formulation and Evaluation of Moisturizing Cream Containing Sunflower Wax. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10(11), 54. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2018v10i11.28645>
- Mayba, J. N., & Gooderham, M. J. (2018). A guide to topical vehicle formulations. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 22(2), 207–212. <https://doi.org/10.1177/1203475417743234>
- McGrath, J. A., Eady, R. A. J., & Pope, F. M. (2004). Anatomy and Organization of Human Skin. In T. Burns, S. Breathnach, N. Cox, & C. Griffiths (Eds.), *Rook's Textbook of Dermatology* (7th ed.). Blackwell Science.
- McLafferty, E., Hendry, C., & Alistair, F. (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard (Royal College of Nursing (Great Britain))*, 27(3), 35–42. <https://doi.org/10.7748/ns2012.09.27.3.35.c9299>
- Mehnert, W., & Mader, K. (2001). Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 165–196. <https://doi.org/10.7551/mitpress/4945.003.0031>
- Melo, C. A. de S., Domingues, R. J. de S., & Lima, A. B. de. (2018). *Elaboração de Géis e Análise de Estabilidade de Medicamentos*.

- Menon, G. K., Cleary, G. W., & Lane, M. E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, 435(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.005>
- Mesa-Arango, A. C., Flórez-Muñoz, S. V., & Sanclemente, G. (2017). Mechanisms of skin aging. *Iatreia*, 30(2), 160–170. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v30n2a05>
- Milan, A. L. K., Milão, D., Souto, A. A., & Corte, T. W. F. (2007). Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(4), 649–657. <https://doi.org/10.1590/s1516-93322007000400019>
- Mitani, K., Fujioka, M., Uchida, A., & Kataoka, H. (2007). Analysis of abietic acid and dehydroabietic acid in food samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1146(1), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.118>
- Monteiro-Riviere, N. A. (2010). Structure and function of skin. *Toxicology of the Skin*, (January 2006), 1–18. https://doi.org/10.5005/jp/books/11954_1
- Morabito, K., Shapley, N. C., Steeley, K. G., & Tripathi, A. (2011). Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection. *International Journal of Cosmetic Science*, 33(5), 385–390. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00654.x>
- Morita, A. (2007). Tobacco smoke causes premature skin aging. *Journal of Dermatological Science*, 48(3), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.06.015>
- Mudshinge, S. R., Deore, A. B., Patil, S., & Bhalgat, C. M. (2011). Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 19(3), 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.04.001>
- Müller, R. H., Petersen, R. D., Hommoss, A., & Pardeike, J. (2007). Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), 522–530. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.012>
- Müller, R. H., Radtke, M., & Wissing, S. A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), 131–155. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00118-7)
- N'Da, D. D. (2014). Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs. *Molecules*, 19(12), 20780–20807. <https://doi.org/10.3390/molecules191220780>
- Nafisi, S., & Maibach, H. I. (2018). Skin penetration of nanoparticles. In *Emerging Nanotechnologies in Immunology: The Design, Applications and Toxicology of Nanopharmaceuticals and Nanovaccines*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40016-9.00003-8>
- Naidoo, K., & Birch-Machin, M. A. (2017). Oxidative stress and ageing: The influence of environmental pollution, sunlight and diet on skin. *Cosmetics*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/cosmetics4010004>
- Nair, A., Jacob, S., Al-Dhubiab, B., Attimarad, M., & Harsha, S. (2013). Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3), 423–434. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000300004>
- Naseri, N., Valizadeh, H., & Zakeri-Milani, P. (2015). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. *Advanced*

- Pharmaceutical Bulletin*, 5(3), 305–313. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.043>
- National Center for Biotechnology Information. (2004). Gallic acid. Retrieved March 20, 2021, from PubChem Compound Summary for CID 370 website: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-acid>
- National Center for Biotechnology Information. (2005). Dehydroabietic acid. Retrieved March 14, 2021, from PubChem Compound Summary for CID 94391 website: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dehydroabietate>
- Neto, I., Domínguez-Martín, E. M., Ntungwe, E., Reis, C. P., Pesic, M., Faustino, C., & Rijo, P. (2021). Dehydroabietic acid microencapsulation potential as biofilm-mediated infections treatment. *Pharmaceutics*, 13(6), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060825>
- Ng, K. W., & Lau, W. M. (2015). Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement* (pp. 3–11). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45013-0_1
- Nigam, Y., & Knight, J. (2017). Anatomy and physiology of ageing 11: the skin. *Nursing Times*, 113(12), 51–55. Retrieved from <https://www.nursingtimes.net/roles/older-people-nurses-roles/anatomy-and-physiology-of-ageing-11-the-skin-27-11-2017/>
- Nikam, S., Chavan, M., & Sharma, P. (2014). Solid Lipid Nanoparticles: A Lipid Based Drug Delivery. *Innovations in Pharmaceuticals and Pharmacotherapy*, 2(3), 365–376. Retrieved from www.innpharmacotherapy.com
- Nikolić, S., Keck, C. M., Anselmi, C., & Müller, R. H. (2011). Skin photoprotection improvement: Synergistic interaction between lipid nanoparticles and organic UV filters. *International Journal of Pharmaceutics*, 414(1–2), 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.010>
- Pant, A. F., Özkasikci, D., Fürtauer, S., & Reinelt, M. (2019). The Effect of Deprotonation on the Reaction Kinetics of an Oxygen Scavenger Based on Gallic Acid. *Frontiers in Chemistry*, 7(680), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00680>
- Pardeike, J., Hommoss, A., & Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366, 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>
- Park, N. H., Kang, Y. G., Kim, S. H., Bae, I. H., Lee, S. H., Kim, D. Y., ... Lee, E. S. (2019). Dehydroabietic Acid Induces Regeneration of Collagen Fibers in Ultraviolet B-Irradiated Human Dermal Fibroblasts and Skin Equivalents. *Skin Pharmacology and Physiology*, 32(2), 109–115. <https://doi.org/10.1159/000497103>
- Patel, D. K., Tripathy, S., Nair, S. K., & Kesharwani, R. (2013). Nanostructured lipid carrier (NLC) a modern approach for topical delivery: a review. *World J Pharm Pharma Sci*, 2(3), 921–938.
- Patel, D., Kumar, V., Kesharwani, R., & Mazumdar, B. (2015). *Lipid Nanoparticle a Novel Carrier for Cosmetics and Topical Preparation: A Review*. 2015(3), 1–6.
- Peng, G., & Roberts, J. C. (2000). Solubility and toxicity of resin acids. *Water Research*, 34(10), 2779–2785. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00406-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00406-6)
- Perrie, Y., & Rades, T. (2009). Controlling Drug Delivery. In *Pharmaceutics: Drug Delivery and Targeting* (2nd ed.). London: Pharmaceutical Press.
- Phillips, T. J., Demircay, Z., & Sahu, M. (2001). Hormonal effects on skin aging. *Clinics in*

- Geriatric Medicine*, 17(4), 661–672. [https://doi.org/10.1016/S0749-0690\(05\)70092-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0690(05)70092-6)
- Pinto, J. R., Oliveira, N. M. de, & Tescarollo, I. L. (2020). Compatibilidade física de embalagem utilizada para creme de ureia. *Revista Ensaios Pioneiros*, 3(1), 17–27. <https://doi.org/10.24933/rep.v3i1.188>
- Poon, F., Kang, S., & Chien, A. L. (2015). Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, 31(2), 65–74. <https://doi.org/10.1111/phpp.12145>
- Pouillot, A., Dayan, N., Polla, A. S., Polla, L. L., & Polla, B. S. (2008). The stratum corneum: a double paradox. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 1, 143–148.
- Prista, L. V. N., Alves, A. C., Morgado, R. M. R., & Lobo, J. M. S. (2003). *Tecnologia Farmacêutica I* (6th ed.; F. C. Gulbenkian, Ed.). Fundação Calouste Gulbenkian.
- Puizina-Ivić, N., Mirić, L., Čarija, A., Karlica, D., & Marasović, D. (2010). Modern approach to topical treatment of aging skin. *Collegium Antropologicum*, 34(3), 1145–1153.
- Puizina-Ivić, N. (2008). Skin aging. *Acta Dermotovenerol Apa*, 17(2), 47–54. <https://doi.org/10.1007/s00105-003-0610-6>
- Rabe, J. H., Mamelak, A. J., McElgunn, P. J. S., Morison, W. L., & Sauder, D. N. (2006). Photoaging: Mechanisms and repair. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 55(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.05.010>
- Rahimifard, M., Baeeri, M., Bahadar, H., Moini-nodeh, S., Khalid, M., Haghi-aminjan, H., ... Abdollahi, M. (2020). Therapeutic Effects of Gallic Acid in Regulating Senescence and Diabetes; an In Vitro Study. *Molecules*, 25(5875), 15. <https://doi.org/10.3390/molecules25245875>
- Rahvar, M., Maibach, H. I., & Maibach, H. I. (2013). Smoking and Premature Skin Aging. *Cosmetics & Toiletries*, 128(7), 466–469.
- Rangsansarid, J., & Fukada, K. (2007). Factors affecting the stability of O/W emulsion in BSA solution: Stabilization by electrically neutral protein at high ionic strength. *Journal of Colloid and Interface Science*, 316(2), 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.07.040>
- Rebola, A. C. A. (2015). *Determinação do teor do ácido desidroabiético em colofónias e seus derivados – relação entre o teor do ácido desidroabiético e as propriedades reológicas dos produtos*. Instituto Superior de Engenharia de Coimbra.
- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M. K., Trost, A., & Richter, K. (2015). Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), 545–589. <https://doi.org/10.3390/biom5020545>
- Robert, L., Robert, A., & Renard, G. (2010). Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging. *Pathologie Biologie*, 58(3), 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.09.010>
- Rosário, M. S., Gauto, M. I. R., Silva, A. C. L. N., Sales, J. S., Pereira, F. dos S., Santos, E. P., ... Costa, M. C. P. (2021). Estudo de estabilidade de emulsão cosmética com potencial de creme hidratante para o tratamento da xerose cutânea utilizando o óleo de babaçu (*Orbignya phalerata martius*). *Brazilian Journal of Development*, 7(3), 29552–29570. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-596>
- Rosas, E. C., Correa, L. B., & Graças Henriques, M. das. (2019). Antiinflammatory Properties of *Schinus terebinthifolius* and Its Use in Arthritic Conditions. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, 489–505. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813820-5.00028-3>

- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2012). *Histologia: texto e atlas. Em correlação com biologia celular e molecular* (6th ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Owen, S. C. (2006). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (5th ed.). London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. <https://doi.org/10.1007/978-1-908517-43-2>
- Royal Society of Chemistry. (2021). Gallic Acid. Retrieved March 20, 2021, from ChemSpider website: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.361.html>
- Sakalauskas, A., Ziaunys, M., & Smirnovas, V. (2020). Gallic acid oxidation products alter the formation pathway of insulin amyloid fibrils. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70982-3>
- Salvioni, L., Morelli, L., Ochoa, E., Labra, M., Fiandra, L., Palugan, L., ... Colombo, M. (2021). The emerging role of nanotechnology in skincare. *Advances in Colloid and Interface Science*, 293, 102437. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102437>
- Santos, A. C., Morais, F., Simões, A., Pereira, I., Sequeira, J. A. D., Pereira-Silva, M., ... Ribeiro, A. (2019). Nanotechnology for the development of new cosmetic formulations. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16(4), 313–330. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1585426>
- Santos, B. (2020). Desenvolvimento de uma formulação cosmética de gel anti-idade com extratos de plantas espontâneos e cultivares de *Humulus lupulus* L. *Universidade D Slamanga - Dissertação*, 1–93.
- Sator, P. G., Schmidt, J. B., Rabe, T., & Zouboulis, C. C. (2004). Skin aging and sex hormones in women - Clinical perspectives for intervention by hormone replacement therapy. *Experimental Dermatology, Supplement*, 13(4), 36–40. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2004.00259.x>
- Schwinn, D. A., & Jackson, L. M. (2020). Compounded Topical Pain Creams. In D. A. Schwinn & L. M. Jackson (Eds.), *Compounded Topical Pain Creams*. Washington, D.C.: National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25689>
- Seeley, R. R., Stephens, T. D., & Tate, P. (2008). *Anatomia e Fisiologia* (8ª). Lisboa: LUSOCIÊNCIA - Edições Técnicas e Científicas, Lda.
- Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I. (2014). Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential. *Journal of Physical Science*, 25(1), 59–75.
- Shen, W., Wang, Z., Punyanita, M., Lei, J., Sinav, A., Kral, J. G., ... Heymsfield, S. B. (2003). Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification. *Obesity Research*, 11(1), 5–16. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.3>
- Shetty, S., & Gokul, S. (2012). Keratinization and its disorders. *Oman Medical Journal*, 27(5), 348–357. <https://doi.org/10.5001/omj.2012.90>
- Shibahara, S. (2001). Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): Multiplicity in structure, function, and regulation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 6(1), 99–104. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00010.x>
- Shin, J. W., Kwon, S. H., Choi, J. Y., Na, J. I., Huh, C. H., Choi, H. R., & Park, K. C. (2019). Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092126>
- Silva, A., Amaral, M., Lobo, J., & Lopes, C. (2015). Lipid Nanoparticles for the Delivery of Biopharmaceuticals. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16(4), 291–302.

<https://doi.org/10.2174/1389201015666141229103709>

- Silva, A. P., Silva, E. dos A., & Hernandez-Blazquez, F. J. (2008). Processo de Queratinização no Desenvolvimento do Sistema Tegumentar em Mamíferos - Revisão. *Saúde e Pesquisa*, 1(2), 201–207.
- Silva, J. A., Apolinário, A. C., Souza, M. S. R., Damasceno, B. P. G. L., & Medeiros, A. C. D. (2010). Administração cutânea de fármacos: Desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*, 31(3).
- Silva, S., Leonardi, G. R., & Michniak-kohn, B. (2017). An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 92(3), 367–374. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175481>
- Singh, D., Mital, N., & Kaur, G. (2016). Topical drug delivery systems: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(2), 213–228. <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1131267>
- Singh, S. K., Nagpal, K., & Saini, S. (2014). Semisolid Dosage Forms. In A. K. Dash, S. Singh, & J. Tolman (Eds.), *Pharmaceutics: Basic Principles and Application to Pharmacy Practice* (pp. 241–270). Waltham: Elsevier Inc.
- Sjerobabski-Masneć, I., & Situm, M. (2010). Skin Aging. *Acta Clinica Croatica*, 49, 515–519. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00043-4>
- Souto, E. B., & Müller, R. H. (2008). Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN[®], NLC[®]). *International Journal of Cosmetic Science*, 30(3), 157–165. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00433.x>
- Souto, E.B., Wissing, S. A., Barbosa, C. M., & Mu, R. H. (2004). *Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations*. 58, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.02.015>
- Souto, Eliana B., & Müller, R. H. (2007). Lipid Nanoparticles (Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers) for Cosmetic, Dermal, and Transdermal Applications. In D. Thassu, M. Deleers, & Y. Pathak (Eds.), *Nanoparticulate drug delivery systems* (pp. 213–234). New York: Informa Healthcare.
- Staska, L. M., & Pike, J. T. (2016). Skin and Mammary Gland. In *Atlas of Histology of the Juvenile Rat*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802682-3.00001-x>
- Stojiljković, D., Pavlović, D., & Arsić, I. (2014). Oxidative stress, skin aging and antioxidant therapy. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 31(4), 207–217. <https://doi.org/10.2478/afmnai-2014-0026>
- Stout, R., & Birch-Machin, M. (2019). Mitochondria's role in skin ageing. *Biology*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/biology8020029>
- Strydom, H., Maltha, J. C., Kuijpers-jagtman, A. M., & Hoff, J. W. V. Den. (2012). The oxytalan fibre network in the periodontium and its possible mechanical function. *Archives of Oral Biology*, 57(8), 1003–1011. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.06.003>
- Supe, S., & Takudage, P. (2021). Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. *Skin Research and Technology*, 27(3), 299–308. <https://doi.org/10.1111/srt.12968>
- Surya Tej, K. V. M., Moin, A., Gowda, D. V., Anjali, Karunakar, G., Patel, N. P., & Kamal, S. S. (2016). Nanostructured lipid carrier based drug delivery system. *Journal of Chemical*

- and Pharmaceutical Research*, 8(2), 627–643.
- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.002>
- Teixeira, A., Vasconcelos, V., Teixeira, M., Almeida, V., Azevedo, R., Torres, T., ... Almeida, I. F. (2019). Mechanical Properties of Topical Anti-Psoriatic Medicines: Implications for Patient Satisfaction with Treatment. *AAPS PharmSciTech*, 20(1). <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1246-2>
- The Human Metabolome Database. (2007). Gallic acid. Retrieved March 20, 2021, from <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0005807>
- Tichota, D. M., Silva, A. C., Sousa Lobo, J. M., & Amaral, M. H. (2014). Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 3855–3864. <https://doi.org/10.2147/IJN.S64008>
- Tobin, D. J. (2016). Introduction to skin aging. *Journal of Tissue Viability*, 26(1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2016.03.002>
- Tóth, I. Y., Szekeres, M., Turcu, R., Sáringer, S., Illés, E., Nesztor, D., & Tombácz, E. (2014). Mechanism of in situ surface polymerization of gallic acid in an environmental-inspired preparation of carboxylated core-shell magnetite nanoparticles. *Langmuir*, 30(51), 15451–15461. <https://doi.org/10.1021/la5038102>
- Trommer, H., & Neubert, R. H. H. (2006). Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 19(2), 106–121. <https://doi.org/10.1159/000091978>
- U.S. Environmental Protection Agency. (2021). Dehydroabiatic acid. Retrieved March 15, 2021, from CompTox Chemicals Dashboard website: <https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID8022163#properties>
- Uchechi, O., Ogbonna, J. D. N., & Attama, A. A. (2014). Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. In A. D. Sezer (Ed.), *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. InTech. <https://doi.org/10.5772/58672>
- Ueda, C. T., Shah, V. P., Derdzinski, K., Ewing, G., Flynn, G., Maibach, H., ... Yacobi, A. (2009). Topical and Transdermal Drug Products. *Pharmaceutical Forum*, 35(3), 750–764.
- Vazzana, M., Fanguiero, J. F., Faggio, C., Santini, A., & Souto, E. B. (2017). Archaeosomes for Skin Injuries. In A. Ascenso, H. Ribeiro, & S. Simões (Eds.), *Carrier-Mediated Dermal Delivery: Applications in the Prevention and Treatment of Skin Disorders* (1st ed., pp. 323–356). Lisbon: Jenny Stanford Publishing.
- Ved, C., & Shrotriya, S. N. (2014). Solid Lipid Nanoparticles: a Novel Carrier in Skin Diseases. *Inventi Journals*, 2014(4).
- Vianna, D. R., Silva, B. V., & Hamerski, L. (2010). Electroporation and iontophoretic for drug delivery across the skin. *Revista Virtual de Química*, 2(4), 271–279. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20100025>
- Vierkötter, A., & Krutmann, J. (2012). Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations. *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 227–231.

<https://doi.org/10.4161/derm.19858>

- Walters, K. A. (2002). Dermatological and transdermal formulations. In *Dermatological and Transdermal Formulations*. <https://doi.org/10.1201/9780824743239>
- Wang, X. W., Yu, Y., & Gu, L. (2014). Dehydroabietic acid reverses TNF- α -induced the activation of FOXO1 and suppression of TGF- β 1/Smad signaling in human adult dermal fibroblasts. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(12), 8616–8626.
- Weiss, S. C. (2011). Conventional topical delivery systems. *Dermatologic Therapy*, 24(5), 471–476. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2012.01458.x>
- Weller, R. P. J. B., Savin, J. A., Hunter, J. A. A., & Dahl, M. V. (2008). The function and structure of the skin. In *Clinical Dermatology*. Blackwell Publishing.
- Wickett, R. R., & Visscher, M. O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, 34(10), S98–S110. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.295>
- Wissing, S. A., & Müller, R. H. (2003). Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 254(1), 65–68. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00684-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00684-1)
- Yadav, N., Khatak, S., & Singh Sara, U. V. (2017). Solid Lipid Nanoparticles: A Review. *Nanoscience and Nanotechnology Research*, 4(2), 67–72. <https://doi.org/10.9790/3013-26103444>
- Yagi, M., & Yonei, Y. (2018). Glycative stress and anti-aging. *Glycative Stress Research*, 5(1), 50–54. https://doi.org/https://doi.org/10.24659/gsr.5.1_50
- Yu, S. H., & Baron, E. D. (2013). Evaluation and assessment of photoaging. *Photonics and Lasers in Medicine*, 2(4), 305–314. <https://doi.org/10.1515/plm-2013-0029>
- Yu, Y.-Q., Yang, X., Wu, X. F., & Fan, Y. Bin. (2021). Enhancing Permeation of Drug Molecules Across the Skin via Delivery in Nanocarriers: Novel Strategies for Effective Transdermal Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(646554), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.646554>
- Zanwar, A. A., Badole, S. L., Shende, P. S., Hegde, M. V., & Bodhankar, S. L. (2014). Role of Gallic Acid in Cardiovascular Disorders. In *Polyphenols in Human Health and Disease* (Vol. 2, pp. 1045–1047). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00080-3>
- Zhang, B., Liu, X., Wang, C., Li, L., Ma, L., & Gao, C. (2015). Bioengineering Skin Constructs. In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* (pp. 703–719). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397157-9.00056-4>
- Zouboulis, C. C., Makrantonaki, E., & Nikolakis, G. (2019). When the skin is in the center of interest: An aging issue. *Clinics in Dermatology*, 37(4), 296–305. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2019.04.004>
- Zsikó, S., Csányi, E., Kovács, A., Budai-Szűcs, M., Gácsi, A., & Berkó, S. (2019). Methods to evaluate skin penetration in vitro. *Scientia Pharmaceutica*, 87(3). <https://doi.org/10.3390/scipharm87030019>