



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

ROBERTA BALANSIN RIGON

**Nanopartículas lipídicas sólidas para incorporação do *trans*-
resveratrol no tratamento tópico do melanoma: avaliação *in vitro* e *in*
vivo e elucidação dos mecanismos de internalização celular**

Araraquara – SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

ROBERTA BALANSIN RIGON

**Nanopartículas lipídicas sólidas para incorporação do *trans*-
resveratrol no tratamento tópico do melanoma: avaliação *in vitro* e *in*
vivo e elucidação dos mecanismos de internalização celular**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Co-orientadora: Profa. Dra. Valéria Valente

Araraquara – SP

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R572n

Rigon, Roberta Balansin

Nanopartículas lipídicas sólidas para incorporação do *trans*-resveratrol no tratamento tópico do melanoma: avaliação *in vitro* e *in vivo* e elucidação dos mecanismos de internalização celular / Roberta Balansin Rigon. – Araraquara, 2017.

190 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.

Coorientadora: Valeria Valente.

1. Nanopartículas lipídicas sólidas. 2. *Trans*-Resveratrol. 3. Administração cutânea.
4. Internalização celular. 5. Pele humana reconstituída. 6. Envelhecimento cutâneo. 7. Glicação.
I. Chorilli, Marlus, orient. II. Valente, Valeria, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

ROBERTA BALANSIN RIGON

**Nanopartículas lipídicas sólidas para incorporação do *trans*-
resveratrol no tratamento tópico do melanoma: avaliação *in vitro* e *in*
vivo e elucidação dos mecanismos de internalização celular**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
Estadual Paulista - UNESP, Campus de
Araraquara como requisito para a obtenção do
título de Doutor (a) em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 30 de junho de 2017

Comissão Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado:

MARLUS CHORILLI (Orientador)

ROSE MARY ZUMSTEIN GEORGETTO NAAL

GISLAINE RICCI LEONARDI

JANICE RODRIGUES PERUSSI

MARCOS ANTONIO CORREA

*Aos meus pais Pedro e Rosali, meus maiores
incentivadores e exemplos de dedicação.*

Primeiramente, a Deus por todas as oportunidades, por todos os desafios que proporcionaram o meu amadurecimento, por todas as pessoas que Ele colocou no meu caminho, por me iluminar, me fortalecer e guiar minhas escolhas;

À minha família (meus pais Pedro e Rosali e meus irmãos Talita e Pedro Henrique), que sempre me incentivaram nas minhas escolhas, mesmo que isso representasse um distanciamento físico. Que com todo o amor, me mostraram que é preciso ter coragem para se alcançar os sonhos.

Ao meu orientador Dr. Marlus Chorilli, por ter acreditado no meu potencial, pelos ensinamentos e paciência durante esses anos, e por ter me dado todo suporte possível nesta caminhada;

À minha co-orientadora Dra. Valéria Valente, pela atenção e disponibilidade em me receber em seu grupo de pesquisa, além da amizade construída.

À Profa. Dra. Gislaine Ricci Leonardi, por ser amiga, por ser conselheira, por sempre me incentivar e propiciar as mais belas oportunidades, que a tornam um exemplo para mim de professora e de mulher.

Aos professores de farmacotécnica Dra. Palmira D. Gremião; Dr. Anselmo G. Oliveira e Dr. Raul C. Evangelista (*in memoriam*), pela parceria na utilização dos equipamentos, pelas contribuições e amizade.

À professora Dra. Christiane Pienna Soares, pela parceria e colaboração com a linhagem celular, que permitiu os ensaios com cultivo de células.

À Profa. Dra. Sandra Pulcinelli do Instituto de Química, da Unesp Araraquara, pela colaboração nos ensaios de DSC.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus, do Instituto de Biologia (IB), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), pela colaboração para a realização do ensaio de internalização celular, bem como pelos ensinamentos e pela paciência e suporte estrutural para o desenvolvimento deste ensaio.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Assumpção Pereira da Silva, do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP), por toda ajuda com as análises de microscopia de força atômica.

À Profa. Dr. Monika Schäfer-Korting, por ter me recebido em seu grupo e dado a oportunidade de aprender sobre pele humana reconstituída, e por toda a gentileza e amizade.

Ao meu namorado Roberto, que antes mesmo de ser namorado, já era companheiro e amigo, ouvinte das minhas lamentações e angústias. Obrigada pela paciência, que não foi pouca, pelo incentivo e por me tranquilizar sempre.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacotécnica, Aline, Bruno, Fabiana, Márcia, Gisela, Jovan, Vivian, Josimar, Karisa, Lilian, Karen, Valéria e Patrícia. Especialmente para a Jéssica, Maíra, Liliane, Camila, Mariana, Fernanda Kolenyak, Giovana, Fabíola, Fernanda Boni e Natália por todas as noites de companhia, ajudas incansáveis e motivação.

À técnica Natália por toda ajuda, por toda amizade e por todos os momentos de desabafo.

Aos meus amigos do Laboratório de Citologia, Bárbara, Renato, Franciele, Juliana, Rodolfo, por todos os conhecimentos, em especial para Geovana, por toda amizade e dedicação, além de toda companhia e motivação.

Aos meus amigos da Unicamp, Allan, Luis, Fernanda, Guilherme, Monique e Samara, por todo o companheirismo, paciência e ensinamentos.

Aos meus amigos do Freie Universität Berlin, Christian Zoschke, Christopher Wolff, Leonie Gronbach, Charlene Dève Christian Hausmann, Nan Zhang, Barbara Wanjiku, Carola Kapfer and Tanja Thiele, por toda ajuda com as novas técnicas, por terem me introduzido a vida alemã e por todo o carinho e ajuda, não apenas técnicos, mas pessoais com o novo mundo. Em especial a Leonie Gronbach, a qual se tornou uma amiga para a vida.

Às minhas amigas de todos os momentos, Ana Eliza, Fernanda, Júlia, Nathália e Thatiani, pela valiosa amizade, cumplicidade e companheirismo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2013/21500-1 e processo

BEPE n° 2016/02090-5, pelo apoio financeiro, o qual possibilitou que eu me dedicasse exclusivamente à pesquisa e à escrita dessa tese.

À todos que me ajudaram a ser quem sou, que depositam confiança em mim e para os quais sou uma esperança, resta-me afincadamente não vos decepcionar. Muito obrigada!

Índice

Lista de Tabela	xii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Abreviações	xix
Introdução	22
1.1 Introdução do Capítulo 1	22
1.2 Introdução do Capítulo 2	25
Capítulo 1	27
Nanopartículas lipídicas sólidas para administração cutânea do trans-resveratrol: avaliação in vitro e in vivo da penetração cutânea e dos efeitos celulares	27
Resumo	27
Abstract	29
1. Levantamento Bibliográfico	30
1.1 A pele humana	30
2.2 trans-Resveratrol e seu papel no melanoma	31
1.3 Mecanismos de internalização celular utilizados por sistemas de liberação de fármaco ..	32
1.4 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs)	35
2. Objetivos	40
3. Materiais e Métodos	41
3.1 Materiais	41
3.2 Métodos	41
3.2.1 Produção das nanopartículas lipídicas sólidas	41
3.2.2 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e análise do potencial zeta	42
3.2.3 Análise microscópica	42
3.2.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	43
3.2.5 Validação da metodologia analítica para a quantificação de RES nas NLSs	43
3.2.6 Quantificação do RES presente nas NLSs	44
3.2.7 Penetração cutânea in vitro das NLSs em pele de suínos	46
3.2.8 Modelo de eficácia in vivo através da atividade antinociceptiva e anti-edematogênica pelo teste de edema de pata em camundongos	47
3.2.9 Avaliação da viabilidade celular utilizando ensaios de MTT e da Calceína	49
3.2.10 Citotoxicidade das NLSs nas linhagens HaCat e B16F10	50

3.2.11 Ciclo celular das linhagens HaCat e B16F10 após o tratamento com NLSs	51
3.2.12 Ensaio de internalização celular nas linhagens HaCat e B16F10	51
3.2.13 Forma de análise dos resultados.....	51
4. Resultados e Discussão	53
4.1 Desenvolvimento das NLSs.....	53
4.2 Diâmetro médio das NLSs	70
4.3 Potencial zeta das NLSs.....	74
4.4 Microscopia de Força Atômica das NLSs	76
4.5 Calorimetria diferencial exploratória (DSC) das NLSs	78
4.6 Validação da metodologia analítica para a quantificação de RES em NLSs	80
4.6.1 Linearidade	80
4.6.2 Precisão	81
4.6.3 Exatidão	82
4.6.4 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD).....	82
4.6.5 Robustez.....	83
4.7 Estudo da eficiência de encapsulação do RES presente nas NLSs	83
4.8 Penetração cutânea in vitro das NLSs em pele de suínos	87
4.9 Modelo de eficácia analgésica e anti-inflamatória in vivo através da atividade antinociceptiva e anti-edematogênia pelo teste de edema de pata em camundongos	89
4.10 Avaliação das condições de cultivo celular para a realização dos ensaios de MTT e da Calceína	93
4.10.1 Avaliação do pH do meio para o cultivo celular.....	93
4.10.2 Avaliação da influência das formulações nas leituras de viabilidade celular	94
4.11 Citotoxicidade das NLSs pelo método de MTT e calceína.....	95
4.12 Ciclo celular das linhagens HaCat e B16F10 após o tratamento com NLSs	99
4.13 Ensaio de internalização celular nas linhagens HaCat e B16F10	103
5. Conclusões	109
6. Referências.....	111
Capítulo 2	139
Caracterização da permeabilidade de nanopartículas em pele humana reconstituída	139
Resumo.....	140
Abstract	141
1. Levantamento Bibliográfico.....	142
2. Objetivos	145
3. Materiais e Métodos	146

3.1 Materiais	146
3.2 Métodos	146
3.2.1 Avaliação da citotoxicidade in vitro de queratinócitos e fibroblastos	146
3.2.2 Produção organotípica de modelos de pele humana reconstituída glicada	147
3.2.3 Pele reconstituída in vitro	147
3.2.4 Crioções	149
3.2.5 Avaliação da espessura do estrato córneo, epiderme viável, e compartimento dérmico; e contagem de fibroblastos.....	149
3.2.5.1 Coloração com hematoxilina e eosina e avaliação da imunofluorescência	149
3.2.6 Avaliação por microscopia eletrônica.....	150
3.2.7 Elisa para a detecção de CML na pele reconstituída.....	150
3.2.8 Microscopia confocal reflectante (Reflectance Confocal Microscopy - RCM).....	151
3.2.9 Penetração de nanotransportadores CMS	151
4. Resultados e Discussão	153
4.1 Avaliação da citotoxicidade in vitro de queratinócitos e fibroblastos	153
4.2 Produção de pele humana reconstituída com colágeno glicado	155
4.3 Caracterização das PHR.....	155
4.4 Ensaio de Imunofluorescência	156
4.5 Ensaio de microscopia eletrônica.....	159
4.6 Elisa para a detecção de CML na pele	160
4.7 Microscopia confocal de reflectância (MCR).....	162
4.8 Penetração de Nanotransportadores CMS.....	162
5. Conclusões	165
6. Referências.....	166
Anexos.....	191
Anexo A.....	191

Lista de Tabela

Tabela 1. Relação de matérias-primas que podem ser utilizadas na composição estrutural de nanopartículas para melhorar o direcionamento de fármacos na terapia antitumoral.	38
Tabela 2. Formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo como fase lipídica.	53
Tabela 3. Formulações desenvolvidas utilizando estearato de polioxietileno (40) e behenato de glicerilo como fase lipídica.	54
Tabela 4. Formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo (C888) como fase lipídica e polissorbato 80 (T80) e fosfatidilcolina de soja como tensoativos.	57
Tabela 5. Formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo como fase lipídica, polissorbato 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos e P407 e glicerina como estabilizantes estéricos.	59
Tabela 6. Design fatorial 2^2 , sendo os níveis menores (-1), maiores (+1) e central (0).	62
Tabela 7. Influência da fase lipídica e surfactantes usados na produção das NLSs.	63
Tabela 8. Formulações desenvolvidas.	68
Tabela 9. Diâmetro médio (nm) das formulações selecionadas, durante o período de armazenamento a 4°C (T1), através de AFM.	77
Tabela 10. Valores da temperatura dos picos (°C), das entalpias esperadas e obtidas do ensaio DSC das matérias-primas utilizadas e das formulações desenvolvidas.	79
Tabela 11. Resultados da avaliação da precisão para a repetibilidade (precisão intra-corrída). .	81
Tabela 12. Resultados da avaliação da precisão intermediária (precisão inter-corrídas).	82
Tabela 13. Resultados da avaliação da exatidão.	82

Tabela 14. Resultados da robustez do método analítico para a quantificação do RES	83
Tabela 15. Análise do filtrado obtido por ultrafiltração para ensaio de eficiência de encapsulação (n=3).....	83
Tabela 16. Eficiência de Encapsulação (EE%) e capacidade de carga (CC%) do <i>trans</i> -resveratrol nas NLSs após armazenamento em geladeira (4° C) (média ± desvio padrão, n=3).	86

Lista de Figuras

Figura 1. Pele humana (imagem obtida do banco de dados Servier Medical Art).....	30
Figura 2. Fórmula estrutural do RES.	31
Figura 3. Melanócito e mecanismo de melanogênese (adaptado de QIAGEN© 2009).....	32
Figura 4. Fagocitose de partículas (adaptado de (MOSBY, 2013)).	34
Figura 5. Internalização de partículas através de endocitose mediada por clatrina e endocitose mediada por caveolina (adaptado de (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009)).	34
Figura 6. Fases da entrega citosólica de substâncias terapêuticas a partir de nanocarreadores por endocitose (adaptado de (REJMAN et al., 2004)).....	35
Figura 7. Imagem demonstrando a organização da matriz lipídica de NLSs composta por apenas um lipídeo sólido (esquerda) e as imperfeições da organização da matriz da partícula (direita) – CLNs ou NLSs composta por mistura de lipídeo sólido, distorcendo a formação de um cristal perfeito (adaptado de (YINGCHONCHAROEN et al., 2016)).....	36
Figura 8. Coluna de separação utilizada para realizar análise cromatográfica por exclusão de tamanho, empregando Sephadex-G50.....	45
Figura 9. Imagem ilustrativa do ensaio de eficiência de encapsulação.	46
Figura 10. Avaliação do diâmetro plantar dos camundongos, utilizando paquímetro digital.	48
Figura 11. Avaliação da atividade antinociceptiva através de um medidor de analgesia.	49
Figura 12. Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) das formulações desenvolvidas (n=6).....	54
Figura 13. Índice de polidispersidade (Pdl) das formulações desenvolvidas (n=6).....	55
Figura 14. Potencial zeta (mV) das formulações desenvolvidas (n=6).....	55

Figura 15. Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e compritol 888 ATO como fase lipídica e Tween 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (n=6).....	57
Figura 16. Índice de polidispersidade (Pdl) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e compritol 888 ATO como fase lipídica e Tween 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (n=6).....	58
Figura 17. Potencial zeta (mV) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e compritol 888 ATO como fase lipídica e Tween 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (n=6).....	58
Figura 18. Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo como fase lipídica e polissorbato 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos e P407 e glicerina como estabilizantes estéricos (n=6).	60
Figura 19. Índice de polidispersidade (Pdl) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo como fase lipídica e polissorbato 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos e P407 e glicerina como estabilizantes estéricos (n=6).	60
Figura 20. Potencial zeta (mV) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo como fase lipídica e polissorbato 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos e P407 e glicerina como estabilizantes estéricos (n=6).	61
Figura 21. Influência da mistura de tensoativos utilizado (P407:FCS) no diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas produzidas, quando utilizadas ácido esteárico; <i>blend</i> de ácido esteárico:álcool berrênico (1:1) e álcool berrênico como fase lipídica (n=6).....	63
Figura 22. Superfície resposta dos experimentos de design fatorial das NLSs (a) diâmetro hidrodinâmico médio (nm); (b) índice de polidispersidade (Pdl); (c) potencial zeta em função das taxas de AE:AB (ácido esteárico: álcool berrênico) e P407:FS (poloxamer 407: fosfatidilcolina de soja).	64
Figura 23. Diagrama de pareto dos efeitos padronizados para NLSs (a) diâmetro hidrodinâmico médio (nm); (b) índice de polidispersidade (Pdl); (c) potencial zeta em função das taxas de AE:AB (ácido esteárico: álcool berrênico) e P407:FS (poloxamer 407: fosfatidilcolina de soja).	65

Figura 24. Estrutura química dos componentes utilizados para o preparo das formulações, sendo que A. ácido esteárico; B. fosfatidilcolina de soja; C. polissorbato 80; D. brometo de cetiltrimetilamônio; E. poloxamer 407 e F. glicerina.....	69
Figura 25. NLSs após centrifugação para a remoção do titânio.....	70
Figura 26. Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e índice de polidispersidade (PdI) das formulações selecionadas, durante o período de armazenamento a 4°C (T1, T7, T15, T30, T60 e T90), sendo: A) F1; B) F1.RES; C) F2 e D) F2.RES.....	71
Figura 27. Distribuição do tamanho das partículas por intensidade (%) nos tempos T1 e T90 dias, das formulações armazenadas a 4°C, sendo: A) F1; B) F1.RES; C) F2 e D) F2.RES.	72
Figura 28. Potencial zeta (mV) das formulações selecionadas, durante o período de armazenamento a 4°C (T1, T7, T15, T30, T60 e T90), sendo: A) F1; B) F1.RES; C) F2 e D) F2.RES.	75
Figura 29. Fotomicrografias das formulações selecionadas analisadas por microscopia de força atômica após 24 horas de preparo, sendo: A) F1; B) F1.RES; C) F2 e D) F2.RES.	76
Figura 30. Termograma de aquecimento das matérias-primas utilizadas no preparo das NLSs e das formulações selecionadas.....	78
Figura 31. Curva analítica do RES por espectroscopia UV-VIS.....	81
Figura 32. Análise das frações de NLS sem o fármaco por espectrofotometria em 306 nm e em 410 nm após análise cromatográfica por exclusão de tamanho.	84
Figura 33. Análise das frações de NLS contendo RES encapsulado e das frações de RES livre por espectrofotometria em 306 nm e em 410 nm após análise cromatográfica por exclusão de tamanho da formulação F1.RES.....	85
Figura 34. Análise das frações de NLS contendo RES encapsulado e das frações de RES livre por espectrofotometria em 306 nm e em 410 nm após análise cromatográfica por exclusão de tamanho da formulação F2.RES.....	85

Figura 35. Penetração das NLSs. Rhodamine PE encapsulado em emulsão O/A e em NLSs aplicada nos modelos de pele de suínos durante 6 horas.	88
Figura 36. Eficácia antinociceptiva. O limiar nociceptivo foi determinado a partir da força aplicada à superfície dorsal da traseira inflamada (g) necessária para que o camundongo retirasse sua pata (n=14).	90
Figura 37. Atividade antiedematogênica. Diâmetro da pata traseira esquerda (mm) (n=14).	91
Figura 38. Variação do pH dos meios após a adição das formulações.	93
Figura 39. Interferência das formulações nas leituras de MTT e Live/Dead.	95
Figura 40. Citotoxicidade das formulações F1 e F1.RES; F2 e F2.RES, para a linhagem celular de HaCat e para a linhagem celular de melanoma B16F10, utilizando MTT.	96
Figura 41. Citotoxicidade das formulações F1 e F1.RES; F2 e F2.RES, para a linhagem celular de HaCat e para a linhagem celular de melanoma B16F10, utilizando calceína.	97
Figura 42. IC ₅₀ para as formulações desenvolvidas para a linhagem HaCat e B16F10 nos ensaios de MTT e calceína.	97
Figura 43. Ciclo celular da linhagem HaCat após 12 horas de tratamento com as NLSs, e recuperadas durante 24, 48 e 72 horas.	101
Figura 44. Ciclo celular da linhagem B16F10 após 12 horas de tratamento com as NLSs, e recuperadas durante 24, 48 e 72 horas.	102
Figura 45. Ensaio de internalização celular por citometria de fluxo. Controle negativo (esquerda) e controle positivo (direita) de internalização após 4 horas de tratamento com meio de cultura sem soro e NLSs padrão marcadas com Rhodamina PE, respectivamente.	104
Figura 46. Ensaio de internalização celular por citometria de fluxo para a linhagem de queratinócitos imortalizados (HaCat). Células tratadas com correspondente 10 µM de RES para as formulações F1 e F1.RES (parte superior esquerda e direita, respectivamente), e 1 µM de RES para as formulações F2 e F2.RES (parte inferior esquerda e direita, respectivamente).	105

Figura 47. Ensaio de internalização celular por citometria de fluxo para a linhagem de melanoma murino (B16F10). Células tratadas com correspondente 10 μ M de RES para as formulações F1 e F1.RES (parte superior esquerda e direita, respectivamente), e 1 μ M de RES para as formulações F2 e F2.RES (parte inferior esquerda e direita, respectivamente). 106

Lista de Abreviações

AE	Ácido esteárico
AFM	<i>Atomic force microscope</i>
AGE	Produtos Finais da Glicação Avançada
Akt	Enzima proteínaquinase B
ANOVA	Análise de variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B16F10	Linhagens tumorais de melanoma murino
BC	Brometo de cetrimônio
C888	Compritol 888 ATO
CC%)	Capacidade de carga
CEUA	Comitê de Ética e Pesquisa no uso animal
CLNs	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CML	Ne-(carboxymethyl)lysine
CMS	Nanotransportadores com multinúcleos dendríticos, “ <i>dendritic core-multishell</i> ”
CTA	Celulose triacetato
2D	Bidimensional
DLS	Espalhamento dinâmico da luz; <i>dynamic light scattering</i>
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOXO	Doxorrubicina
DP	Desvio padrão
DSC	Calorimetria de varredura diferencial; <i>Differential scanning calorimetry</i>
EE%	Eficiência de encapsulação
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EP	Estearato de polioxietileno 40
F1	Formulações aniônicas sem <i>trans</i> -resveratrol
F1.RES	Formulações aniônicas com <i>trans</i> -resveratrol
F2	Formulações catiônicas sem <i>trans</i> -resveratrol
F2.RES	Formulações catiônicas com <i>trans</i> -resveratrol
FACS	Classificação de células por fluorescência
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	Food and Drug Administration

FS	Fosfatidilcolina de soja
GLY+	Colágeno glicado
GLY-	Colágeno não-glicado
GO	Glioxal
HaCat	Linhagem saudável de queratinócitos imortalizados
H&E	Hematoxilina e eosina
HNX 14C	Carcinoma de células escamosas
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	50% da concentração inibitória máxima
IC	Inclinação da curva analítica
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IFA	Imunofluorescência
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KGM	Meio para o crescimento de queratinócitos, <i>Keratinocytes Growth Media</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LD	Limite de detecção
LOX	Lisil oxidase
LQ	Limite de quantificação
MC1R	Receptor de melanocortina-1
MEL	Melanoma
MFA	Microscopia de força atômica
Min	Minutos
MITF	Microftalmia
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MWCO	Peso molecular de corte, <i>Molecular weight cut-off</i>
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NDRG2	Gene regulado por <i>downstream</i> N-myc 2
NHDF	Células de fibroblastos
NHK	Células de queratinócitos
NL	Nanopartículas lipídicas
NLSs	Nanopartículas lipídicas sólidas
Nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
NP	Nanopartícula
P407	Poloxamer 407

PBS	Tampão fosfato-salina
PdI	Índice de polidispersidade
PHR	Pele humana reconstituída
PLA	D,L-polilactida
RAGE	Receptor de AGE
RCM	Microscopia confocal reflectante, <i>Reflectance Confocal Microscopy</i>
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RHS	<i>Reconstructed human skin</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rpm	Rotações por minuto
RES	<i>trans</i> -Resveratrol
SDS	Dodecilsulfato de sódio, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SFB	Soro fetal bovino
SLNs	Solid lipid nanoparticles
T80	Polissorbato 80
T1	Tempo 1 dia
T7	Tempo 7 dias
T15	Tempo quinze dias
T30	Tempo 30 dias
T60	Tempo 60 dias
T90	Tempo 90 dias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espectrofotômetro ultravioleta-visível
Λ	Lâmbda

A redação dessa Tese foi dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo se destina ao desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs), bem como estudo de estabilidade, o ensaio de permeação cutânea *in vitro*, o ensaio de eficácia antinociceptiva e anti-edematogênica *in vivo* pelo ensaio de edema de pata em camundongos, e avaliação da capacidade das NLSs em alterar os mecanismos celulares envolvidos no melanoma. Estes estudos foram realizados em sua maioria na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". O segundo capítulo se destina ao desenvolvimento de modelos de pele humana *in vitro* para a sua utilização em ensaios de eficácia, permeação cutânea, toxicidade e segurança de formas farmacêuticas para administração cutânea de fármacos, como uma alternativa para a substituição do uso de animais em ensaios toxicológicos e de eficácia de medicamentos. Este estudo foi realizado no doutoramento sanduíche, o qual foi desenvolvido na Freie Universität Berlin, sobre supervisão da Profa. Dra. Monika Schäfer-Korting.

1.1 Introdução do Capítulo 1

Sabe-se que a incidência do câncer de pele tem apresentado um grande aumento nas últimas décadas, o qual está intimamente relacionado com aumento da exposição solar. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente no Brasil, correspondendo cerca de 30.0% de todos os tumores malignos registrados no país (ESTIMATIVA, 2016).

Existem basicamente dois tipos de câncer de pele: o não-melanoma, que é o mais comum e raramente pode causar a morte do paciente; e o melanoma (MEL), que é o mais raro, mas é responsável por três em cada quatro mortes por câncer de pele (SCHERER; KUMAR, 2010).

O MEL é um dos mais sérios cânceres de pele, sendo causado pelos melanócitos, que são células pigmentadas dendríticas derivadas da crista neural, que estão normalmente presente na epiderme e algumas vezes na derme viável (VOLKOVOVA et al., 2012). Sua incidência tem aumentado em todo o mundo, com uma fração crescente de pacientes com a doença em estágio avançado e com mal prognóstico. Mesmo com o avanço na imunoterapia e na terapia-alvo, as opções de tratamento ainda são limitadas, restringindo-se, sobretudo à administração de quimioterápicos, que podem apresentar ação citotóxica também sobre células saudáveis, diminuindo significativamente a qualidade e sobrevida dos pacientes (GARBE et al., 2011).

A radiação ultravioleta (UV) é claramente o fator ambiental predominante e, portanto, fator de risco potencialmente modificável para o MEL. Outros fatores relacionados aos hospedeiros, tais como as características pigmentares e as predisposições genéticas, também desempenham um importante papel para o seu desenvolvimento (GANDINI et al., 2011).

Da mesma maneira que ocorre para outros tumores humanos, são observadas no MEL uma série de alterações genéticas e genômicas (FREEDMAN et al., 2011). O receptor de melanocortina-1 (MC1R) foi o primeiro gene reconhecido que poderia aumentar o risco do desenvolvimento do MEL, pois se observou que uma variante no alelo RHC do gene MC1R comprometeu a capacidade de bronzeamento e a comutação da melanina, diminuindo a fotoproteção da feomelanina. Além disso, esta variante também está envolvida na regulação da resposta ao dano ao DNA dos melanócitos após exposição solar (STURM, 2012). Existe outro gene que também pode estar envolvido no desenvolvimento do MEL, que é o gene regulado por *downstream* N-myc 2 (NDRG2). Há relatos demonstrando que NDRG2 regula a expressão de fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), o qual regula a proliferação, diferenciação, sobrevivência e metástase de células de MEL, influenciando na sua progressão. Porém, este gene, que é um supressor tumoral, está fracamente expresso em células tumorais (KIM et al., 2008).

Além dos fatores genéticos relacionados ao desenvolvimento e progressão do MEL, existem outros fatores que podem influenciar no seu aparecimento e agressividade, como, por exemplo, a presença da enzima proteínaquinase B (Akt), que está presente em uma via de sinalização que pode causar o crescimento agressivo em MEL, pois ela confere resistência a um número de estímulos apoptóticos, inativando vários potenciais genes supressores tumorais (GOVINDARAJAN et al., 2007).

Além da Akt, outro componente que está intimamente relacionado ao crescimento tumoral é o óxido nítrico (NO), o qual contribui para o crescimento e a metástase através da promoção da migração, invasão e propriedades angiogênicas das células tumorais. A diminuição de NO endógeno resulta na diminuição do crescimento de células de MEL, sendo que o crescimento é restabelecido com aumento de NO (YANG et al., 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que o *trans*-resveratrol (RES) atua como um importante aliado na prevenção e no tratamento de distúrbios cutâneos, envolvendo a prevenção e o tratamento do MEL (NDIAYE et al., 2011).

Porém, um dos maiores desafios atualmente enfrentados pelos pesquisadores é a baixa biodisponibilidade *in vivo* do RES quando administrado por via oral. Em mamíferos, esta substância sofre rápida metabolização hepática e intestinal, em torno de 30 a 60 minutos após a sua administração. Desta forma, a sua utilização sistêmica é prejudicada, uma vez que o pico plasmático diminui rapidamente (COTTART et al., 2010; NDIAYE et al., 2011). O problema da rápida metabolização do RES e o impacto para o tratamento do MEL foi demonstrado em estudos conduzidos por Niles *et al.* (2003; 2006). Em um dos estudos, o RES induziu a apoptose de células de MEL *in vitro*. Porém, ao administrá-lo oralmente em ratos os autores não observaram o efeito no combate ao MEL, verificando que ele havia sido rapidamente metabolizado após a sua administração (NILES et al., 2006; NILES et al., 2003).

Dessa forma, a administração cutânea do RES pode ser conveniente a fim de localizá-lo no seu local de ação. No entanto, algumas de suas propriedades físico-químicas, como a limitada solubilidade aquosa, dificultam sua eficiência terapêutica tópica, uma vez que possui baixa penetração na pele. Dessa forma, estratégias tecnológicas que apresentem a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente, diversos grupos de princípios ativos e de modificar suas propriedades e comportamento em meio biológico, podem ser promissoras para veiculação de tais substâncias (MARA MAINARDES et al., 2006).

Em virtude do grande número de citações na literatura científica, as indústrias farmacêuticas têm se mostrado interessadas no desenvolvimento de sistemas lipídicos nanoestruturados, os quais apresentam vantagens relacionadas principalmente ao fato de promoverem liberação controlada de fármacos, além de protegerem princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação (GUTERRES et al., 2007; MOHANRAJ; CHEN, 2007).

Dentre os sistemas lipídicos nanoestruturados, um grande enfoque tem sido atribuído às nanopartículas lipídicas (NL), que estão ganhando notoriedade, como, por exemplo, carreadores para a administração cutânea de fármacos, em virtude das características de interação com o estrato córneo e outras camadas da pele, capacidade de arranjo do fármaco com efeito protetor e sustentador da liberação, baixa irritação cutânea, além de apresentarem tamanho de partícula reduzido, o que poderia promover maior penetração cutânea (GUTERRES et al., 2007; LIU et al., 2007; MEI et al., 2003).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) são NL coloidais constituídas por uma matriz lipídica que se apresenta sólida em temperatura ambiente e corporal, com diâmetro médio variando entre 50 a 1000 nm (MÜLLER; LUCKS, 1996). Elas foram introduzidas na comunidade científica no início da década de 1990, sendo consideradas NL de primeira geração. Modificações das NLSs realizadas posteriormente, com o acréscimo de lipídeo líquido à temperatura ambiente na matriz lipídica, resultaram nos chamados carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), que representam atualmente uma segunda geração de NL (MÜLLER et al., 2007).

Guo *et al.* (2010) utilizaram nanopartículas de RES e observaram maior inibição do crescimento tumoral para o RES incorporado em nanopartículas (GUO et al., 2010). Estudo conduzido por Tekac e Kristl (2010) demonstrou que NLSs foram capazes de atravessar a membrana celular, serem distribuídas pela citosol e atingirem a região perinuclear, sem induzirem citotoxicidade. Estes autores observaram ainda aumento da solubilidade, estabilidade e liberação intracelular do RES após a sua veiculação em sistema nanoparticulado (TESKAČ; KRISTL, 2010).

Há várias razões para a utilização de NLS nas terapias antitumorais, entre as quais se destaca o aumento da permeabilidade e dos efeitos retentivos, que utilizam das imperfeições anatômicas e fisiopatológicas do tecido tumoral para uma abordagem específica. Estudos têm demonstrado que há um aumento da internalização e do acúmulo de NLS no tecido tumoral,

(WONG et al., 2007) devido às características fisiopatológicas desse tecido, as quais permitem que NLS na faixa de 30-100 nm permeiem mais facilmente a vasculatura fraca e frouxa. Além disso, há baixo retorno venoso e baixa drenagem linfática, o que faz com que as NLS fiquem retidas no tumor em altas concentrações locais (IYER et al., 2006; MAEDA et al., 2000; NOGUCHI et al., 1998).

Estudo conduzido por Xu e colaboradores (2009) mostrou que há 2,4 vezes mais acúmulo de NLS no carcinoma hepatocelular, quando comparado com o mesmo fármaco não nanoencapsulado, após 6 horas da administração intravenosa. Este resultado sugere que o carregamento de fármacos utilizando nanopartículas pode aumentar a eficácia antitumoral *in vivo* com redução da toxicidade sistêmica (XU et al., 2009).

Com o cenário biológico complexo dos cânceres é fundamental a identificação de propriedades que possam maximizar o acúmulo de NLS no sítio de ação, diminuindo assim a toxicidade do fármaco e os efeitos colaterais. Em particular, há três problemas, os quais demonstram como o tamanho, a forma e as propriedades superficiais podem afetar drasticamente o comportamento das NLS no tecido tumoral, sendo estes: a dinâmica de transporte e marginalização; a dinâmica de adesão e a dinâmica de internalização. As interações não específicas, como, por exemplo, as ligações de van der Waals, afinidade eletrostática e estérica, bem como interações específicas, como a ligação ligante-receptor, podem predizer a propensão à adesão e à internalização das NLS (SAKAMOTO et al., 2010b).

As inúmeras formulações com diferentes composições, morfologias e tamanhos de partículas dificultam o entendimento dos mecanismos de internalização (*uptake*) celular. Assim, o conhecimento dos processos pelos quais as células selecionam a importação e exportação das moléculas extracelulares pode contribuir para a compreensão dos mecanismos de internalização celular das NLS (DECUZZI; FERRARI, 2008).

Várias são as alterações genéticas que promovem o aumento do desenvolvimento tumoral e da progressão e malignidade do MEL. Desta forma, é necessário conhecer o mecanismo pelo qual os fármacos utilizados para a prevenção e tratamento deste tumor cutâneo, como o RES, conseguem atingir o sítio de ação, bem como elucidar os mecanismos de internalização celular dos sistemas desenvolvidos, com o objetivo de avaliar se o sistema promoverá a entrada do fármaco na célula alvo e tratamento efetivo da doença.

1.2 Introdução do Capítulo 2

Uma formulação farmacêutica aplicada topicamente para o tratamento de uma doença local é conveniente e bem tolerada pelos pacientes (BAROLI, 2010). Produtos farmacêuticos têm sido desenvolvidos para prevenir o envelhecimento com o objetivo de retardar, parar, ou reverter-lo (CHORILLI et al., 2011; POHLMANN et al., 2016; RIGON et al., 2016). Novos fármacos e novos sistemas de liberação têm sido desenvolvidos e testados utilizando células e

tecidos jovens, não considerando as diferenças relacionadas à idade, de acordo com a revisão desenvolvida por NIKOLAKIS et al. (2016).

A nanotecnologia baseada em sistema de liberação de fármacos é extensivamente investigada na promoção de agentes farmacêuticos efetivos, mas um baixo sucesso tem sido reportado na permeação pela pele sem a modificação das barreiras cutâneas (PROW et al., 2011). Então, modelos experimentais de envelhecimento da pele humana são necessários para melhorar a pesquisa envolvendo envelhecimento e para que os cientistas possam prever com precisão as vantagens dos sistemas de liberação de fármacos no envelhecimento cutâneo (NIKOLAKIS et al., 2016).

A permeabilidade de nanopartículas em condições patológicas não tem sido muito explorada. Entretanto, a absorção cutânea de nanopartículas através da pele não saudável precisa ser considerada especialmente quando o fármaco é utilizado para a terapia de doenças que podem ocasionar mudanças na barreira da pele (ALNASIF et al., 2014).

A pele humana reconstituída (PHR) consiste no cultivo de células humanas primárias de pele (queratinócitos, fibroblastos e/ ou células tronco) em alta densidade de células sobre filtro de policarbonato inerte em uma interface de exposição ao ar (POUMAY et al., 2004). A engenharia de tecidos pode ser associada ao campo interdisciplinar na mimetização da pele humana normal (ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2012). A PHR tem sido amplamente utilizada para investigar aspectos sobre a biologia cutânea, assim como a segurança, eficácia pré-triagem, alternativa ao teste em animais, predizer o risco da genotoxicidade, teste de irritação cutânea e avaliação da permeação cutânea (FLAMAND et al., 2006; MERTSCHING et al., 2008).

Recentemente, há um interesse considerável no desenvolvimento de alternativas para substituir o uso de animais em pesquisa. A PHR é fisiologicamente comparável a pele humana natural e, por isso, é adequada à substituição ao teste utilizando animais (MERTSCHING et al., 2008). Entretanto, inúmeras modificações na estrutura da pele podem ser observadas na pele afetada pelo processo de envelhecimento. Assim, a construção tridimensional in vitro da pele humana envelhecida produz um modelo envelhecido que pode ser utilizado para a aplicação de experimentos de penetração cutânea in vitro (PAGEON, 2010; PENNACCHI et al., 2015).



Capítulo 1

Nanopartículas lipídicas sólidas para administração cutânea do trans-resveratrol: avaliação in vitro da penetração cutânea, atividade antinociceptiva e anti-edematogênica in vivo e dos efeitos celulares em células HaCat e B16F10



Roberta Balansin Rigon

Resumo

O *trans*-resveratrol (RES) atua na prevenção e no tratamento de desordens cutâneas, porém apresenta baixa biodisponibilidade e rápida metabolização quando administrado por via oral em humanos. As nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) têm sido exploradas para a administração cutânea de fármacos, em virtude das características de interação com a pele. Assim, o objetivo deste capítulo foi à avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade do RES incorporado em NLSs para administração cutânea, bem como a avaliação da atividade antinociceptiva e antiedematogênica *in vivo* e dos efeitos celulares em células HaCat e B16F10 dos sistemas nanoestruturados. As formulações desenvolvidas foram selecionadas através de design fatorial, as quais eram compostas por ácido esteárico (AE), como lipídeos sólidos e fosfatidilcolina de soja (FS), polissorbato 80 (T80) e poloxamer 407 (P407) como tensoativos (F1). A esta formulação foi acrescido brometo de cetrimônio (BC) como tensoativo catiônico para promoção de carga superficial positiva (F2). O RES foi adicionado na fase lipídica da formulação, obtendo-se as formulações F1.RES e F2.RES, respectivamente. O diâmetro hidrodinâmico médio das formulações foi de $195,0 \pm 3,34$ nm, $241,3 \pm 48,33$ nm, $159,15 \pm 4,78$ nm e $158,25 \pm 33,92$ nm para F1, F1.RES, F2 e F2.RES, respectivamente. O potencial zeta (mV) das formulações foi $-25,5 \pm 1,01$; $-26,0 \pm 1,67$; $30,6 \pm 1,13$ e $30,0 \pm 1,85$ mV para F1, F1.RES, F2 e F2.RES, respectivamente. O RES livre foi quantificado de acordo com metodologia analítica validada e ambas as formulações apresentaram significativamente a mesma eficiência de encapsulação (~50%). As fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica (AFM) demonstraram que F1 e F1.RES apresentaram morfologia anisométrica ovalada e F2 e F2.RES apresentaram morfologia esférica. Pelos ensaios de calorimetria exploratória diferencial, todas as formulações apresentaram redução da entalpia obtida em relação às esperadas, o que demonstra a interação dos componentes na formação dos sistemas. As formulações catiônicas (F2 e F2.RES) apresentaram maior penetração cutânea *in vitro* e *in vivo* do que as formulações aniônicas (F1 e F1.RES). As formulações F1 e F1.RES apresentaram maior efeito citotóxico para as linhagens tumorais de melanoma murino (B16F10) quando comparadas com a linhagem saudável de queratinócitos imortalizados (HaCat). As formulações F2 e F2.RES demonstraram serem mais citotóxicas que as formulações F1 e F1.RES para as duas linhagens testadas. O tratamento das células com as formulações F2 e F2.RES foi capaz de promover parada do ciclo celular em ambas as linhagens estudadas. Não houve internalização celular das NLSs desenvolvidas. Os resultados obtidos demonstram que a presença de tensoativo catiônico pode promover maior efeito terapêutico na terapia tópica utilizando RES; entretanto pode inviabilizar os ensaios celular, devido sua alta toxicidade.

Palavras-chaves: Nanopartículas lipídicas sólidas; *trans*-Resveratrol, administração cutânea; internalização celular.

Abstract

Trans-resveratrol (RES) is an important ally on prevention and treatment of cutaneous disease; however RES presents low bioavailability and faster metabolism when it is administered orally in humans. Solid lipid nanoparticles (SLNs) have been developed for topical administration because the interaction of it with the skin. The aim of this chapter was analyzing *in vitro* and *in vivo* the activity of RES for topical administration, and it was analyzed *in vivo* antinociceptive and antiedematogenic activity and the cellular effect in HaCat and B16F10 cells of nanostructured system. The design factorial was used to select the formulations that were composed of stearic acid (SA), as solid lipids, and soy phosphatidylserine (SPS), polysorbate 80 and poloxamer 407 (P407), as surfactant (F1). Cetrimonium bromide (CB) was added to F1, as a cationic surfactant, to promote positive superficial charge (F2). RES was added to lipidic phase, obtained F1.RES and F2.RES, respectively. The mean hydrodynamic diameter of formulations were 195.0 ± 3.34 nm, 241.3 ± 48.33 nm, 159.15 ± 4.78 nm and 158.25 ± 33.92 nm to F1, F1.RES, F2 and F2.RES, respectively; and the zeta potential were -25.5 ± 1.01 , -26.0 ± 1.67 , 30.6 ± 1.13 and 30.0 ± 1.85 mV to F1, F1.RES, F2 and F2.RES, respectively. Free RES was quantified in accordance of previous validated methodology and both formulations presented same entrapment efficacy (~50%). The photomicrography obtained by atomic force microscopy (AFM) demonstrated that F1 and F1.RES exhibit an anisometric morphology, generally oval; and F2 and F2.RES exhibit disk-shaped morphology. Differential scanning calorimetry showed that all formulations demonstrated reduction on the enthalpy obtained in relation to the expected ones, which it is related to the interaction between the components on the formulation process. Cationic formulations (F2 and F2.RES) penetrate more *in vitro* and *in vivo* assay than anionic formulations (F1 and F1.RES). Formulations F1 and F1.RES were more cytotoxicity to B16F10 cells than HaCat cells. Formulations F2 and F2.RES were more cytotoxicity than F1 and F1.RES for both B16F10 and HaCat cells. All formulations demonstrated to be more cytotoxicity than RES solution. The treatment of cells by formulations F2 and F2.RES promoted cell cycle arrest for both HaCat and B16F10. There was no uptake cellular by SLNs developed. The results demonstrated that cationic surfactant enhance the therapeutic effect of topical therapy using RES; however, the cellular methods can be unfeasible because their cytotoxicity.

Keywords: Solid lipid nanoparticles, *trans*-Resveratrol, topical administration, uptake cellular.

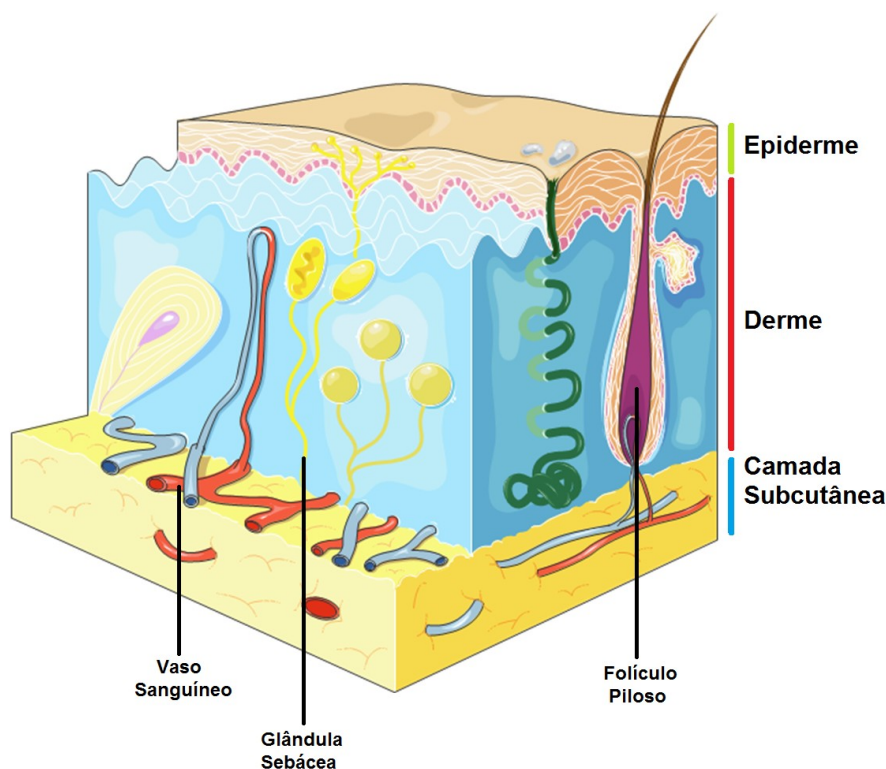
1. Levantamento Bibliográfico

1.1 A pele humana

A pele é o maior órgão do corpo humano, com uma área total de, aproximadamente, 2 m². A pele é responsável pela formação de uma barreira, capaz de nos proteger contra os microrganismos, além de regular a temperatura corpórea, e permitir a sensibilidade somática, através de mecanismos neurais responsáveis pela aquisição de informações sensoriais, tais como: táteis, térmicas e dolorosas (KANITAKIS, 2001).

A pele é subdividida em três camadas, a epiderme, derme e o tecido subcutâneo (hipoderme). A epiderme a camada mais externa da pele responsável por formar uma barreira impermeável. Ela apresenta uma superfície formada por células queratinizadas mortas, a qual é chamada de estrato córneo. A coloração da pele é criada por células específicas localizadas na camada basal da epiderme, as quais são chamadas de melanócitos, essas células produzem a melanina, pigmento responsável pela coloração da pele. A invaginação dessa camada forma as glândulas sudoríparas, os folículos pilosos e outros anexos. A derme é formada por uma camada mediana, na qual apresenta os anexos cutâneos, é a parte vascularizada da pele, além de conter terminais nervosos. A camada subcutânea é a mais profunda das camadas da pele, a qual é composta pelo tecido adiposo (CHORILLI et al., 2007; LOWE, 2015). A estrutura da pele está representada na Figura 1.

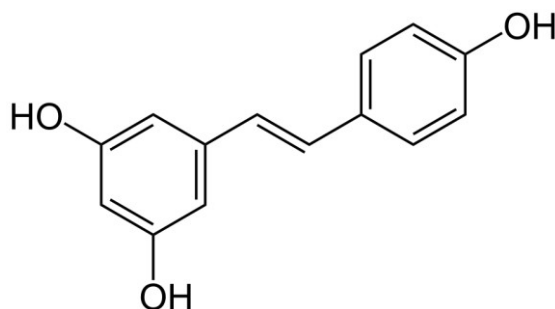
Figura 1. Pele humana (imagem obtida do banco de dados Servier Medical Art).



2.2 *trans-Resveratrol e seu papel no melanoma*

O RES (trans-3, 4', 5-trihidroxistilbeno) (Figura 2) é uma substância naturalmente encontrada em uvas e em várias plantas medicinais, que atua como uma fitoalexina na proteção contra as infecções virais nas plantas. Devido à alta concentração dessa substância na casca das uvas, há uma quantidade significativa de RES no vinho tinto (GEHM et al., 1997).

Figura 2. Fórmula estrutural do RES.



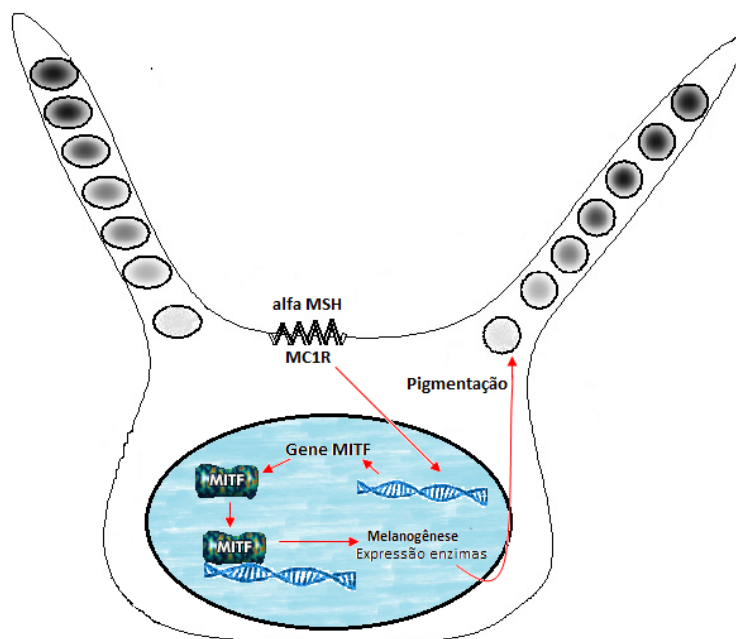
O RES é um pó esbranquiçado com fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$, massa molecular de 228,25 g.mol⁻¹, solúvel em água a 0,03 g/L, solúvel em DMSO a 16 g/L, solúvel em etanol igual a 50 g/L, ponto de fusão entre 253 e 255°C e log P igual a 3,1 (AMIDON et al., 1995; AMRI et al., 2012; KRISTL et al., 2009).

Vários estudos têm procurado demonstrar a atividade quimiopreventiva do RES contra o câncer (SHUKLA; SINGH, 2011). KIM e colaboradores (2008) observaram que o tratamento com RES aumenta a expressão de NDRG2 em células de MEL B16F10 e reduz a atividade da enzima tirosinase, em aproximadamente 30 a 45% (KIM et al., 2008), além de atuar na *downregulation* da proteína MITF, conforme Figura 2 (CHANG, 2012).

Bhattacharya, Darjatmoko e Polans (2011) avaliaram os efeitos do RES na migração celular e na invasão do MEL. Os resultados sugeriram que o RES pode reduzir as propriedades de células malignas altamente invasivas, por inativação da proteinaquinase, sendo uma opção atraente para o tratamento de MEL (BHATTACHARYA et al., 2011). Além disso, Kim (2012) avaliou o papel do óxido nítrico (NO) durante a apoptose induzida pela capsaicina e pelo RES em células humanas de MEL A375. Os resultados demonstraram que estas substâncias isoladas ou associadas são capazes de inibir o crescimento celular e promover a apoptose pelo aumento da concentração de NO nas células A375 (KIM, 2012).

Os principais sítios de ação do RES na terapia antitumoral do melanoma encontram-se no interior do melanócito (Figura 3). Desta maneira, se faz necessário a internalização celular de RES.

Figura 3. Melanócito e mecanismo de melanogênese (adaptado de QIAGEN© 2009).



Um estudo demonstrou que microesferas, as quais são partículas esféricas constituídas por polímeros, normalmente maiores do que 500 nm podem ser internalizadas também por células não-fagocíticas B16 de melanoma. As microesferas com diâmetro menor do que 200 nm são internalizadas em sua maioria (80%) através da via mediada por clatrina. Já as microesferas de 500 nm são internalizadas através da via independente de clatrina. Os pesquisadores sugerem que as partículas de maiores dimensões (maiores que 200 nm e menores do que 1,0 μm) são internalizadas principalmente por endocitose mediada por caveolina (REJMAN et al., 2004).

1.3 Mecanismos de internalização celular utilizados por sistemas de liberação de fármacos

Os fármacos podem atuar biologicamente nas células por diferentes mecanismos, sendo que alguns efeitos biológicos só são evidenciados quando há a internalização celular da substância ativa. Assim, há a necessidade de que esse fármaco consiga passar através da membrana celular para que consiga exercer sua função (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009).

O diâmetro de nanopartículas é um pré-requisito para uma efetiva transfecção celular. Nanopartículas lipídicas sólidas normalmente apresentam distribuição heterogênea de tamanho que varia de 100 nm a 1,0 μm , o que poderia contribuir para que diferentes mecanismos de internalização celular fossem adotados pelas células (REJMAN et al., 2004).

A internalização celular das nanopartículas pelas células não depende apenas do seu tamanho, mas também do revestimento das superfícies e da carga. Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas revestidas com carboxidextrano foram internalizadas por células-tronco mesenquimais humanas e a eficácia de internalização foi relacionada aos grupos

carboxilas na superfície das nanopartículas (MAILÄNDER et al., 2008). Nanopartículas catiônicas de D,L-polilactida (PLA)-NP apresentaram maior internalização em células Hela do que PLA-NP aniônicas (DAUSEND et al., 2008). A internalização das nanopartículas depende também do comprimento da superfície de revestimento ou do tipo de célula (CHANG et al., 2006; XIA et al., 2007). Entretanto, os mecanismos endocíticos específicos pelo qual as nanopartículas são internalizadas nas células são desconhecidos (ZHANG; MONTEIRO-RIVIERE, 2009).

De acordo com as características físico-químicas dos nanocarreadores e do direcionamento natural das células, principalmente dois mecanismos de internalização celular podem ocorrer: a fagocitose e a endocitose (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009).

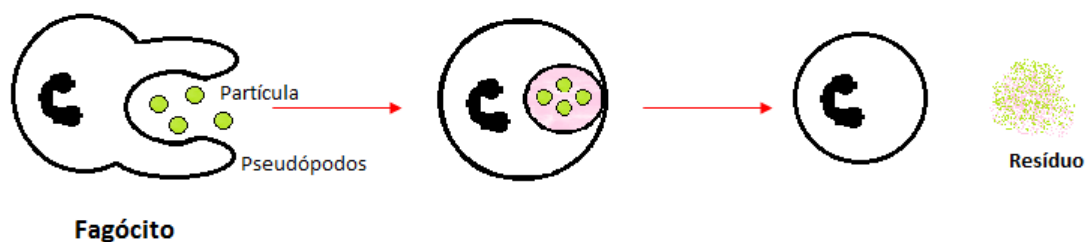
A fagocitose é um mecanismo de internalização celular de partículas relativamente grandes (maiores que 0,5 μm) em vacúolos, através de mecanismos independentes de clatrina; no entanto, pode ser ativada pela interação de algumas moléculas da superfície da partícula com receptores presentes nos fagócitos (Figura 4). As partículas podem ser reconhecidas diretamente, mas na maioria dos casos são mediadas por opsoninas, como, por exemplo, anticorpos que recobrem as partículas e, então, são reconhecidos por receptores específicos (RABINOVITCH, 1995).

A fagocitose ocorre principalmente em células especializadas, as quais são também denominadas de fagócitos profissionais, dentre eles destacam-se os macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas. Porém, outros tipos de células, chamadas de fagócitos não-profissionais, também podem apresentar atividade fagocítica, entre elas os fibroblastos, células epiteliais e endoteliais (ADEREM; UNDERHILL, 1999; HILLAIREAU; COUVREUR, 2009; RABINOVITCH, 1995).

O mecanismo de internalização celular por fagocitose apenas é desejável quando há o direcionamento do tratamento para as células fagocitárias, como, por exemplo, o direcionamento do fármaco antiviral em macrófagos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SCHÄFER et al., 1992). Em contrapartida, a fagocitose de sistemas de liberação nanoestruturados é uma das principais barreiras biológicas, uma vez que a fagocitose promove a remoção do sistema de liberação do organismo (OWENS; PEPPAS, 2006).

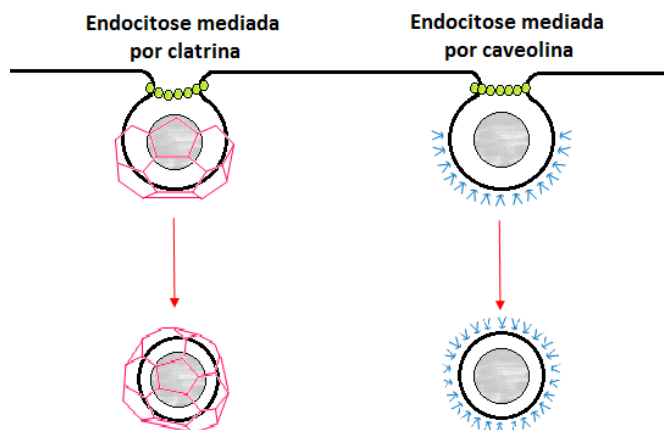
Assim, pode-se utilizar da PEGlação das nanopartículas para evitar a opsonização e, conseqüentemente, a fagocitose dos sistemas de liberação. Para isso, a superfície das nanopartículas pode ser revestida por tensoativos, como, por exemplo, os poloxamers, ésteres de polietileno e polissorbatos, os quais poderiam contribuir para a redução da adsorção de opsoninas *in vitro* e a internalização de nanopartículas nos macrófagos (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009; OWENS; PEPPAS, 2006; YOO et al., 2010).

Figura 4. Fagocitose de partículas (adaptado de (MOSBY, 2013)).



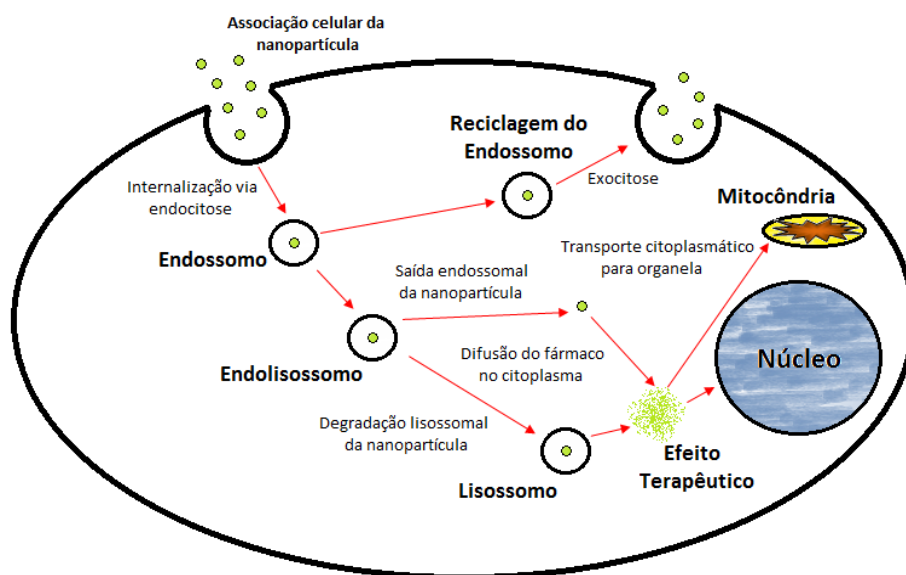
Enquanto a fagocitose é restrita para células especializadas, outros caminhos de endocitose podem ser evidenciados em praticamente todas as células, dentre: endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina, macropinocitose e endocitose independente de clatrina e caveolina (FARAJI; WIPF, 2009; MCMAHON; BOUCROT, 2011), sendo que estes quatro mecanismos necessitam de receptores específicos para a entrada das partículas na célula (HILLAIÉAU; COUVREUR, 2009). A Figura 5 demonstra uma ilustração dos mecanismos de internalização de partículas através de endocitose.

Figura 5. Internalização de partículas através de endocitose mediada por clatrina e endocitose mediada por caveolina (adaptado de (HILLAIÉAU; COUVREUR, 2009)).



As partículas que são internalizadas nas células por endocitose são degradadas no interior de lisossomos, os quais apresentam no seu interior enzimas capazes de degradar material orgânico. Assim, os sistemas de liberação que são internalizados pelo mecanismo de endocitose podem ser adaptados para se tornarem metabolizáveis nos lisossomos, para que o fármaco seja liberado no interior da célula pela biodegradação lisossômica, conforme demonstrado na Figura 6 (DOHERTY; MCMAHON, 2009; REJMAN et al., 2004).

Figura 6. Fases da entrega citosólica de substâncias terapêuticas a partir de nanocarreadores por endocitose (adaptado de (REJMAN et al., 2004))



A endocitose mediada por clatrina é o principal mecanismo de internalização de uma variedade de complexos ligante-receptor, e normalmente está destinada à degradação lisossomal, ao passo que a endocitose não-dependente de clatrina leva ao acúmulo endossomal. Assim, a escolha dos ligantes de superfície das nanopartículas pode permitir a entrega controlada para os lisossomos ou endossomas. Muitos ligantes têm sido utilizados com esse objetivo, tais como a riboflavina, transferrina e ácido nicotínico que utilizam a endocitose mediada por clatrina como mecanismo de internalização e ácido fólico e lipoproteína de baixa densidade (LDL) que utilizam a endocitose mediada por caveolina (BAREFORD; SWAAN, 2007).

A caveolina consiste da invaginação da membrana plasmática de partículas de 50 a 80 nm de tamanho constituídas por colesterol, esfingolipídios, receptores e caveolinas. A macropinocitose é uma forma de endocitose relacionada à invaginação da membrana celular e promove uma via não-invasiva de endocitose de macromoléculas. Existem outros tipos de mecanismos de internalização que não envolvem nenhum dos processos descritos acima. A endocitose de vários receptores de membrana pode também ocorrer através da via de *lipid rafts*, a qual fornece uma plataforma para a ligação de receptores, adaptadores, reguladores e outros *downstream* de proteínas como complexos sinalizadores, além de poderem se unir a caveolina (HILLIAIREAU; COUVREUR, 2009).

1.4 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs)

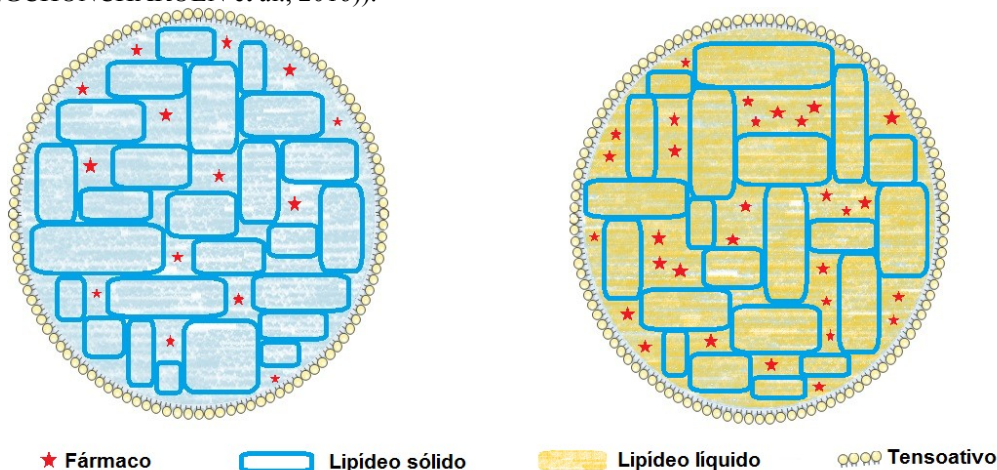
Segundo definições do Food and Drug Administration (FDA), as nanopartículas são qualquer material com dimensões entre 1 e 100 nm ou produtos finais com dimensões de até 1 µm que exibam propriedades ou fenômenos, incluindo propriedades físicas ou químicas ou

efeito biológico (APOPA et al., 2009; AUFFAN et al., 2009; DOWLING et al., 2004; HOWARD et al., 2006; JAIN et al., 2006; NUTRITION, 2012). A comunidade científica tem apresentado grande interesse em sistemas com dimensões nanométrica devido à variedade em suas aplicações e inúmeros benefícios biológicos, sendo que as nanopartículas produzidas podem ser formadas a partir de material lipídico ou polimérico.

Ao patentarem um método de produção de nanopartículas lipídicas (NL), Müller e Lucks (1996) introduziram o termo nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (MÜLLER; LUCKS, 1996). As NLS são nanopartículas lipídicas (NL) de primeira geração, as quais são obtidas utilizando apenas lipídios sólidos à temperatura ambiente (MÜLLER et al., 2007).

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) são NL de segunda geração, as quais foram originadas a partir de modificações nas NLSs (MÜLLER et al., 2007). Os dois tipos são baseados em lipídeos sólidos. Entretanto, podem ser distinguidos pelas estruturas internas. As NLSs apresentam lipídeos sólidos e os CLNs são constituídos por uma porcentagem adicional de lipídeo líquido, causando imperfeições na rede cristalina (MEHNERT; MÄDER, 2001a; SOUTO et al., 2007), conforme demonstrado na Figura 7. Tais imperfeições também podem ser observadas em NLSs, desde que haja a utilização de misturas de lipídeos sólidos com características estruturais distintas, podendo aumentar assim a eficiência de encapsulação de fármacos (KUO; LIANG, 2011; KUO; WANG, 2013; MEHNERT; MÄDER, 2001a).

Figura 7. Imagem demonstrando a organização da matriz lipídica de NLSs composta por apenas um lipídeo sólido (esquerda) e as imperfeições da organização da matriz da partícula (direita) – CLNs ou NLSs composta por mistura de lipídeo sólido, distorcendo a formação de um cristal perfeito (adaptado de (YINGCHONCHAROEN et al., 2016)).



As nanopartículas lipídicas têm sido muito estudadas como sistemas de liberação de fármacos com propriedades antitumorais na terapia do melanoma.

Com o cenário biológico complexo dos cânceres é fundamental a identificação de propriedades que possam maximizar o acúmulo das nanopartículas no sítio de ação, diminuindo

assim a toxicidade do fármaco e os efeitos colaterais. Os sistemas biológicos patológicos apresentam características peculiares em relação ao seu metabolismo, morfologia celular e microambiente (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Conhecendo-se tais características é possível identificar biomarcadores específicos (anticorpos, aptâmeros, peptídeos e pequenas moléculas), os quais podem ser ligados na superfície das nanopartículas, para um direcionamento efetivo da liberação do fármaco no local da ação (HILLLAIREAU; COUVREUR, 2009; JAIN et al., 2013).

Além dos biomarcadores específicos, pode-se ainda utilizar de interações não específicas, como, por exemplo, as ligações de van der Waals, afinidade eletrostática e estérica, os quais podem prever a propensão à adesão e à internalização das nanopartículas (SAKAMOTO et al., 2010b). Assim, a escolha dos componentes estruturais das nanopartículas (lipídeos, tensoativos ou polímeros, Tabela 1) pode melhorar o direcionamento de fármacos para o tecido tumoral (KUO; CHEN, 2010; KUO; LIANG, 2011); impedir a opsonização e consequente redução da degradação das nanopartículas pelo sistema imune (AMELLER et al., 2003; GABIZON; MARTIN, 1997; OWENS III; PEPPAS, 2006); aumentar a interação das nanopartículas com a membrana celular tumoral (NA et al., 2003; SONVICO et al., 2005; WONG et al., 2006); alterar funções normais das organelas e induzir apoptoses, aumentando a citotoxicidade no tecido tumoral (KUO; WANG, 2013; PARLO; COLEMAN, 1984; RISTORCELLI et al., 2008).

Tabela 1. Relação de matérias-primas que podem ser utilizadas na composição estrutural de nanopartículas para melhorar o direcionamento de fármacos na terapia antitumoral.

Matérias-primas que podem ser utilizadas no preparo das nanopartículas	Benefícios na terapia antitumoral	Referências
Polissacarídeos; poliacrilamida; álcool polivinílico; polivinilpirrolidona; PEG; copolímeros contendo PEG (poloxamers, poloxaminas, polissorbatos e PEG copolímero).	Impedem a ligação de opsoninas na superfície das nanopartículas e consequente reconhecimento das nanopartículas pelo sistema fagocítico mononuclear, fazendo com que as mesmas permanecem por mais tempo na corrente sanguínea.	(HONG et al., 1999; LABARRE et al., 2005; MALAM et al., 2009; OWENS III; PEPPAS, 2006; SHENG et al., 2009)
Colesterol	Células tumorais captam cerca de 100 vezes mais lipoproteína de baixa densidade (LDL) do que células normais, devido ao aumento de receptores para lipídeos pelas células tumorais para a síntese de membrana durante a divisão celular associado ao processo de transformação maligna do câncer. Assim, a utilização de LDL tem sido proposta como um veículo de fármaco para os agentes anticancerígenos.	(ADES et al., 2001; ALLISON; MOGHISSI, 2013; GAL et al., 1981; JAIN et al., 2013; JIN et al., 2011; LUNDBERG, 1987; MASQUELIER et al., 1986; RUDLING et al., 1983)
Ácidos graxos poli-insaturados (ácido α-linolênico; ácido linoleico; ácido araquidônico, ácido eicosapentaenoico e ácido docosaexaenoico).	São facilmente incorporados na membrana celular do tumor, resultando na ruptura da estrutura da membrana e fluidez da mesma. Reduzem a progressão tumoral por modular a expressão de p53, p16 e p27, regulando o ciclo celular. Além de aumentar a morte celular por induzir a apoptose e necrose tecidual.	(FALCONER et al., 1994; FIELD; SCHLEY, 2004; JARACZ et al., 2005)
Tensoativos catiônicos	Promove uma ligação através da interação eletrostática com as cargas negativas dos grupos de fosfolipídeos preferencialmente expressos nas células endoteliais tumorais.	(BYRNE et al., 2008; KRASNICI et al., 2003; KUNSTFELD et al., 2003; RAN et al., 2002)

Ácido fólico	O ácido fólico é importante na formação de novas células através de sua participação na biossíntese de bases nucleotídicas. Os receptores para folato estão aumentados em células cancerígenas. Além disso, apenas as células malignas transportam conjugados de folato, as células normais não transportam; desta maneira, a ligação do ácido fólico em sistemas de liberação melhora o direcionamento de fármacos para células tumorais.	(BYRNE et al., 2008; JARACZ et al., 2005; KUKOWSKA-LATALLO et al., 2005; LEAMON; REDDY, 2004)
Ácido hialurônico	O ácido hialurônico é um componente da matriz extracelular que tem a propriedade de se ligar especificamente ao CD44, uma proteína da membrana extracelular, que regula várias respostas celulares. Em células tumorais há um aumento na expressão de CD44, enquanto em células normais há uma diminuição desta proteína, o que faz com que o CD44 seja um marcador superficial de células tumorais.	(CHOI et al., 2010; CHOI et al., 2011; YANG et al., 2013)

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas para a incorporação do trans-resveratrol, bem como a avaliação *in vitro* e *in vivo* da penetração cutânea das nanopartículas e avaliação da sua atividade e eficácia em alterar mecanismos celulares para a terapia tópica do melanoma.

Objetivos específicos:

- ✓ Desenvolver NLS;
- ✓ Estudar a estabilidade das NLSs em relação ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersidade e potencial zeta;
- ✓ Caracterizar as NLSs empregando as técnicas de microscopia de força atômica e calorimetria diferencial exploratória (DSC);
- ✓ Avaliar a eficiência de encapsulamento do RES;
- ✓ Avaliar a penetração cutânea *in vitro* pela célula de difusão de Franz
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-edematogênica *in vivo* das NLSs através do ensaio de edema de pata em camundongos;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade das NLSs em linhagem imortalizada de queratinócitos (HaCat) e células de melanoma murino B16F10 através dos ensaios de MTT e calceína;
- ✓ Avaliar as alterações no ciclo celular após o tratamento das células com as NLSs;
- ✓ Avaliar a internalização celular das NLSs.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Ácido esteárico (Impex, Brasil), polissorbato 80 (Tween 80, Oxiten, Brasil), fosfatidilcolina de soja (Lipoid S100, Lipoid AG, Switzerland), Poloxamer 407 (Pluronic® F127, Sigma-Aldrich, USA), brometo de cetiltrimetilamônio (Sigma-Aldrich, USA), *trans*-resveratrol (Suzhou Vitaj, China), álcool etílico (Sigma-Aldrich, USA), Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich, USA). Amicon Ultra 4 (Celulose regenerada, 100.000 MWCO, Millipore, Billerica, USA), Vivaspin® 2 Centrifugal Concentrator (Celulosetriacetato (CTA), 10.000 MWCO, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) e membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 µm (Chromafil Xta). Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), doxorrubicina (pó para suspensão injetável), agarose (normal), agarose (baixo ponto de fusão) e tripsina.

3.2 Métodos

3.2.1 Produção das nanopartículas lipídicas sólidas

Para o preparo das NLSs empregou-se metodologia adaptada descrita por Lim e colaboradores (2004) e Mehnert e Mäder (2001), a qual utiliza o método da sonicação. Para o desenvolvimento das formulações usou-se o estudo de delineamento para selecionar a formulação que apresentasse melhor estabilidade. Assim, as formulações desenvolvidas e selecionadas foram compostas por 5,0% de ácido esteárico e fosfatidilcolina de soja (FS), na fase oleosa, além de polissorbato 80, poloxamer 407 e glicerina na fase aquosa. Para o preparo das NLSs, a fase aquosa foi aquecida, a aproximadamente 85° C, e vertida sobre a fase oleosa aquecida à mesma temperatura. A mistura foi agitada, utilizando um agitador magnético durante 1 minuto, mantendo o aquecimento. Em seguida, a pré-emulsão formada foi sonicada durante 20 minutos (18,75 µm de amplitude, o que corresponde a 25% da capacidade do equipamento, e 14-19 W de potência, para a probe de 1/2"). As amostras foram mantidas em banho de gelo, pois testes preliminares demonstraram que o banho de gelo promoveu a formação de partículas com diâmetro e índice de polidispersidade menores do que quando utilizado banho de água à temperatura ambiente. Esse processo de obtenção das NLSs foi o mesmo para todas as formulações testadas.

A incorporação de RES foi feita na fase oleosa utilizando a mesma abordagem experimental utilizada na preparação de NLSs livres de fármaco. Incorporou-se 0,25 mg/mL do fármaco no sistema (DETONI et al., 2012).

Com o objetivo de eliminar o titânio que pode ser desprendido no processo de sonicação, as formulações foram centrifugadas a 3500 rpm, durante 10 minutos (AGAYAN et al., 2004).

3.2.2 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e análise do potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas foi determinado através de espalhamento dinâmico da luz (*dynamic light scattering*, DLS, Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK). As dispersões de nanopartículas foram diluídas em água Milli-Q (10 µL/mL) e mantidas em frascos de cintilação isentos de poeira. Os frascos foram colocados na câmara de análise, de modo que feixes de luz pudessem atravessar a dispersão em toda a sua extensão. As condições de ensaio foram: ângulo de espalhamento: 90°; temperatura: 25° C; comprimento de onda do laser: 633 nm e índice de refração: 1,311. Foram realizadas 3 determinações do diâmetro médio e do índice de polidispersidade, sendo calculados a média e o desvio padrão. As análises foram feitas nos tempos 24 horas, 7, 15, 30, 60 e 90 dias após o preparo das formulações. As formulações foram armazenadas em geladeira (4 ± 2 °C) durante todo o período de análise.

Para as análises de potencial zeta, as NLSs foram diluídas em água Milli-Q (10 µL/mL). O potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética, utilizando a equação Helmholtz-Smoluchowski (Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK). As amostras foram colocadas na célula eletroforética e foram realizadas 3 determinações do potencial de superfície para cada amostra, calculando-se a média e o desvio padrão, sendo que as análises foram feitas nos tempos 24 horas, 7, 15, 30, 60 e 90 dias após o preparo das formulações. As formulações foram armazenadas em geladeira (4 ± 2 °C) durante todo o período de análise.

A análise dos resultados foi conduzida utilizando o *software* presente no sistema.

3.2.3 Análise microscópica

A determinação da morfologia das NLSs por microscopia de força atômica (MFA), empregando microscópio de força atômica Bruker modelo Dimension Icon. Aplicou-se uma gota das NLSs sob o substrato de mica. Após, para a secagem das amostras, 10 µL das mesmas foram centrifugados, utilizando Spin Coater Model KW-4A (SPI® Supplies, USA), em 2 estágios, sendo que no primeiro estágio as amostras foram centrifugadas durante 30 segundos a 500 rpm e o segundo estágio, durante 60 segundos a 5.000 rpm. A placa de mica foi então inserida no leitor do microscópio e as amostras foram analisadas no modo "*tapping*". Fotomicrografias foram obtidas e analisadas no *software* NanoScope Analysis, versão 1.40.

3.2.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As medidas de calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram realizadas utilizando calorímetro diferencial de varredura (DSC), DSC Q10, TA Instruments, acoplado à um módulo de resfriamento por N₂. Para as análises, as formulações de nanopartículas foram liofilizadas durante 24 horas. Uma alíquota de 5 mg de cada componente presente nas formulações, assim como cada formulação desenvolvida, foram adicionadas em cadinho de alumínio selado. As amostras foram aquecidas de -50 a 300 °C, numa razão de 10°C/min, e as curvas de DSC foram obtidas utilizando atmosfera de N₂(g) num fluxo de 50 mL/min.

As amostras analisadas por DSC foram as seguintes matérias-primas: ácido esteárico, fosfatidilcolina de soja, polissorbato 80, poloxamer 407, glicerina, brometo de cetiltrimetilamônio, phenonip e *trans*-resveratrol, bem como as formulações desenvolvidas F1, F1.RES, F2 e F2.RES.

Os dados foram plotados através de *software* Origin 8 (OriginLab Corporation) e analisados pelo *software* TA Universal Analysis.

As análises de DSC foram realizadas no Instituto de Química, no Departamento de Físico-Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Câmpus Araraquara, em colaboração com o Profa. Dra. Sandra Pulcinelli.

3.2.5 Validação da metodologia analítica para a quantificação de RES nas NLSs

A metodologia analítica foi validada para a quantificação de RES nas NLSs de acordo com os guias do *International Conference on Harmonisation* (ICH) (ICH, 2005) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL, 2003), empregando espectrofotômetro UV-VIS (*HP UV-Visible ChemStation software*, Hewlitt-Packard® 8453), seguindo os parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, especificidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez.

- Linearidade: foram realizadas três curvas analíticas em triplicata com solução de RES em diferentes concentrações (1,0 - 20,0 µg/mL) em água:etanol (1:1). Todas as soluções foram preparadas no momento da sua utilização e analisadas por espectroscopia UV-VIS. A linearidade foi avaliada através da análise de regressão linear (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).
- Especificidade: a especificidade foi avaliada através da análise das formulações NLSs-sem fármaco, depois de realizado o mesmo processo de filtração, as quais as NLSs-com RES foram submetidas. A especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos.

- Precisão: a precisão intradia e interdia foram mensuradas a partir de análises sucessivas de 9 soluções de RES (10 µg/mL), seguidas do cálculo da média, desvio padrão e desvio padrão relativo (BRASIL, 2003).
- Exatidão: foi calculada a porcentagem de recuperação de concentrações conhecidas de RES a partir de três soluções de RES (1,0; 10,0 e 20,0 µg/ml) (BRASIL, 2003). De acordo com a regulamentação estabelecida pela ANVISA, os resultados não devem exceder 5%.
- Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ): foram calculados utilizando valores de DP e inclinação das curvas analíticas obtidas. Os LD e LQ teóricos foram calculados pelas equações 1 e 2, respectivamente (BRASIL, 2003).

$$LD = (DP \times 3,3)/IC \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = (DP \times 10)/IC \quad (\text{Equação 2})$$

em que DP = DP do intercepto com o eixo de Y e IC = inclinação da curva analítica.

- Robustez: foram realizados testes de variação do comprimento de onda (300, 306 e 312 nm) e diferentes marcas do solvente etanol (BRASIL, 2003).

3.2.6 Quantificação do RES presente nas NLSs

Para a quantificação do RES foi utilizada metodologia indireta para análise do teor de RES incorporado às NLSs. O objetivo desse teste foi separar as nanopartículas, as quais permaneceriam retidas na membrana de filtração, e quantificar a quantidade de fármaco livre de encapsulação, o qual passaria pela membrana. A eficiência de encapsulação foi então calculada pela Equação 3. Para a realização deste teste utilizou-se 2 dispositivos de membrana: Amicon Ultra 4 (Celulose regenerada, 100.000 MWCO, Millipore, Billerica, USA) e a Vivaspin® 2 Centrifugal Concentrator (Celulose triacetato (CTA), 10.000 MWCO, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia). Inicialmente, aplicou-se uma solução com quantidade conhecida de RES, sendo esta centrifugada a 30.000 rpm, durante 30 min, a fim de coletar, aproximadamente, 100% do RES, mostrando que o RES não ficou retido na membrana. As análises foram realizadas em triplicata.

$$EE\% = \frac{\text{quantidade inicial} - \text{concentração analítica} \times 100}{\text{quantidade inicial}} \quad (\text{Equação 3})$$

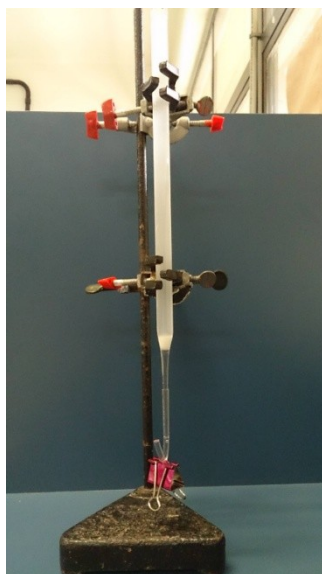
Além disso, propôs-se a separação do RES encapsulado nas NLS e do RES livre por cromatografia por exclusão de tamanho, através de Sephadex G-50. Foram coletadas frações de

2 mL, as quais foram analisadas por espectrofotometria em UV-visível (HP8453, Hewlett-Packard), medindo-se o espalhamento de luz em $\lambda=410$ nm.

A metodologia utilizada para a realização desse ensaio foi adaptada do trabalho publicado por Wang et al. (2011). A coluna foi preparada utilizando 6 g de Sephadex G-50, os quais foram previamente hidratados com água Milli-Q durante 24 horas. A coluna (30,0 x 1,5 cm) foi então preenchida com o Sephadex G-50 hidratado e condicionada com tampão fosfatossalina (PBS) pH 7,4, conforme demonstrado na Figura 8.

Para a realização do teste, 200 μ L da formulação foram dispersos em 2,0 mL de tampão PBS pH 7,4 e, então, inseridos na coluna para separação. O tampão PBS pH 7,4 foi empregado na eluição da amostra e frações seriadas de 2 mL foram coletadas para posterior leitura do espalhamento de luz ou da absorção em espectrofotômetro. Foram coletadas ao todo 70 frações. Para a detecção e quantificação, foram utilizados os comprimentos de onda em 306 nm para se detectar e quantificar o fármaco não encapsulado e em 410 nm para se detectar as frações das NLSs (com fármaco encapsulado).

Figura 8. Coluna de separação utilizada para realizar análise cromatográfica por exclusão de tamanho, empregando Sephadex-G50.



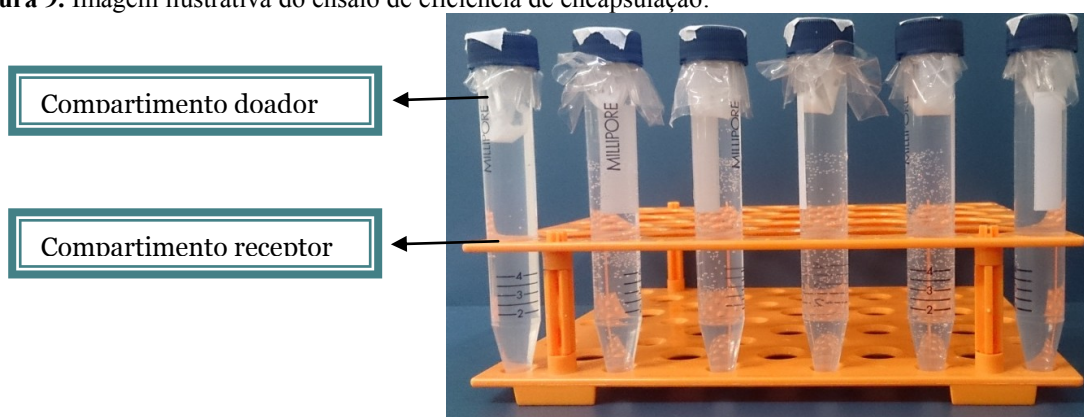
A eficiência de encapsulação foi também verificada empregando metodologia adaptada descrita por Gokce et al. (2012). Uma membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 μ m (Chromafil Xta) foi colocada em tubo de centrifugação de 15 mL, de maneira a formar um compartimento doador, no qual as amostras pudessem ser colocadas e ficassem isoladas do compartimento receptor e os tubos foram preenchidos (14mL) com uma solução 1:1 de etanol e água (Figura 9). Após colocados 300 μ L de cada formulação no compartimento doador (n=3), os tubos foram centrifugados durante 1 hora a 5.000 rpm. Após centrifugação, uma alíquota do

compartimento receptor (1mL) foi então diluída com 1 mL da solução de etanol:água (1:1) e o conteúdo de RES foi analisado em espectro UV, quantificando o RES não encapsulado. A eficiência de encapsulação (EE%) e a capacidade de carga (CC%) foi então calculada pelas Equações 3 e 4, respectivamente.

$$CC\% = \frac{\text{massa inicial de RES} - \text{massa RES livre} \times 100}{\text{massa total de lipídeos}} \quad (\text{Equação 4})$$

A massa de RES livre foi determinada a partir da leitura da absorção em $\lambda = 306$ nm das frações separadas pela filtração em coluna e reunidas em um único recipiente.

Figura 9. Imagem ilustrativa do ensaio de eficiência de encapsulação.



3.2.7 Penetração cutânea *in vitro* das NLSs em pele de suínos

A penetração de NLSs marcadas com 6,0 $\mu\text{g/mL}$ rhodamina PE (16:0 Liss Rhod PE, Avanti®) ou base galênica All Base Creme Oil Free® contendo a mesma concentração de rhodamina PE foram investigadas de acordo com protocolo *in vitro* previamente publicado (ALNASIF et al., 2014).

Para o ensaio de penetração cutânea das formulações foi utilizada peles de orelhas de porco obtidas em abatedouro e processadas logo após o abate do animal. As orelhas foram limpas com água corrente e posteriormente dessecadas com ajuda de tesoura e bisturi. Vasos sanguíneos, gordura e tecidos não desejados foram retirados, sendo que somente a derme e a epiderme foram isoladas. A pele dermatomizada, a fim de padronizar a espessura da mesma (0,5 mm), foi acondicionada entre o compartimento doador e o receptor da célula de Franz, de forma que o estrato córneo foi mantido em contato com a formulação e a derme em contato com a solução receptora (PRIMO et al., 2008).

Foram aplicados 30 $\mu\text{L/cm}^2$ das formulações nas superfícies das peles de suínos, as quais foram incubadas durante 6 horas a 32° C. Após a remoção das peles das células de

difusão de Franz, as amostras foram lavadas com soro fisiológico para remover o excesso de fluoróforo e cortadas para remover a parte da pele que não entrou em contato com a formulação; e, posteriormente, inseridas em um criomolde com meio para congelamento e colocadas em contato com nitrogênio líquido até que o líquido se tornasse um bloco sólido. Os criomoldes foram armazenados a -80°C durante 24 horas. Então, realizaram-se cortes histológicos (30 µm) utilizando criostato (Leica CM 1850).

As imagens fluorescentes foram obtidas por meio de microscópio de rotina invertido (Eclipse TS100; Nikon®), com controlador DS-L3, analisadas por meio do *software* NIS-Elements (Nikon®). As análises foram realizadas de acordo com os procedimentos previamente publicados (BORGIA et al., 2008).

3.2.8 Modelo de eficácia *in vivo* através da atividade antinociceptiva e anti-edematogênica pelo teste de edema de pata em camundongos

Há grande interesse na investigação da atividade analgésica de fármacos quando veiculados em sistemas de liberação de fármacos, uma vez que reside no fato de que as mesmas têm uma vasta aplicação em vários processos patológicos. Vários modelos *in vivo* são utilizados na pesquisa de compostos com atividade analgésica. A ação antinociceptiva é definida como a ação ou processo de bloqueio da detecção de um estímulo doloroso ou prejudicial por neurônios sensoriais (WANG et al., 2005).

Após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa no uso animal (CEUA) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Despacho nº 68/2015, Anexo A), as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva das NLSs foram avaliadas pelo teste de edema de pata induzido por carragenina e ensaio de pressão plantar em camundongos, respectivamente.

Para isso, conduziu-se um estudo experimental, no qual camundongos machos (~30g) da raça *Swiss* foram separados em grupos contendo 7 animais, seguindo a técnica de aleatorização simples. Os animais foram devidamente alojados em gaiolas no biotério do Departamento de Fármaco e Medicamentos desta faculdade, conforme o padrão sanitário do biotério recomendado pelo CEUA. O experimento foi conduzido duas vezes, totalizando 14 animais por grupo de estudo.

O cálculo do tamanho amostral foi realizada em relação a variabilidade observada usualmente no teste de Randall-Selitto (~25%), o qual é uma ferramenta para avaliar os efeitos de agentes analgésicos sobre os limiares de resposta à estimulação de pressão mecânica, que tem sido muito utilizada por diversos pesquisadores na avaliação da hiperalgesia inflamatória (RANDALL, 1957; SANTOS-NOGUEIRA et al., 2012).

Para a condução do ensaio, 100 µL de suspensão de carragenina a 1% foi injetada na pata traseira esquerda dos animais, seguidas da administração das formulações (F1.RES e F2.RES),

bem como de uma solução de RES em álcool:água 1:1 (2,5 mg/mL) e um creme comercial de dexametasona (1%), como controles positivos, após 1 hora da aplicação de carragenina. Nenhuma formulação foi aplicada no controle negativo.

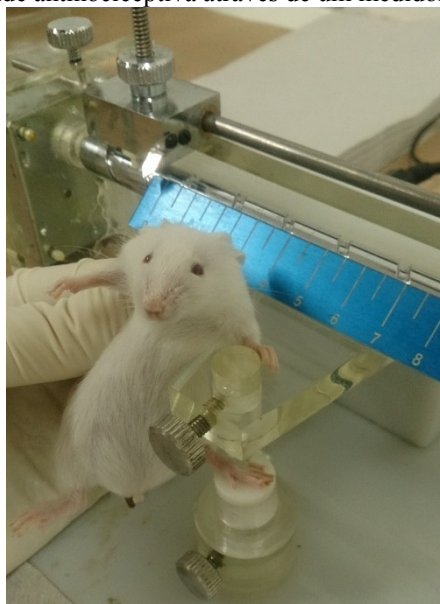
A carragenina promoveu visível vermelhidão e pronunciado inchaço após 1 hora de sua administração plantar. O diâmetro plantar foi mensurado através de paquímetro digital de alta exatidão (Mitutoyo Corp., Japão), conforme demonstrado na Figura 10, nos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 horas após a administração cutânea.

Figura 10. Avaliação do diâmetro plantar dos camundongos, utilizando paquímetro digital.



Além disso, a avaliação da atividade antinocipetiva foi mensurada através de um medidor de analgesia (*Pain With drawal Threshold to Pressure – PWTP*), nos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 horas após a aplicação plantar da carragenina. O limiar nociceptivo (g) foi determinado a partir da força aplicada à superfície dorsal da pata traseira inflamada (g) necessária para que o camundongo retirasse sua pata. A pata foi colocada sob a extremidade plástica do aparelho onde foi exercida uma pressão, a qual foi aumentada gradativamente até que o animal removesse a pata, como sinal indicativo de nocicepção, conforme demonstrado na Figura 11. Foi estabelecido um valor máximo de pressão (*cut-off*) de 150 g para evitar lesões nas patas dos animais (JIN et al., 2015).

Figura 11. Avaliação da atividade antinociceptiva através de um medidor de analgesia.



3.2.9 Avaliação da viabilidade celular utilizando ensaios de MTT e da Calceína

As avaliações da viabilidade celular são dependentes de mudanças fisiológicas das células ou de seu estado fisiológico, como, por exemplo, a sua respiração ativa; e/ou da permeabilidade de sua membrana, mecanismos esses que interferem na captação, retenção e eliminação dos corantes pelas células (JOHNSON et al., 2013).

O ensaio de MTT consiste na quantificação de sal de formazan após redução do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) pela mitocôndria ativa. As células viáveis são capazes de reduzir o MTT ao sal insolúvel formazan, o qual apresenta coloração roxa quando dissolvido com solvente apropriado, como, por exemplo, o dimetilsulfóxido (DMSO). A intensidade da coloração é proporcional ao número de células viáveis e pode ser avaliada empregando espectroscopia a 570 nm (MOSMANN, 1983).

O ensaio de citotoxicidade e viabilidade Live/Dead é um ensaio de fluorescência, que promove um método rápido para avaliar a proporção de células vivas e mortas no sistema de cultura celular de monocamada ou em tecidos, no qual as células são coradas utilizando dois corantes específicos (ZHOU et al., 2011).

Hoechst 33342 é um corante que tem a capacidade de se ligar a moléculas de DNA que emite fluorescência azul quando ligado, este corante é utilizado para corar o núcleo de todas as células. A calceína AM é um corante célula-permeante que pode ser usado para determinar a viabilidade celular na maioria das células eucariotas. Em células vivas, a não fluorescente calceína AM é convertida para calceína verde-fluorescente, após hidrólise do éster de acetoximetilo por esterases intracelulares. Desta maneira, as células viáveis apresentam

coloração azul em seu núcleo (corado pelo Hoechst 33342) e verde em seu citoplasma (corado pela Calceína AM).

Como a variedade de metodologias para mensurar a viabilidade celular, há necessidade de se avaliar qual entre elas possa responder melhor quanto à presença de possíveis elementos tóxicos (ROGERO et al., 2003).

Desta maneira, é importante avaliar se os componentes da formulação não interferem nas leituras dos corantes. Assim, as formulações foram diluídas em água e em meio de cultura, nas mesmas concentrações em que os ensaios seriam realizados, e fez-se leituras para verificar se as absorbâncias e/ou a fluorescência seria aumentadas.

3.2.10 Citotoxicidade das NLSs nas linhagens HaCat e B16F10

A análise de citotoxicidade das formulações (F1, F1.RES, F2 e F2.RES), bem como do RES em solução foram conduzidas, utilizando as linhagens celulares de queratinócitos HaCat e melanoma B16F10.

A linhagem celular de melanoma B16F10 foi gentilmente cedida pela Profa. Dr. Enilza Maria Espreafico da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), a qual foi recebida em criotubo, contendo 0,5 mL da cultura congelada a -80°C, conservadas em gelo seco. Utilizou-se também a linhagem de queratinócitos humanos imortalizados HaCat, a qual foi gentilmente cedida pela Profa. Dr. Christiane Pienna Soares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP).

As amostras foram descongeladas e semeadas em garrafas para cultivo (25 cm³), utilizando meio Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) para as células HaCat e meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) para as células B16F10. O cultivo das células foi realizado em meio com antibióticos e com 10% de soro. As células foram incubadas com densidade de 10⁴ célula/poço em placa de 96 poços, a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 horas com diferentes concentrações de RES e NLSs.

As células foram lavadas com PBS após a remoção dos tratamentos e a viabilidade celular foi mensurada através do ensaio de MTT (GONÇALEZ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014) ou por Live/Dead. Para o ensaio de MTT, acrescentou-se solução a 5,0 mg/mL de MTT em meio sem soro, incubou-se as placas por 3 horas, o MTT foi então removido e 100 µL de DMSO foi acrescentado em cada poço, para a solubilização do sal de formazan. Para o ensaio de Live/Dead, preparou-se a solução a 1 µL/mL de Hoechst 33342 (1µM) e 0.5 µL/mL de Calceína AM em Fluoresbrite®.

3.2.11 Ciclo celular das linhagens HaCat e B16F10 após o tratamento com NLSs

Para a análise do ciclo celular, as células HaCat e B16F10 foram plaqueadas em placa de 24 poços, a uma densidade de 10^5 células por poço. As células foram tratadas com as NLSs durante 12 horas. A análise do ciclo celular foi realizada pela avaliação do conteúdo de DNA. As células foram colhidas, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) com EDTA 5 mM, fixadas em etanol absoluto gelado e armazenados *overnight* a -20°C . Após, as células foram incubadas com RNase A ($0,1\text{ }\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$) a 37°C durante 30 minutos, marcadas com Iodeto de propídeo ($0,02\text{ }\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$) e imediatamente analisado por análise citométrica de fluxo (Guava easyCyte 8HT, Millipore) (VALENTE et al., 2013).

3.2.12 Ensaio de internalização celular nas linhagens HaCat e B16F10

O ensaio de internalização celular foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus, no Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Para o ensaio de internalização celular, as células HaCat e B16F10 foram plaqueadas em placas de 12 poços na concentração de 10^5 células/poço, durante 24 horas. Após, as formulações marcadas com rodamina PE foram utilizadas para o tratamento das linhagens celulares. Após 4 horas de tratamento, as células foram lavadas com PBS e removidas com tripsina e colocadas em tubos de citometria de fluxo e armazenadas em gelo até a análise. O citômetro de fluxo criou um fluxo contínuo da suspensão da amostra num canal microfluídico e cada objeto individual com sinal de dispersão suficiente pode ser detectado, sendo que as amostras foram analisadas (10.000 eventos por amostra) em citômetro de fluxo FACSCalibur (Beckton Dickinson), usando-se o programa CellQuest 2.8. Quando as células passaram pelo feixe de laser utilizado para a análise, as intensidades de emissão de fluorescência, e as intensidades de dispersão direta e lateral de cada objeto foram detectadas. Foram realizadas medidas para os picos de fluorescência verdes e vermelhos (SEMMLING et al., 2008). A análise da porcentagem das diferentes populações marcadas foi feita utilizando-se o programa FlowJo V10 (Copyright FlowJo, LCC).

3.2.13 Forma de análise dos resultados

Os resultados obtidos referentes aos ensaios de estabilidade em relação ao diâmetro médio das NLSs, análise do potencial zeta e eficiência de encapsulação do RES nas NLSs, bem como os ensaios de citotoxicidade das NLSs, foram submetidos à análise estatística para detecção de diferenças significativas entre as amostras. Inicialmente, os dados foram compilados em *software* BioEstat 5.0 para avaliação da normalidade. Para as análises de estabilidade (diâmetro hidrodinâmico médio, potencial zeta e eficiência de encapsulação), os

quais são amostras dependentes, os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey, para os dados paramétricos, utilizando *software* STATISTICA 7, e pelo teste Friedman, seguidas pela Concordância do Coeficiente de Kendall, para os dados não paramétricos, utilizando *software* BioEstat 5.0. Para o ensaio de citotoxicidade das NLSs, realizou-se a análise de variância ANOVA, seguidos de Teste de Tukey, para os dados paramétricos, pois permite a análise de amostras múltiplas, e o teste de Kruskal-Wallis, ou teste H, para os dados não-paramétricos, utilizando *software* STATISTICA 7 (ANDRADE, 2008). O nível de significância adotado foi ($\alpha = 0,05$).

4. Resultados e Discussão

4.1 Desenvolvimento das NLSs

Na dissertação intitulada “Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas para administração cutânea do *trans*-resveratrol” (Processo FAPESP nº 2011/16888-5), foram desenvolvidas NLS constituídas por ácido esteárico (AE) ou estearato de polioxietileno 40 (EP), fosfatidilcolina de soja (FS) e poloxamer 407 (P407) para a incorporação de RES. A adição de FS ao lipídio fundido promoveu maior estabilidade nas nanopartículas, conforme evidenciado por Müller *et al.* (2000) (MÜLLER *et al.*, 2000a). As formulações possibilitaram a liberação controlada e permeação do RES na epiderme.

Neste contexto, a presente pesquisa propõe a administração tópica de NLS, compostas por AE ou EP, P407/FS e água, acrescentando ao sistema o lipídio behenato de glicerilo (Compritol® 888 ATO, C888), com o objetivo de aumentar a estabilidade das nanopartículas e promover o direcionamento das nanopartículas para as células tumorais. Desta maneira, inicialmente para o desenvolvimento das formulações, foram testadas várias concentrações de C888 e AE ou EP, mantendo-se fixa as concentrações de P407 e FS e fase lipídica (5,0%), de acordo com as concentrações utilizadas na dissertação de mestrado, sendo 3,5% P407 e 1,2% FS (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo como fase lipídica.

	Concentrações (%)										
	F1.AE	F2.AE	F3.AE	F4.AE	F5.AE	F6.AE	F7.AE	F8.AE	F9.AE	F10.AE	F11.AE
Ácido esteárico	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	---
Behenato de glicerilo	---	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Poloxamer 407	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Fosfatidilcolina soja	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Água deionizada	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	Qsp	qsp	Qsp	qsp	qsp

*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

Tabela 3. Formulações desenvolvidas utilizando estearato de polioxietileno (40) e behenato de glicerilo como fase lipídica.

	Concentrações (%)										
	F1.EP	F2.EP	F3.EP	F4.EP	F5.EP	F6.EP	F7.EP	F8.EP	F9.EP	F10.EP	F11.EP
Estearato de polioxietileno (40)	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	---
Behenato de glicerilo	---	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Poloxamer 407	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Fosfatidilcolina soja	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Água deionizada	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	Qsp	qsp	qsp	Qsp	qsp

*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

Os resultados de diâmetro hidrodinâmico médio (nm), assim como o índice de polidispersidade (Pdl) e o potencial zeta das formulações desenvolvidas, estão representados nas Figura 12 a 13.

Figura 12. Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) das formulações desenvolvidas (n=6).

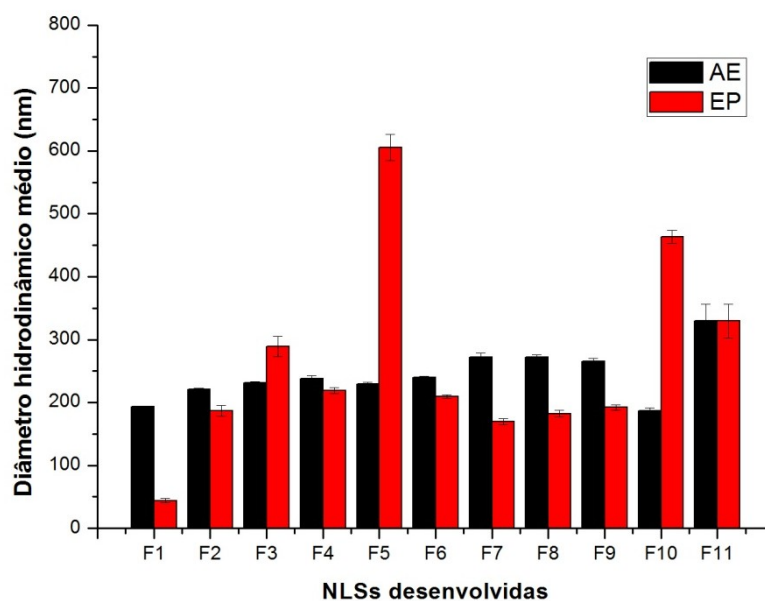


Figura 13. Índice de polidispersidade (Pdl) das formulações desenvolvidas (n=6).

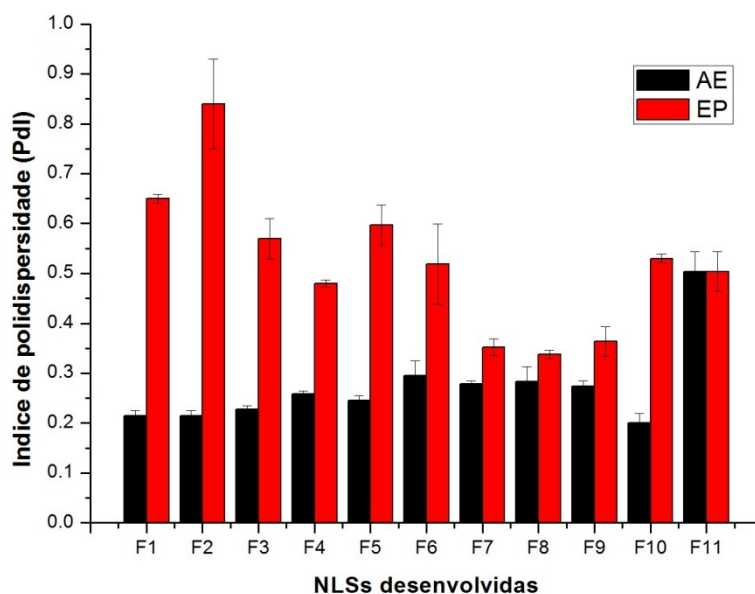
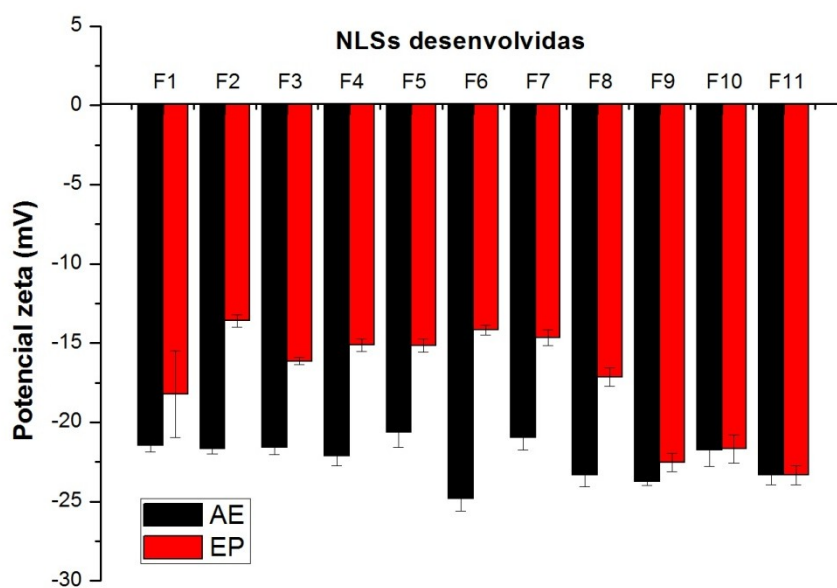


Figura 14. Potencial zeta (mV) das formulações desenvolvidas (n=6).



Na Figura 12 pode-se observar que as formulações com maiores concentrações de AE, produziram NLSs com menores diâmetros hidrodinâmicos médios (~200 nm). As NLSs produzidas com EP apresentaram grande variação no diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, aproximadamente 45 nm para as formulações preparadas apenas com EP e até 600 nm para as formulações preparadas com EP:C888 (3:2).

Na Figura 13 está representado o índice de polidispersidade (Pdl) das formulações desenvolvidas. Verifica-se que elevado Pdl (>0,5) foi observado para as formulações compostas apenas por C888; as demais formulações apresentaram Pdl entre 0,2 a 0,3, demonstrando

relativa homogeneidade na distribuição do tamanho dessas nanopartículas. O elevado PDI para a formulação composta apenas C888 pode ser explicado pelo fato do C888 ser composto por uma mistura de glicerídeos do ácido berrênico e triberrenina. A diferença nas cadeias moleculares desses componenetes faz com que o arranjo estrutural formado nas partículas não seja homogêneo. O aumento do diâmetro hidrodinâmico médio, assim como o aumento no índice de polidispersidade nas partículas formadas pelo C888, também foram evidenciados por SCHWARZ; MEHNERT (1997). As formulações compostas por EP apresentaram valores de $PDI > 0,4$ (Figura 13), o que pode ser um indicativo da presença de uma mistura de estruturas, como, por exemplo, NLSs e micelas (JORES et al., 2004). A presença de hidroxilas presentes no estearato de polioxietileno (40) pode ter contribuído para este quadro, pois os polioxietilenos contribuem positivamente para a formação micelar.

O potencial zeta das formulações desenvolvidas está representado na Figura 14. Pode-se observar que a adição de C888 não promoveu a formação de nanopartículas carregadas positivamente. As formulações compostas por AE apresentam-se mais negativas que as formulações compostas por EP. As formulações compostas por AE apresentam ainda potencial zeta mais próximas a -30 mV, o que pode contribuir para uma estabilização eletrostática das NLSs.

Mediante aos resultados preliminares encontrados, os estudos utilizando EP foram descontinuados, uma vez que as estruturas formadas podem não ser apenas NLSs, além de apresentaram alto índice de polidispersidade, demonstrando alta variação na distribuição do tamanho das nanopartículas e baixos valores de potencial zeta quando comparado com as formulações compostas por AE, que poderiam diminuir a estabilização eletrostática.

Entre as formulações compostas por AE e C888, selecionou-se as formulações F1.AE (composta apenas por 5,0% AE), F6.AE (composta por 2,5% AE e 2,5% C888) e F11.AE (composta apenas por 5,0% C888). Porém, estas formulações apresentaram após 7 dias a floculação do sistema e aumento da viscosidade da amostra. Desta maneira buscou-se alternativas para aumentar a estabilidade das nanopartículas formadas.

Um estudo conduzido por Bhandari e Kaur Indu (2013) desenvolveu nanopartículas contendo AE e C888 como fase lipídica e Tween 80 e FS como sistema tensoativo (ROHIT; PAL, 2013). Mulla e Khazi (2009) demonstraram que ao utilizar T80 e FS como tensoativos há uma redução do diâmetro médio das nanopartículas (MULLA; KHAZI, 2009). Assim, novas formulações foram testadas, sendo removido o P407 e acrescentado o Tween 80 (Tabela 4).

Tabela 4. Formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo (C888) como fase lipídica e polissorbato 80 (T80) e fosfatidilcolina de soja como tensoativos.

	Concentrações (%)		
	F1.T80	F2.T80	F3.T80
Ácido esteárico	5,0	2,5	---
Behenato de glicerilo	---	2,5	5,0
Polissorbato 80 (T80)	3,5	3,5	3,5
Fosfatidilcolina de soja	1,2	1,2	1,2
Água deionizada	qsp	qsp	qsp

*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

Após o preparo das formulações, acompanhou-se a estabilidade das mesmas durante 60 dias, avaliando-se o diâmetro hidrodinâmico médio, PDI e potencial zeta. Os resultados estão representados na Figura 15 a 16.

Figura 15. Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e compritol 888 ATO como fase lipídica e Tween 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (n=6).

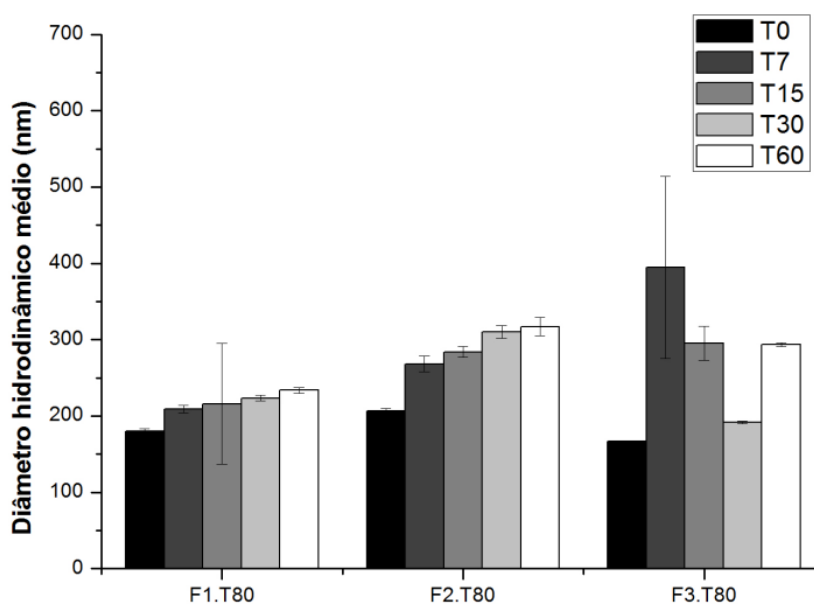


Figura 16. Índice de polidispersidade (Pdl) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e compritol 888 ATO como fase lipídica e Tween 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (n=6).

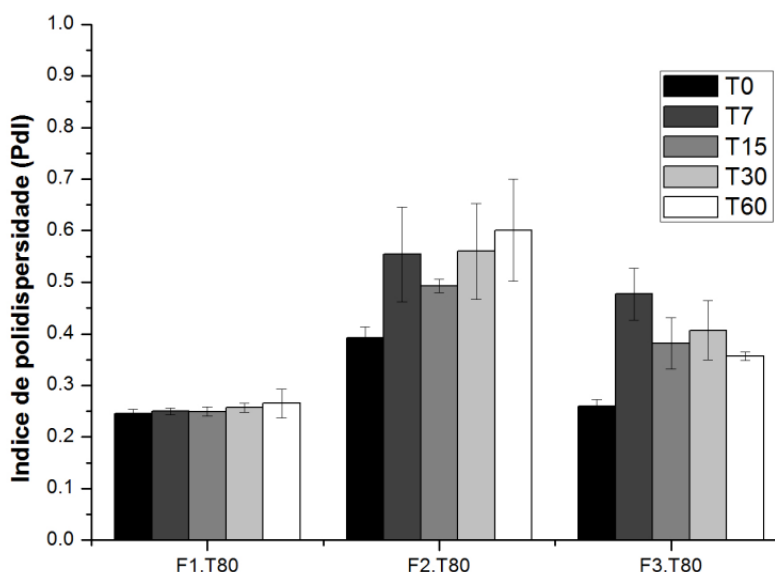
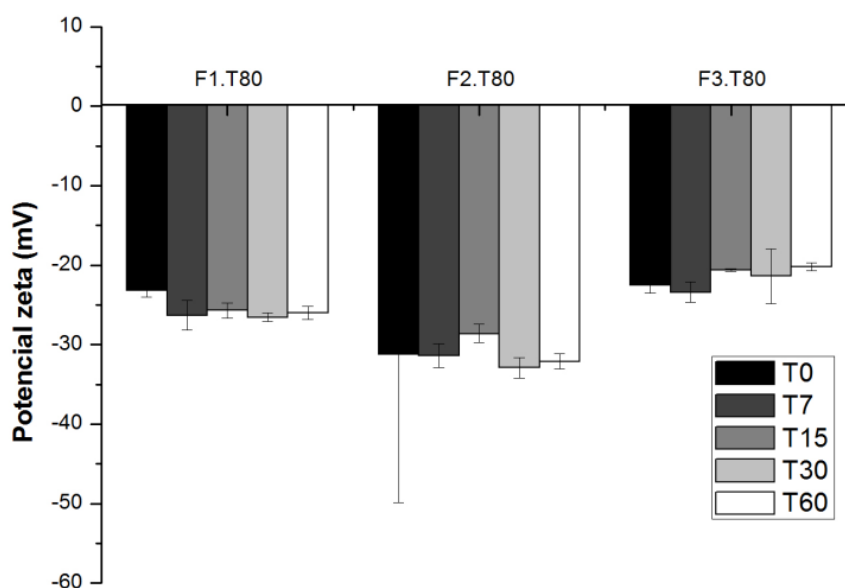


Figura 17. Potencial zeta (mV) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e compritol 888 ATO como fase lipídica e Tween 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (n=6).



Verificou-se com esses resultados que as formulações compostas apenas por AE demonstraram ser mais estáveis, nos três parâmetros analisados: diâmetro hidrodinâmico médio (nm), índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta (mV). Já as formulações compostas por C888 apresentaram-se instáveis, durante o tempo analisado, quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio e ao índice de polidispersidade, apresentando grande variações, com $PdI > 0,5$.

Estudo conduzido por Gardouh *et al.* (2013) demonstrou que o acréscimo de glicerina nas formulações de nanopartículas lipídicas sólidas compostas por monoesterato de glicerila

promoveu redução do tamanho das partículas. A glicerina poderia aumentar também a estabilidade das formulações, uma vez que a glicerina promoveria uma estabilização estérica, assim como o P407 (GARDOUH et al., 2013). Assim, novas formulações foram desenvolvidas, sendo acrescentadas às formulações F1.T80, F2.T80 e F3.T80, o P407 e a glicerina (Tabela 5).

Tabela 5. Formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo como fase lipídica, polissorbato 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos e P407 e glicerina como estabilizantes estéricos.

	Concentrações (%)											
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Ácido esteárico	5,0	2,5	---	5,0	2,5	---	5,0	2,5	---	5,0	2,5	---
Behenato de glicerilo	---	2,5	5,0	---	2,5	5,0	---	2,5	5,0	---	2,5	5,0
Polissorbato 80	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Fosfatidilcolina de soja	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Poloxamer 407	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Glicerina	0,075	0,075	0,075	0,15	0,15	0,15	2,0	2,0	2,0	4,0	4,0	4,0
Água deionizada	qsp	Qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp	Qsp	qsp	qsp	Qsp

*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

Após o preparo das formulações, acompanhou-se a estabilidade das mesmas durante 60 dias, avaliando-se o diâmetro hidrodinâmico médio, PDI e potencial zeta. Os resultados estão representados nas Figura 18 a 19.

Figura 18. Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo como fase lipídica e polissorbato 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos e P407 e glicerina como estabilizantes estéricos (n=6).

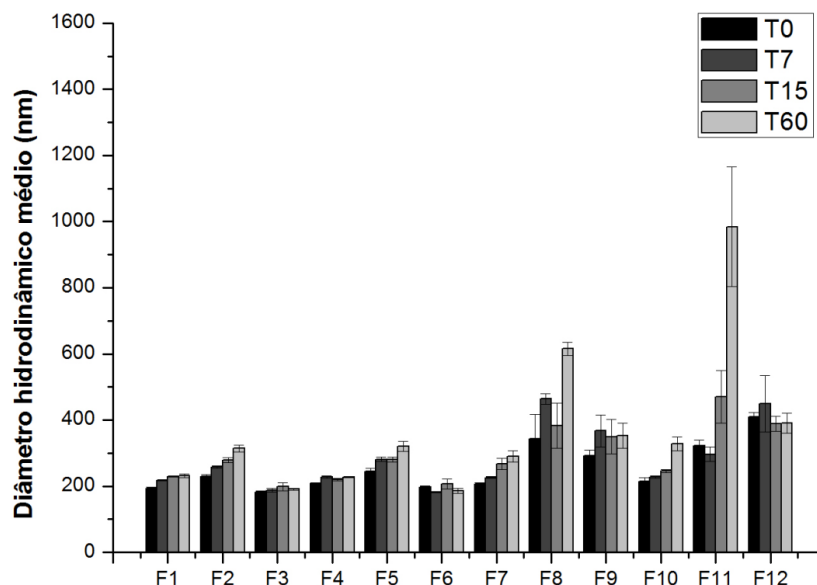


Figura 19. Índice de polidispersidade (Pdl) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo como fase lipídica e polissorbato 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos e P407 e glicerina como estabilizantes estéricos (n=6).

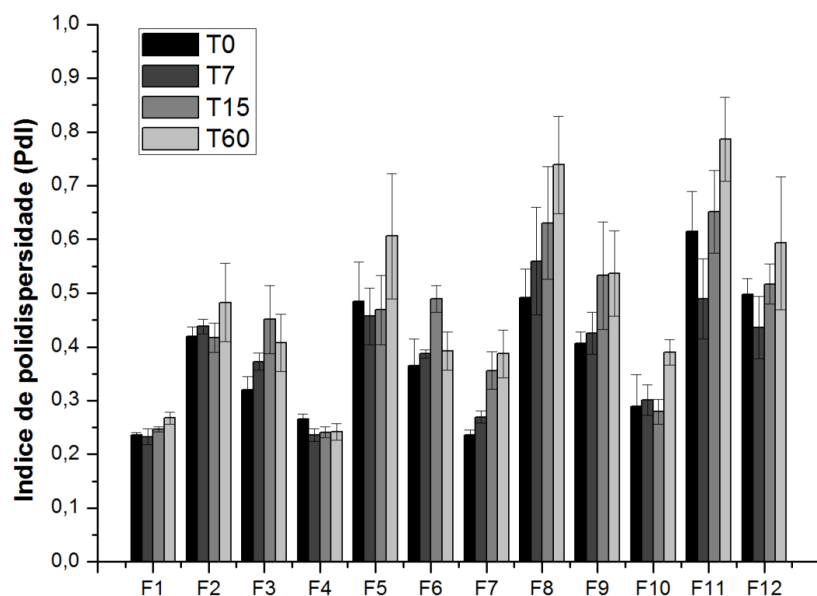
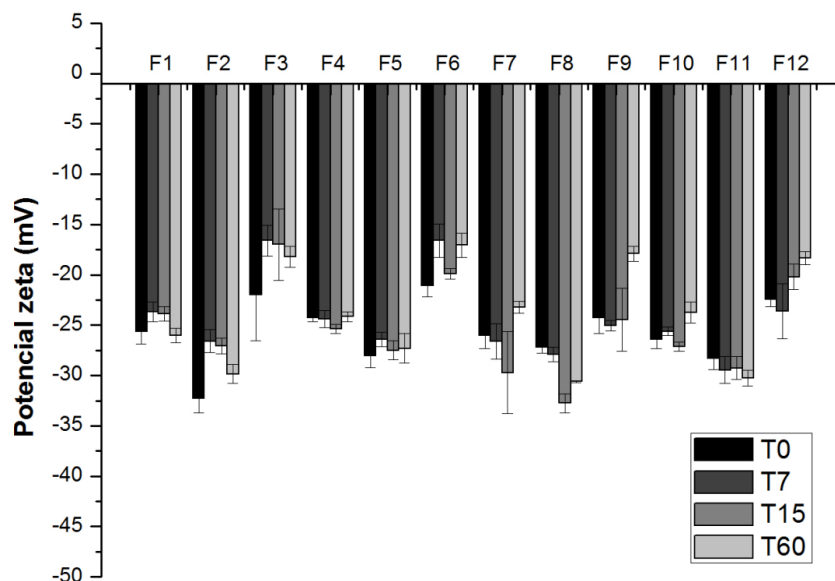


Figura 20. Potencial zeta (mV) das formulações desenvolvidas utilizando ácido esteárico e behenato de glicerilo como fase lipídica e polissorbato 80 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos e P407 e glicerina como estabilizantes estéricos (n=6).



Verificou-se na Figura 18 que o aumento na quantidade de glicerina promoveu aumento do tamanho do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas. Na Figura 19 pode ser observado que o aumento na quantidade de glicerina promoveu aumento no índice de polidispersidade das formulações, provavelmente devido a uma aumento da viscosidade da fase aquosa, o que contribuiria para reduzir a capacidade de homogeneização do sistema (GARDOUH et al., 2013; MEHNERT; MÄDER, 2001b; OLESEN et al., 1999). O potencial zeta (Figura 19) apresentou pouca variação entre as formulações e os tempos analisados, visto que todas as formulações nos diferentes tempos apresentaram potencial zeta entre -20 a -30 mV.

Mediante aos resultados obtidos, verificamos que o C888 apresenta cadeias moleculares que contribuem para a formação de partículas com distribuição não homogênea de diâmetro hidrodinâmico médio. Desta maneira, o C888 foi substituído pelo álcool berrênico, que apresenta o mesmo tamanho de cadeia que o C888, porém é mais lipofílico que o C888, o que poderia contribuir para a formação de partículas com distribuição de tamanho mais homogênea quando associado ao AE.

Nessa etapa, avaliou-se a influência dos componentes utilizados no preparo das formulações no diâmetro hidrodinâmico médio, no índice de polidispersidade e no potencial zeta das NLSs. Para isso, utilizou-se o design fatorial 2^2 para estimar o erro experimental, composto por 2 variáveis, as quais foram fixadas em 2 níveis cada. A média do diâmetro médio das partículas, Pdl e potencial zeta foram dependentes das variáveis e cada fator, os menores e maiores valores dos menores e maiores níveis, foram representados como (-1) e (+1) e os pontos

centrais foram representados pelo (0), como demonstrado na Tabela 6. Para o design foram necessário 9 experimentos. Os dados foram analisados utilizando STATISTICA 7.0.

Tabela 6. Design fatorial 2^2 , sendo os níveis menores (-1), maiores (+1) e central (0).

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
AE:AB*	1:0	1:1	0:1
P407:FCS**	3,7:1	3,5:1,2	3,3:1,4

*5,0% de lipídeos sólidos, sendo a mistura de ácido esteárico e álcool berrênico.

**4,7% de tensoativo em solução aquosa, sendo a mistura de poloxamer 407: fosfatidilcolina de soja.

As NLS produzidas utilizando diferentes fases lipídicas e tensoativos apresentaram diâmetro médio (nm) entre 180 a 300 nm, conforme demonstrado na Figura 21. A influência da fase lipídica e do tensoativo em relação à polidispersidade e ao potencial zeta (mV) está representado na Tabela 7.

Figura 21. Influência da mistura de tensoativos utilizado (P407:FCS) no diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas produzidas, quando utilizadas ácido esteárico; *blend* de ácido esteárico:álcool berrênico (1:1) e álcool berrênico como fase lipídica (n=6).

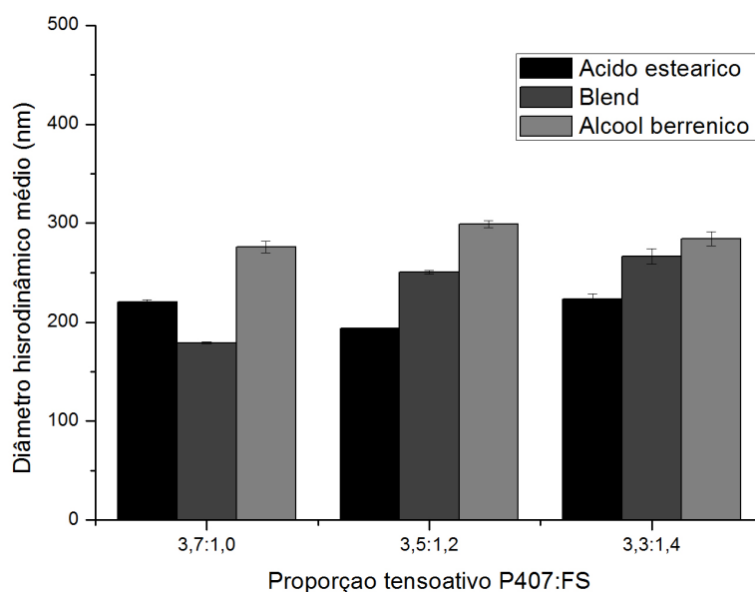


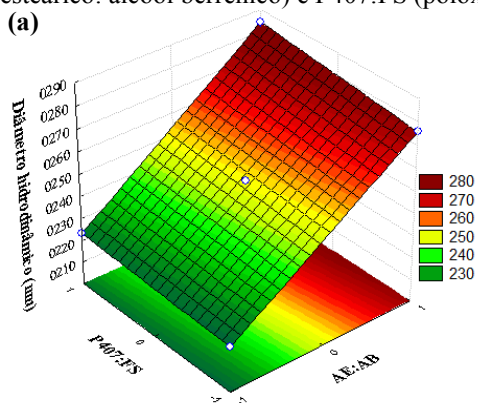
Tabela 7. Influência da fase lipídica e surfactantes usados na produção das NLSs.

Fase lipídica	Surfactantes	PdI	Potencial zeta (mV)
-1	-1	0,173 ± 0,010	-22,2 ± 0,289
0	-1	0,321 ± 0,034	-32,2 ± 0,551
+1	-1	0,187 ± 0,022	-19,2 ± 0,115
-1	0	0,215 ± 0,012	-21,5 ± 0,379
0	0	0,276 ± 0,018	-33,1 ± 0,252
+1	0	0,168 ± 0,009	-14,9 ± 0,200
-1	+1	0,194 ± 0,021	-23,5 ± 0,200
0	+1	0,321 ± 0,34	-32,2 ± 0,551
+1	+1	0,174 ± 0,018	-13,6 ± 0,173

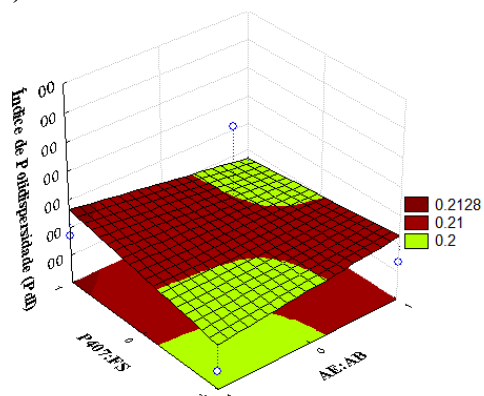
A Figura 22 demonstra a superfície resposta dos experimentos de design fatorial das NLSs e a Figura 23 o diagrama de pareto dos efeitos padronizados para NLSs.

Figura 22. Superfície resposta dos experimentos de design fatorial das NLSs (a) diâmetro hidrodinâmico médio (nm); (b) índice de polidispersidade (PdI); (c) potencial zeta em função das taxas de AE:AB (ácido esteárico: álcool berrênico) e P407:FS (poloxamer 407: fosfatidilcolina de soja).

(a)



(b)



(c)

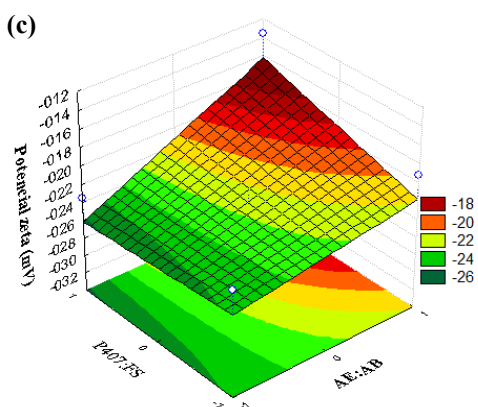
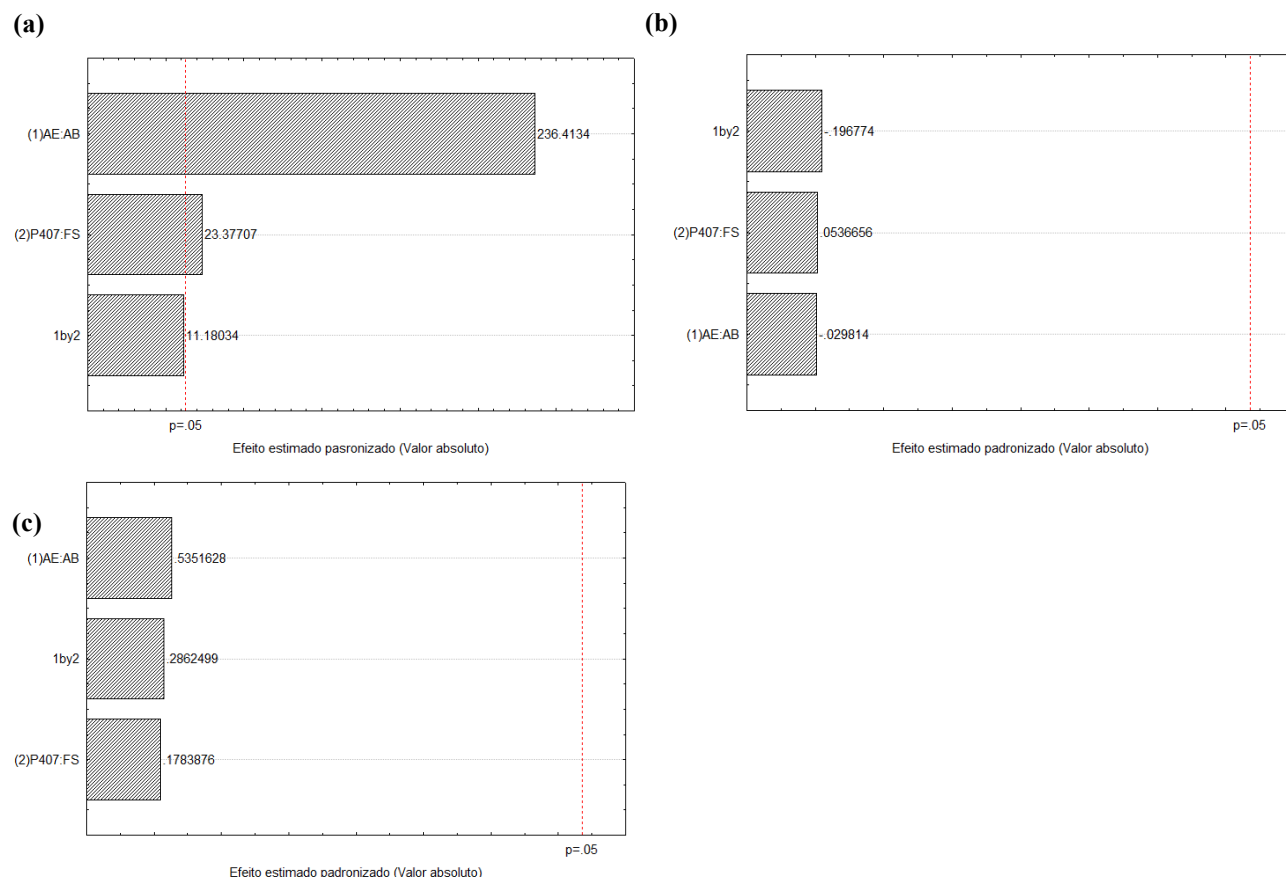


Figura 23. Diagrama de pareto dos efeitos padronizados para NLSs (a) diâmetro hidrodinâmico médio (nm); (b) índice de polidispersidade (PdI); (c) potencial zeta em função das taxas de AE:AB (ácido esteárico: álcool berrênico) e P407:FS (poloxamer 407: fosfatidilcolina de soja).



Os resultados obtidos demonstraram diferentes propriedades para as formulações de NLSs. A Figura 22a demonstrou que os tensoativos utilizados nas diferentes proporções exerceram baixa influência sobre o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas obtidas. Entretanto, em relação à fase lipídica, pôde ser observado que o aumento do diâmetro hidrodinâmico médio foi proporcional à concentração de álcool berrênico, sendo que maiores diâmetros foram obtidos quando as NLSs foram compostas apenas por álcool berrênico (Figura 22a). Porém, estudo estatístico realizado (Figura 23a) demonstrou que tanto os lipídeos quanto os tensoativos não exerceram influência significativa para o diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas ($p > 0,05$).

A distribuição do tamanho das partículas pode ser monomodal (apenas uma população) ou plurimodal (várias populações), monodispersa (estreita distribuição) ou polidispersa (ampla distribuição). Usualmente, os autores utilizam o índice de polidispersidade (PdI) para se referirem à distribuição do tamanho de partícula, sendo que este índice varia de 0 a 1. Desta maneira, valores menores do que 0,1 podem ser associados com alta homogeneidade na

distribuição do tamanho das partículas, enquanto altos valores de $PdI > 0,5$ sugerem ampla distribuição do tamanho das partículas ou a presença de mais de uma população (GAUMET et al., 2008; SCHWARZ et al., 1994). Desta maneira, pode-se verificar que as NLSs formadas apresentam distribuição homogênea do tamanho das partículas, as quais apresentaram valores de PdI 0,190 a 0,217 para todas as fases lipídicas e todas as proporções de tensoativos estudadas (Figura 22b).

Na Figura 22b, verifica-se que tanto a fase lipídica quanto a proporção de tensoativos influenciaram significativamente o índice de polidispersidade das nanopartículas ($p < 0,05$).

Vários fatores podem influenciar a distribuição do tamanho das partículas formadas, como, por exemplo, a viscosidade da matriz lipídica e da solução aquosa, bem como a metodologia de preparo e a temperatura utilizada no processo. Além disso, o pH do meio, a concentração dos componentes da formulação e a presença de material sedimentado também podem exercer influências sobre o índice de polidispersidade (GAUMET et al., 2008).

Estes resultados podem ser relacionados com as diferentes viscosidades dos lipídeos utilizados, ácido esteárico ($C_{18}H_{36}O_2$) e álcool berrênico ($C_{22}H_{46}O$). O álcool berrênico pode promover aumento da viscosidade da formulação, o qual pode ser ainda maior se houver a associação a polímeros (OLESEN et al., 1999). Com aumento da viscosidade da formulação, há uma redução da eficiência do processo de homogeneização, o que resulta em heterogeneidade na distribuição do tamanho das partículas e aumento do seu diâmetro hidrodinâmico médio (INNOCENTE et al., 2009; MEHNERT; MÄDER, 2001b) uma vez que a energia não é propagada homogeneamente por todo o volume de formulação. Osman e Atallah (2006) observaram em seus resultados que o aumento da viscosidade em nanotecnologia não é uma consequência direta para o aumento no tamanho das partículas, mas sim para a presença maior de aglomerados e agregados, contribuindo para um aumento indireto do diâmetro médio (OSMAN; ATALLAH, 2006).

Müller e colaboradores (1993) descreveram que, além da matriz lipídica, os parâmetros de produção, a mistura de tensoativos e a viscosidade da fase aquosa poderiam influenciar a distribuição do tamanho das nanopartículas (MULLER et al., 1993). Deixando todos os outros parâmetros constantes e variando apenas a composição da matriz lipídica, Jennings *et al.* (2000) demonstraram que a utilização da fase lipídica de menor viscosidade promoveu melhora no processo de homogeneização do material, e então a viscosidade poderia exercer uma influência sobre o tamanho das partículas. Os resultados obtidos pelos pesquisadores demonstraram que adição de um lipídeo líquido com baixa viscosidade promovia melhora na distribuição do tamanho de partícula quando as nanopartículas foram preparadas utilizando homogeneizador incompletamente termorregulado, ou seja, apresentava pontos mais frios no processo. Porém, essa melhora na distribuição não foi observada quando as amostras foram processadas com

termorregulação mais alta (85°C durante todo o processo). Isso pode ser observado, uma vez que a viscosidade dos lipídeos utilizados, quando em temperaturas altas, se tornou similares (JENNING et al., 2000).

Estudo conduzido por Hu e colaboradores (2005) verificou que a o acréscimo de ácido oleico, um lipídio líquido, nas nanopartículas lipídicas contendo ácido esteárico, promoveu redução da viscosidade do sistema e, consequentemente, reduziu o índice de polidispersidade, sendo que a redução foi proporcional ao aumento da concentração de ácido oleico na formulação. Os resultados demonstrados sugerem que a adição de ácido oleico na formulação pode favorecer a formação de nanopartículas, com distribuição de tamanho mais homogênea, devido a redução do tamanho das partículas (HU et al., 2005).

A Figura 22c demonstrou que diminuindo a razão P407:FCS (aumentando as porcentagens de fosfatidilcolina de soja) nas NLSs compostas por ácido esteárico produz-se significativamente NLS mais negativas ($p < 0,05$). Porém, observa-se que conforme se aumenta a concentração de álcool berrênico na formulação e, consequentemente, há a redução de ácido esteárico, as partículas tornam-se significativamente menos negativas ($p < 0,05$, Figura 22c).

Partículas com potencial zeta mais positivas que +30 mV ou mais negativas que -30 mV são normalmente consideradas estáveis. Entretanto, os valores mínimos para alcançar uma boa estabilização eletrostática estão entre 8 a 9 mV (ZIMMERMANN; MÜLLER, 2001). Embora todas as formulações apresentem valores mínimos de potencial zeta para a estabilização eletrostática, verifica-se que a formulação composta apenas por ácido esteárico e P407:FS na concentração 3,3:1,4 foi a que apresentou melhores resultados em relação ao potencial zeta.

Os resultados do estudo demonstraram uma abordagem para a utilização do design experimental 2^2 na otimização da produção de nanopartículas lipídicas sólidas, obtidas através de sonicação. A formulação composta apenas por ácido esteárico e tensoativos P407:FS na concentração 3,3:1,4 foi a que apresentou melhores resultados, com diâmetros hidrodinâmicos médios menores, com índice de polidispersidade de aproximadamente, 0,200 e potencial zeta médio de -26mV.

Desta maneira, de acordo com os resultados preliminares obtidos, a formulação anteriormente desenvolvida F4, a qual apresentava em sua composição apenas o lipídeo sólido AE, FS e T80 como sistema tensoativo e P407 e glicerina como estabilizantes estéricos, foi selecionada para a continuidade dos estudos, uma vez que foram significativamente mais estáveis durante o período de análise. Essa formulação foi renomeada a F1. Além disso, foi acrescido 0,45% de um tensoativo catiônico (brometo de cetiltrimetilamônio), a fim de produzir nanopartículas com carga superficial positiva com o objetivo de promover um direcionamento para células tumorais, as quais possuem alta densidade de carga negativa devido à exposição de fosfatidilserina (FS) na superfície das membranas celulares (CHAO et al., 2010; DUBE;

BERTOZZI, 2005; RAN et al., 2002; SLIVINSKY et al., 1997). Essas formulações foram então chamadas de F2. As estruturas químicas dos componentes utilizados no preparo das formulações estão expressas na Figura 24.

A Tabela 8 mostra as formulações desenvolvidas e selecionadas para a realização dos demais ensaios.

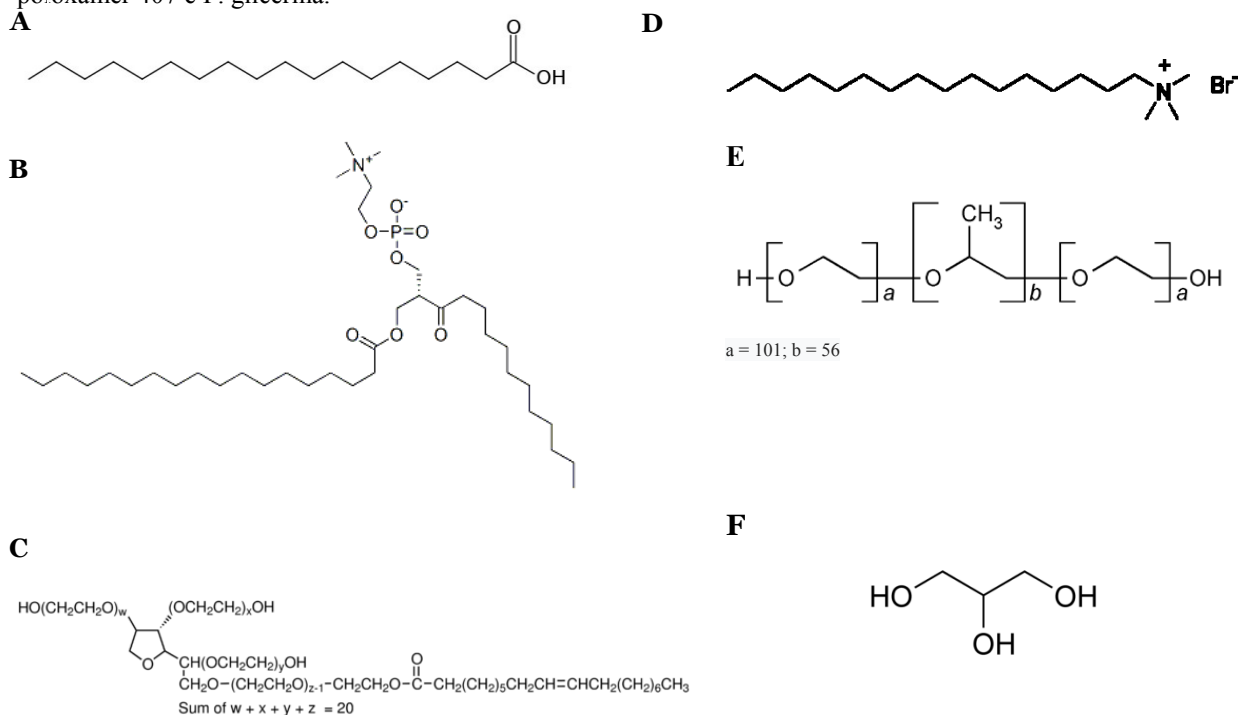
Tabela 8. Formulações desenvolvidas.

	Componentes (%)			
	F1	F1.RES	F2	F2.RES
Ácido esteárico (AE)	5,0	5,0	5,0	5,0
Fosfatidilcolina de soja (FS)	1,2	1,2	1,2	1,2
Polissorbato 80 (T80)	3,5	3,5	3,5	3,5
Brometo de cetiltrimetilamônio (BC)	---	---	0,45	0,45
Poloxamer 407 (P407)	0,1	0,1	0,1	0,1
Glicerina (GLI)	0,15	0,15	0,15	0,15
<i>trans</i> -Resveratrol (RES)	---	0,25	---	0,25
Fenoxietanol e Parabenos (Phenonip®)**	0,75	0,75	0,75	0,75
Etanol P.A.	1,25	1,25	1,25	1,25
Água Milli-Q	qsp 40,0 mL	qsp 40,0 mL	qsp 40,0 mL	qsp 40,0 mL

*qsp – quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

**Conservante microbiológico inserido na formulação após o preparo e centrifugação para remoção do titânio.

Figura 24. Estrutura química dos componentes utilizados para o preparo das formulações, sendo que A. ácido esteárico; B. fosfatidilcolina de soja; C. polissorbato 80; D. brometo de cetiltrimetilamônio; E. poloxamer 407 e F. glicerina.



O AE é um lipídeo que constitui a lamela presente entre os corneócitos (MUKHERJEE et al., 2010). Por isso, o ácido esteárico tem sido muito utilizado para o preparo de formulações para a aplicação tópica. Um estudo publicado por KHALIL et al. (2000) demonstrou que cremes preparados com AE reduzem a gravidade e a progressão de lesões cutâneas em comparação com áreas lesionadas não tratadas, com 57% de redução dos escores de lesão.

RIGON et al. (2016) compararam a permeação de RES quando veiculado em NLSs compostas por AE como lipídeo sólido e P407, como tensoativo, sendo acrescida a esta formulação a fosfatidilcolina de soja. O resultado demonstrou que a formulação acrescida de FS apresentou menor permeação do RES, o que é desejável na terapia antitumoral do melanoma.

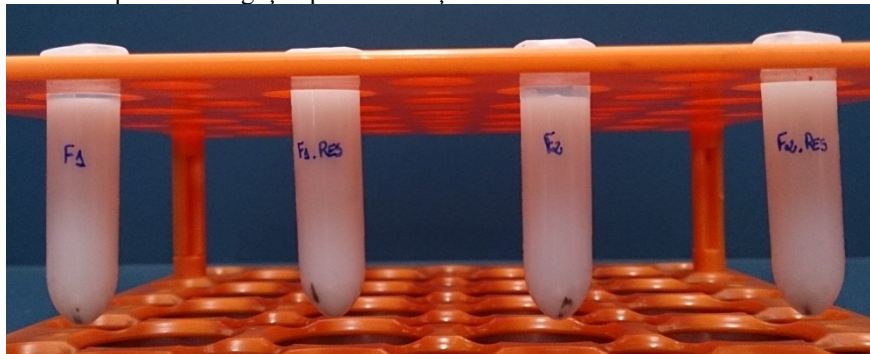
Como descrito anteriormente, o T80 e a glicerina promovem a formação de nanopartículas mais estáveis ao longo do tempo após armazenamento.

O BC, tensoativo catiônico que conferem carga positiva na superfície das NLSs, promove uma ligação através da interação eletrostática com as cargas negativas dos grupos de fosfolipídeos preferencialmente expressos nas células endoteliais tumorais (BYRNE et al., 2008; KRASNICI et al., 2003; RAN et al., 2002).

As formulações foram sonicadas durante 20 minutos (18,75 μ m de amplitude, o que corresponde a 25% da capacidade do equipamento, e 14-19 W de potência, para a probe de $1/2$), utilizando banho de gelo durante o preparo e centrifugadas para a remoção do titânio que pode

ser desprendido no processo de sonicação (Figura 25). Após, as formulações foram caracterizadas, empregando a determinação do diâmetro médio, da polidispersidade e do potencial zeta, os quais estão descritos no item 5.2 e 5.3, respectivamente.

Figura 25. NLSs após centrifugação para a remoção do titânio.

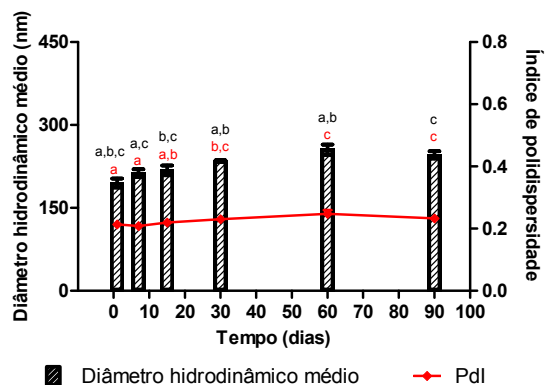


4.2 Diâmetro médio das NLSs

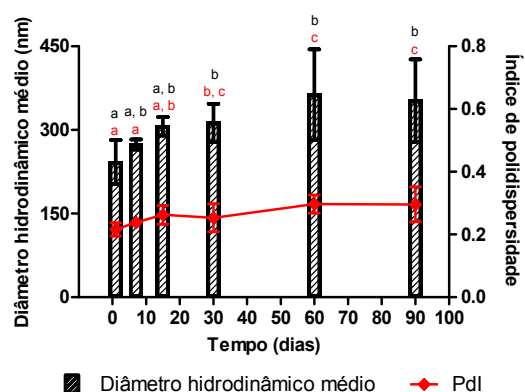
Após preparadas, as formulações foram analisadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio das partículas dispersas e a polidispersidade das mesmas. A Figura 26 descreve os resultados referentes às formulações desenvolvidas e analisadas 24 horas após o preparo e após armazenamento (4°C) por 90 dias (T1, T7, T15, T30, T60 e T90). Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey, para os dados paramétricos, e pelo teste Friedman, seguidas pela Concordância do Coeficiente de Kendall, para os dados não paramétricos. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

Figura 26. Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e índice de polidispersidade (Pdl) das formulações selecionadas, durante o período de armazenamento a 4°C (T1, T7, T15, T30, T60 e T90), sendo: A) F1; B) F1.RES; C) F2 e D) F2.RES.

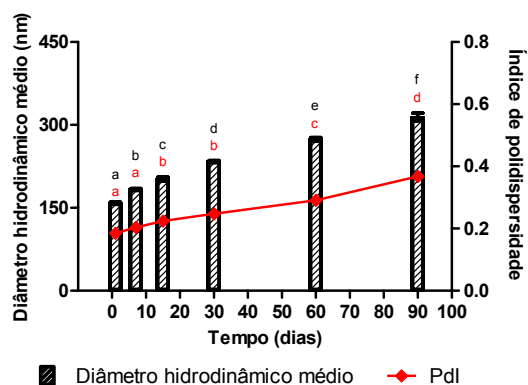
A



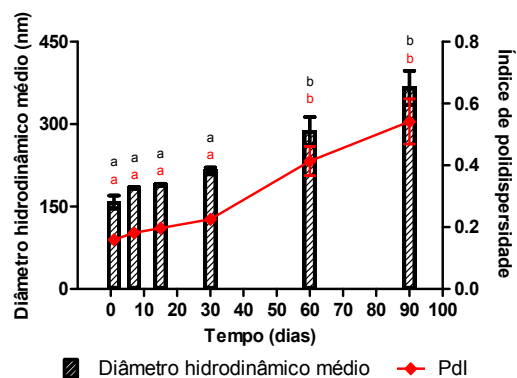
B



C



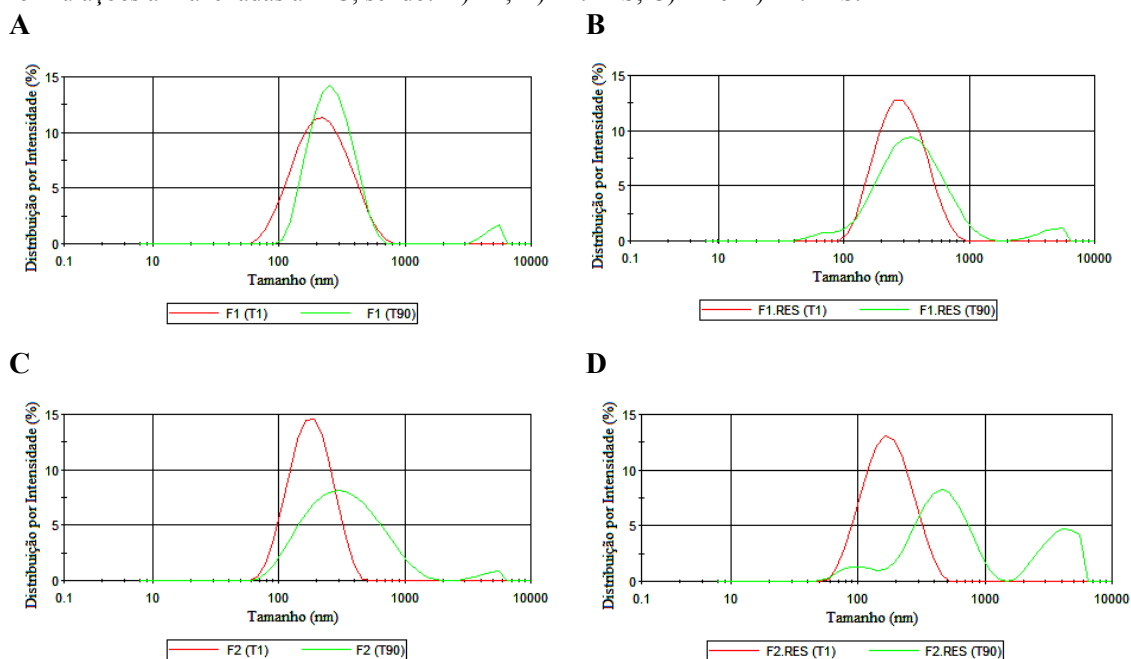
D



^{a-f} Símbolos diferentes nas colunas indicam que as diferenças entre as médias são estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A Figura 27 demonstra a distribuição do tamanho das partículas de acordo com sua intensidade, após 24 horas do seu preparo e ao final do período de armazenamento de 90 dias em geladeira ($4 \pm 2^\circ\text{C}$).

Figura 27. Distribuição do tamanho das partículas por intensidade (%) nos tempos T1 e T90 dias, das formulações armazenadas a 4°C, sendo: A) F1; B) F1.RES; C) F2 e D) F2.RES.



Verificou-se que as formulações acrescidas de RES (F1.RES) apresentaram aumento significativo do diâmetro hidrodinâmico médio ($p < 0,05$) quando comparadas com as formulações sem o fármaco (F1), possivelmente pelo fato do fármaco participar da estruturação lipídica da nanopartícula, sendo que os diâmetros hidrodinâmicos médios obtidos foram de $195,0 \pm 3,34$ nm e $241,3 \pm 48,33$ nm para F1 e F1.RES, respectivamente. O mesmo foi observado em um estudo conduzido por SOARES et al. (2013), em que os autores afirmaram que houve aumento do diâmetro hidrodinâmico médio de NLSs, após acréscimo da quantidade de insulina na formulação, o que pode indicar encapsulamento da insulina, bem como adsorção da mesma na superfície da partícula.

Porém, para as formulações acrescidas de BC não foram observados o mesmo evento, uma vez que não houve alteração significativa ($p < 0.05$) no diâmetro hidrodinâmico médio após a formulação F2 ser acrescida de RES (F2.RES), sendo que os valores obtidos foram de $159,15 \pm 4,78$ e $158,25 \pm 33,92$ nm para F2 e F2.RES, respectivamente.

HELGASON et al. (2009) demonstraram que a redução da tensão interfacial pode ser alcançada utilizando-se elevadas concentrações de tensoativo. Desta maneira, as NLSs originadas podem apresentar comportamento cristalino alterado com reduzidas modificações em suas formas. Isso poderia explicar a redução do diâmetro hidrodinâmico médio das NLSs produzidas com o tensoativo catiônico (formulações F2 e F2.RES) quando comparada com as formulações F1 e F1.RES, 24 horas após sua produção.

A formulação F1 permaneceu estável em relação ao diâmetro médio hidrodinâmico durante 60 dias de armazenamento em geladeira ($4 \pm 2^\circ\text{C}$). Após a adição de RES, houve aumento desta estabilidade para 90 dias. O mesmo foi observado para as formulações acrescidas de BC. Verificou-se que a formulação F2 não foi estável, uma vez que após 7 dias de armazenamento já podia ser evidenciado aumento significativo no diâmetro hidrodinâmico médio. Porém, após acréscimo do RES (F2.RES), houve manutenção do diâmetro hidrodinâmico médio até 30 dias de armazenamento em geladeira ($4 \pm 2^\circ\text{C}$).

Tensoativos catiônicos, como, por exemplo, os quaternários de amônio, são comumente utilizados para controlar a carga superficial das partículas, assim como a hidrofobicidade de dispersões aquosas (BINKS; WHITBY, 2005). O BC, um tensoativo catiônico normalmente utilizado em preparações farmacêuticas coloidais nanoestruturadas, sendo utilizado com o intuito de promover carga superficial positiva às nanopartículas e um possível direcionamento para células tumorais através de interações não específicas, como, por exemplo, afinidade eletrostática (SAKAMOTO et al., 2010a). Porém, o acréscimo de BC na formulação (F2) promoveu a formação de nanopartículas instáveis quando comparadas com a formulação que não continha BC (F1), conforme demonstrado na Figura 26A e C.

Verifica-se na Figura 26A que a formulação sem BC (F1) apresentou manutenção no índice de polidispersidade ao longo do tempo, demonstrando homogeneidade na distribuição das populações de partículas formadas. O mesmo não foi evidenciado na formulação acrescida de BC (F2), podendo ser evidenciado na Figura 26 um aumento significativo no índice de polidispersidade. Na Figura 27C, esse aumento no índice de polidispersidade pode ser demonstrado pelo alargamento da banda de tamanho (nm), sendo evidenciada redução da intensidade (%) de partículas com diâmetro hidrodinâmico médio em torno de 150 nm, valor inicialmente obtido pela F2 no T1, e aumento da intensidade (%) em partículas de 1000 nm, após armazenamento de 90 dias.

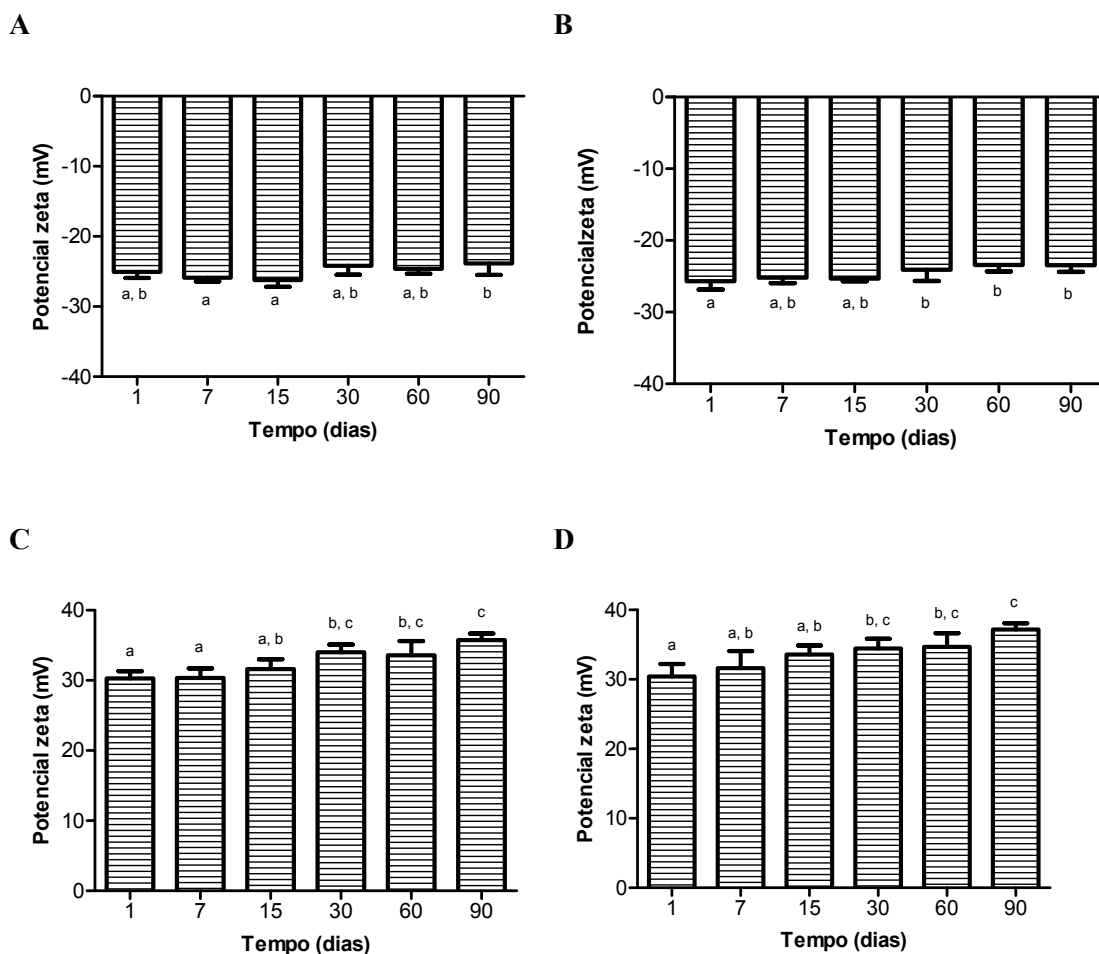
Verifica-se na Figura 26A e B, que para as formulações F1 e F1.RES (sem BC) o PDI mantém-se durante o período de armazenamento em torno de 0,20, sugerindo se tratar de sistemas coloidais homogeneamente dispersos (BARBOSA et al., 2013; MARCATO et al., 2011; MÜLLER et al., 2002). Já para as formulações F2 e F2.RES (Figura 26C e D), que apresentaram inicialmente PDI menores do que 0,2, o que poderia ser um indicativo de formulações mais estáveis, não houve manutenção do PDI durante o período de armazenamento. Desta maneira, pode-se correlacionar a manutenção da estabilidade do diâmetro hidrodinâmico médio das formulações com a manutenção do PDI. Assim, formulações com manutenção do PDI apresentam também manutenção do diâmetro hidrodinâmico médio (GAUMET et al., 2008; ZAMBAUX et al., 1998).

A baixa polidispersão mostra a produção de um sistema homogêneo, o que reduz o envelhecimento de Ostwald, mecanismo pelo qual moléculas da fase dispersa migram das partículas menores para as maiores (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012). Isso se deve possivelmente pelo efeito sinérgico dos tensoativos utilizados, como, por exemplo, a utilização de fosfolípidios (fosfatidilcolina de soja) na fase lipídica e o poloxamer 407 (estabilizante estereoquímico) e tensoativo polissorbato 80 na fase aquosa externa (CHEN et al., 2006; HELGASON et al., 2009).

4.3 Potencial zeta das NLSs

A Figura 28 descreve os resultados obtidos para a análise do potencial zeta (mV) para as formulações desenvolvidas, assim como para o diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e o índice de polidispersidade. Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey, para os dados paramétricos e pelo teste Friedman, seguidas pela Concordância do Coeficiente de Kendall, para os dados não paramétricos. O nível de significância adotado foi ($\alpha = 0,05$).

Figura 28. Potencial zeta (mV) das formulações selecionadas, durante o período de armazenamento a 4°C (T1, T7, T15, T30, T60 e T90), sendo: A) F1; B) F1.RES; C) F2 e D) F2.RES.



Verificou-se que as formulações selecionadas apresentam potencial zeta (mV) maiores que ± 20 mV, o que garantiria boa estabilização eletrostática, sendo que as formulações F1, F1.RES, F2 e F2.RES apresentaram potencial zeta igual a $-25,5 \pm 1,01$; $-26,0 \pm 1,67$; $30,6 \pm 1,13$ e $30,0 \pm 1,85$, respectivamente, havendo manutenção durante o período de armazenamento. Além disso, todas as formulações apresentam em sua composição o P407, um estabilizante estérico, o que também contribuiria para a estabilização das NLSs.

Após acréscimo de BC nas formulações (F2 e F2.RES), pode ser evidenciada a formação de nanopartículas com carga superficial positiva.

A molécula de RES apresenta três grupos fenólicos, os quais são responsáveis pela sua ação antioxidante (WALLE et al., 2004). Os grupamentos fenólicos apresentam características ácidas (BOEHM, 2002; PUZIY et al., 2002), o que poderia contribuir para a mudança do potencial zeta das nanopartículas após a adição do RES, caso pelo menos uma fração das

moléculas do RES estivesse presente na superfície das nanopartículas (ZUR MÜHLEN et al., 1998). Não foram observadas alterações significativas no potencial zeta das formulações acrescidas de RES quando comparado com as formulações sem o fármaco, o que pode sugerir que o fármaco encapsulado encontra-se no interior das partículas formadas.

4.4 Microscopia de Força Atômica das NLSs

A técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM) teve início na década de 1980 e baseia-se no arraste de uma sonda com um *tip* extremamente fino pela amostra, promovendo a formação de imagens em três dimensões com resolução de até 0,01 nm (MARCATO, 2009). A AFM tem sido muito empregada para avaliar tamanho e morfologia de NLSs, uma vez que é uma técnica capaz de detectar e caracterizar populações heterogêneas (SEETAPAN et al., 2010).

A Figura 29 demonstra fotomicrografias das formulações desenvolvidas por AFM. A Tabela 9 demonstra a distribuição dos diâmetros das partículas obtidas nas análises de AFM.

Figura 29. Fotomicrografias das formulações selecionadas analisadas por microscopia de força atômica após 24 horas de preparo, sendo: A) F1; B) F1.RES; C) F2 e D) F2.RES.

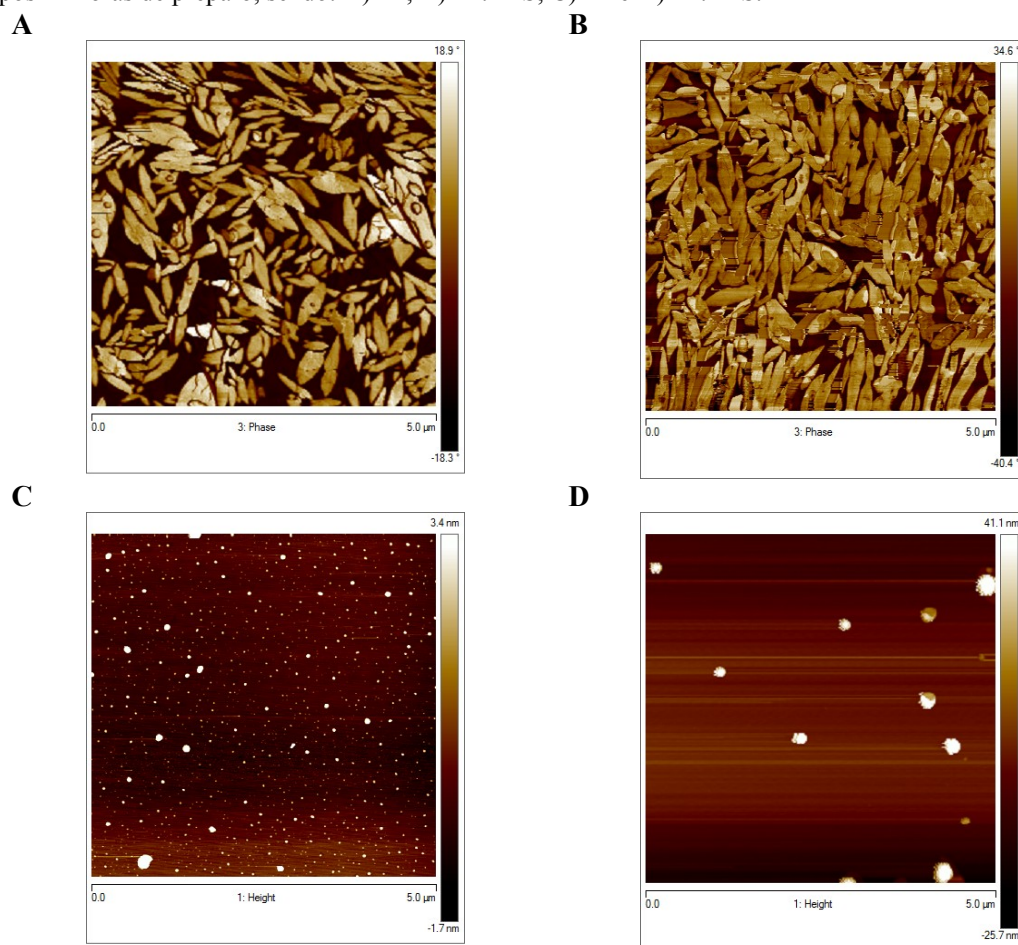


Tabela 9. Diâmetro médio (nm) das formulações selecionadas, durante o período de armazenamento a 4°C (T1), através de AFM.

	Diâmetro médio (nm)
F1	126,90 ± 17,15
F1.RES	119, 30 ± 93,20
F2	74,05 ± 32,05
F2.RES	161, 47 ± 56,72

As imagens demonstram que ambas as formulações apresentaram a formação de estruturas em escala nanométrica, sendo que as formulações sem BC (F1 e F1.RES) apresentaram morfologia anisométrica ovalada, ao passo que as formulações acrescidas de BC (F2 e F2.RES) apresentaram a formação de estruturas com morfologia esférica.

A morfologia de uma nanopartícula lipídica depende da composição da dispersão, bem como das formas polimórficas dos nanocristais. Formas polimórficas α são menos anisométricas do que as formas polimórficas mais estáveis β (BUNJES, 2011).

Partículas com formatos esféricos podem oferecer um maior potencial controlador da liberação do fármaco, além de proteção ao fármaco incorporado por promover contato mínimo com o ambiente aquoso, bem como maiores caminhos de difusão quando comparado com partículas de outros formatos. Formas esféricas ainda necessitam de menores quantidades de agentes estabilizantes de superfície, por causa da sua pequena área superficial. Todavia, partículas com formas anisométricas podem apresentar vantagem quando substâncias ativas são incorporadas na camada de tensoativos ou adsorvidas na superfície das partículas. A morfologia das partículas exerce influência sobre a carga de superfície e as características de liberação do fármaco a partir de NLSs (KUMAR; RANDHAWA, 2013).

Verificou-se ainda na Figura 29D, a sobreposição de partículas na superfície das esferas, o que pode ser um indicativo de deposição de fármaco na superfície das nanopartículas.

Para ambas as formulações, a adição de RES não ocasionou alteração na morfologia das partículas inicialmente formadas.

A Tabela 9 demonstra os valores dos diâmetros médios das nanopartículas obtidos durante a análise de AFM. Pode-se verificar que os valores obtidos são menores do que os valores encontrados nas análises de DLS, os quais estão descritos na Figura 26, com exceção apenas da F2.RES. Este resultado já era esperado, uma vez que a técnica de DLS mensura o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, o que inclui uma camada de polímero e sua hidratação ao redor da partícula formada, ao passo que a microscopia avalia amostras secas (HOO et al., 2008; KITTLER et al., 2010).

4.5 Calorimetria diferencial exploratória (DSC) das NLSs

Análises de calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram conduzidas para caracterizar o polimorfismo e o grau de cristalinidade das NLSs.

A Figura 30 apresenta a curva DSC das matérias-primas utilizadas para o preparo das nanopartículas lipídicas sólidas, bem como a curva das formulações desenvolvidas sem e com a incorporação de RES. Foram realizados ciclos de aquecimento para verificar a fusão e a desidratação das amostras. Na Tabela 10 estão demonstradas as temperaturas de pico de fusão, além das entalpias esperadas, as quais foram obtidas através de cálculos de acordo com a composição das NLSs e as entalpias obtidas das curvas DSC dos componentes utilizados, bem como das NLSs selecionadas, com e sem RES.

Figura 30. Termograma de aquecimento das matérias-primas utilizadas no preparo das NLSs e das formulações selecionadas.

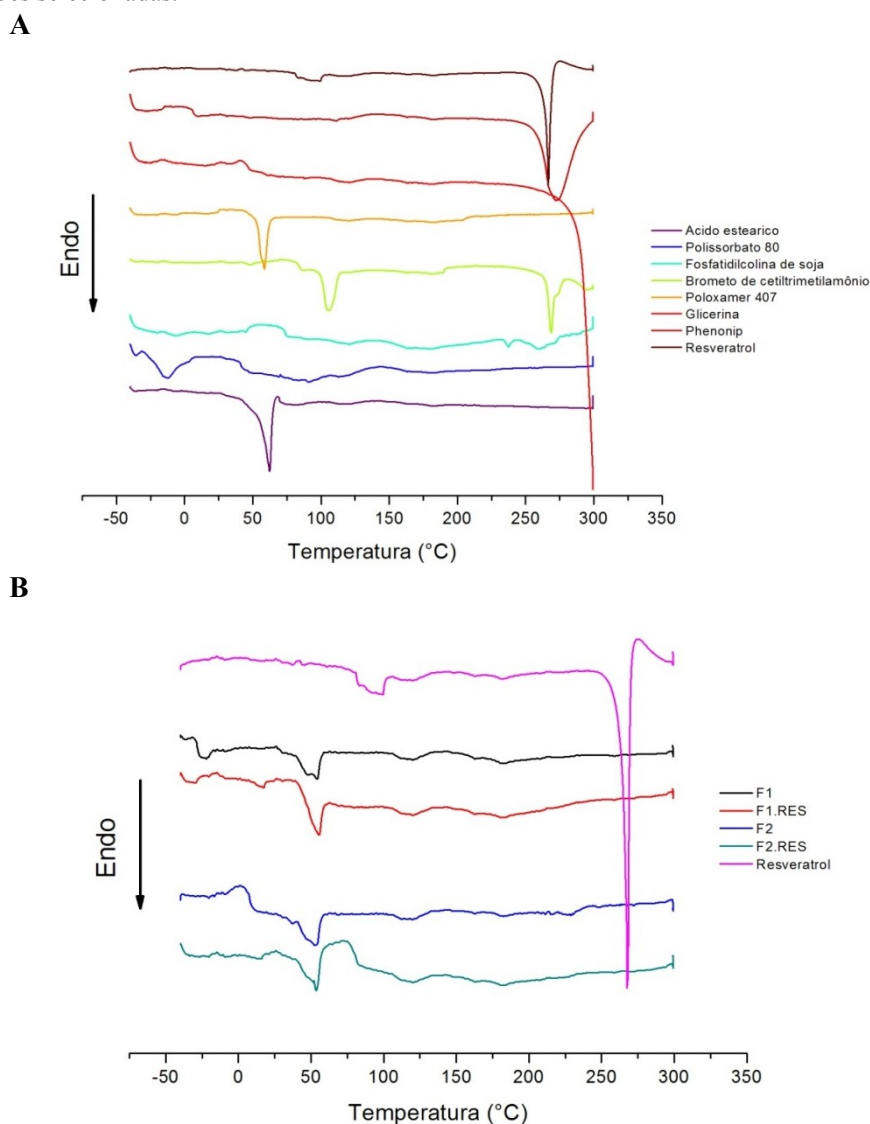


Tabela 10. Valores da temperatura dos picos (°C), das entalpias esperadas e obtidas do ensaio DSC das matérias-primas utilizadas e das formulações desenvolvidas.

Amostras	T _{pico} (°C)	$\Delta H_{\text{esperado}}$	ΔH_{obtido}
AE	60,75	-	176,10
BC	104,58	-	147,90
T80	-13,53	-	44,52
Glicerina	-	-	-
FC	-	-	-
P407	57,61	-	126,30
Phenonip®	271,31	-	356,60
RES	266,47	-	236,30
F1	54,30	123,02	53,55
F1.RES	55,25	125,61	66,17
F2	53,12	124,24	63,51
F2.RES	53,46	126,48	105,07

Transformações polimórficas são frequentemente observadas em componentes lipídicos de cadeias longas, como, por exemplo, o ácido esteárico (SEVERINO et al., 2011). Verifica-se na Tabela 10 que o ácido esteárico apresentou ponto de fusão de 60,75° C. Este resultado aproxima-se dos resultados encontrados na literatura, que é de, aproximadamente, 68° C (KARAIPEKLI et al., 2007).

O evento endotérmico encontrado para o brometo de cetrimônio foi em 104,58° C. Já para o polissorbato 80 (T80) e para o conservante microbiológico, os pontos de fusão foram de -13,53° C e de 271,31° C, respectivamente, conforme demonstrados na Tabela 10.

Verificou-se que a fosfatidilcolina de soja durante o aquecimento não apresentou pico de fusão (Figura 30A). Isto ocorre possivelmente pelo fato da fosfatidilcolina não apresentar ponto de fusão aparente. Além disso, quando não se observa pico de fusão na curva de DSC, provavelmente a substância encontra-se em maior proporção no estado amorfo (CIDES et al., 2006). O mesmo pôde ser observado para a glicerina.

A curva de DSC do poloxamer 407 (Figura 30A) apresentou evento endotérmico de fusão em 57,61 °C. Um estudo verificou que o poloxamer 407 pode reduzir picos endotérmicos de algumas substâncias, pois o mesmo pode solubilizá-las e o pico endotérmico deixa de existir na curva de DSC das formulações, indicando a forma amorfa (NEPAL et al., 2010).

O *trans*-resveratrol apresentou ponto de fusão de 266,47° C. Esse valor corresponde ao valor encontrado por KIM et al. (2012b), que foi de 267,6° C.

Verifica-se na Tabela 10 que todas as formulações apresentaram redução na temperatura de fusão dos componentes. Esta diminuição no ponto de fusão pode ser atribuída à redução da cristalinidade ocasionada pela taxa de nucleação rápida, o que promove a formação de cristais imperfeitos. A diminuição no ponto de fusão pode ser atribuída ainda à redução do tamanho das partículas para a formação de sistemas nanoestruturados, tal como explicado pela equação de Gibbs-Thomson. A equação se refere à observação de que pequenos cristais estão em equilíbrio com sua massa fundida líquida, podendo-se prever uma relação linear entre a depressão do ponto de fusão e o inverso da dimensão das partículas (KIM et al., 2012b; SUN; SIMON, 2007).

Nos termogramas referentes às formulações F1.RES e F2.RES (Figura 30B) não é evidenciado o pico endotérmico referente ao RES. Este fenômeno pode ser devido ao fato de que nas formulações, o RES encontra-se em maior proporção no estado amorfo do que no estado cristalino ou o ácido esteárico e os demais estabilizantes, por apresentarem pontos de fusão menores que do que o RES, poderiam dissolvê-lo, impedindo a verificação de seus estados cristalinos (NEWA et al., 2007; VAGHASIYA et al., 2013).

Verifica-se na Tabela 10 que todas as formulações apresentaram redução da entalpia obtida em relação às entalpias esperadas, sendo que os valores de entalpia esperada para as formulações F1, F1.RES, F2 e F2.RES foram de 123,02, 125,61, 124,24 e 126,48 J/g, respectivamente, e as entalpias obtidas foram de 53,55, 66,17, 63,51 e 105,07 J/g, respectivamente, o que demonstra a interação desses componentes na formação dos sistemas. Além disso, pode ser observado que as formulações F1 e F2 apresentaram aumento na entalpia obtida após a adição de RES, de 53,55 J/g para 66,17 J/g (F1.RES) e de 63,51 J/g para 105,07 J/g (F2.RES), demonstrando a interação de RES na formação do sistema (VAGHASIYA et al., 2013).

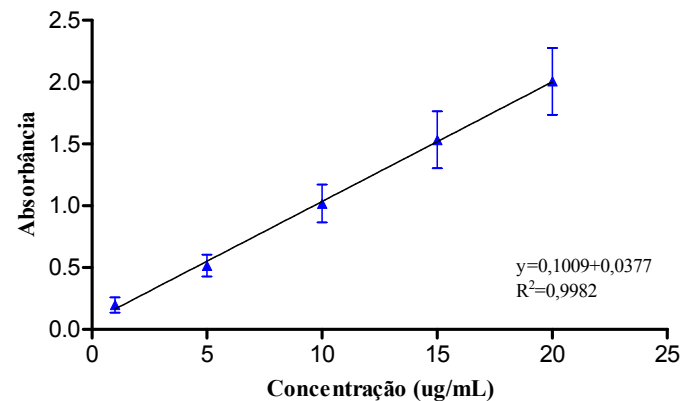
4.6 Validação da metodologia analítica para a quantificação de RES em NLSs

4.6.1 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra. A Figura 31 demonstra a curva analítica do RES.

Segundo a RDC 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) da curva analítica é de 0,99 (BRASIL, 2003), sendo obtido um valor médio de 0,9982 no experimento. A curva obtida demonstrou que os resultados da metodologia analítica são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.

Figura 31. Curva analítica do RES por espectroscopia UV-VIS.



4.6.2 Precisão

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos da repetibilidade do método, a qual foi verificada pela análise de 3 concentrações (1, 10 e 20 µg/mL), em triplicata (n=3) de cada concentração, em 3 dias diferentes.

Tabela 11. Resultados da avaliação da precisão para a repetibilidade (precisão intra-corrida).

	Absorbância								
	1º Dia			2º Dia			3º Dia		
	1 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
n=1	0,17858	0,75026	1,5114	0,30945	1,2802	2,4354	0,0966	1,0154	2,0622
n=2	0,18532	0,7709	1,5094	0,31295	1,2944	2,4633	0,10122	1,0238	2,0705
n=3	0,18158	0,73792	1,5468	0,31913	1,2799	2,4379	0,10142	1,0503	2,0864
Média	0,18158	0,75026	1,5114	0,31295	1,2802	2,4379	0,10122	1,0238	2,0705
Desvio padrão	0,003377	0,016663	0,021039	0,004901	0,008286	0,015437	0,002727	0,018215	0,012297
DPR	1,859656	2,220985	1,392042	1,566206	0,647269	0,633212	2,69406	1,779202	0,593929

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos da precisão intermediária do método, a qual foi verificada através da análise de 3 concentrações (1, 10 e 20 µg/mL) em triplicata (n=3) de cada concentração em 3 dias diferentes.

Tabela 12. Resultados da avaliação da precisão intermediária (precisão inter-corridas).

	Absorbância		
	1 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
	0,18158	0,75026	1,5114
	0,31295	1,2802	2,4379
	0,10122	1,0238	2,0705
Média	0,18158	1,0238	2,0705
Desvio padrão	0,003377	0,016663	0,015437
DPR	1,859656	1,62758	0,745572

O desvio padrão relativo (DPR) obtido na avaliação da precisão do método é adequado (menor que 5,0%), podendo atribuir ao método analítico alto grau de concordância entre os resultados quando realizados sob as mesmas condições experimentadas neste estudo.

4.6.3 Exatidão

A Tabela 13 mostra os resultados obtidos da recuperação do método, a qual foi verificada através da análise de 3 concentrações (1, 10 e 20 µg/mL) em triplicata (n=3) de cada concentração.

Tabela 13. Resultados da avaliação da exatidão.

Concentração teórica	1 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
Concentração experimental (µg/mL)	0,99 ± 0,03	9,77 ± 0,18	20,15 ± 0,13
Exatidão	101, 15 ± 3,14	98,33 ± 1,80	100, 86 ± 0,61

* Através da equação da reta ($y = 0.1009x + 0.0377$) determinou-se a concentração experimental.

A exatidão obtida na avaliação do método é adequada (90 - 110 %), podendo atribuir ao método analítico alto grau de concordância entre os resultados quando realizados sob as mesmas condições experimentadas neste estudo.

4.6.4 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

Os valores calculados para o limite de detecção e de quantificação demonstram alta sensibilidade e especificidade do método para a determinação do *trans*-resveratrol. De acordo como a curva analítica, o LD e LQ encontrados foram 2,29 µg/mL e 7,65 µg/mL, respectivamente.

4.6.5 Robustez

A robustez foi verificada através da análise de uma solução de RES na concentração de 15 µg/mL, em triplicata (n=3), e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados da robustez do método analítico para a quantificação do RES

Parâmetros		Exatidão	DPR
Comprimento de onda	300 nm	100,24 ± 1,86	1,85
	306 nm	106,47 ± 1,99	1,87
	312 nm	104,60 ± 1,99	1,90
Marca do etanol utilizado	Synth	107,35 ± 1,05	0,98

De acordo com a Tabela 14 verifica-se que alterações nos parâmetros encontram-se dentro os valores permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que é de ± 10% para exatidão e 5% para DPR (BRASIL, 2003) Assim, o método pode ser considerado robusto.

4.7 Estudo da eficiência de encapsulação do RES presente nas NLSs

Realizou-se inicialmente a ultrafiltração, utilizando 2 tipos de membrana Amicon Ultra 4 (Celulose regenerada, 100.000 MWCO, Millipore, Billerica, USA) e a Vivaspin® 2 Centrifugal Concentrator (Celulose triacetato (CTA), 10.000 MWCO, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia). Para este teste, uma solução de RES a 5 µg/mL foi preparada, a qual foi filtrada e o separado foi analisado por espectrofotômetro a 306 nm. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados das leituras da solução sem sofrer o processo de centrifugação. A metodologia analítica para a quantificação do RES por espectroscopia foi validada e publicada na dissertação de mestrado (RIGON, 2013). Os resultados da análise estão demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15. Análise do filtrado obtido por ultrafiltração para ensaio de eficiência de encapsulação (n=3).

Concentração teórica	Concentração aferida	Concentração recuperada	
		Amicon Ultra 4	Vivaspin® 2
5,0 µg/mL	5,49 ± 0,06	2,10 ± 0,03	0,14 ± 0,002

Verificou-se que o método de separação não foi eficaz, pois houve retenção do RES em ambas as membranas testadas, sendo que na membrana Vivaspin® 2 a retenção foi maior que da Amicon Ultra 4.

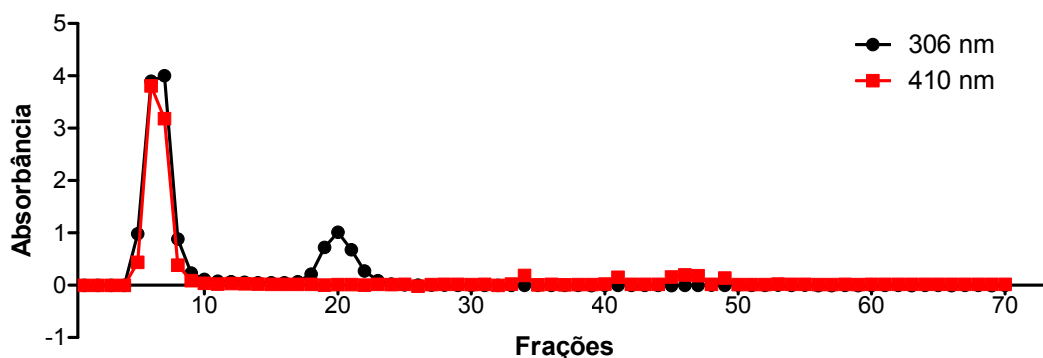
Assim, a metodologia testada não apresentou resultado satisfatório para ser utilizado para a separação do RES encapsulado do RES livre nas NLSs, não sendo possível a quantificação e a análise da eficiência de encapsulação utilizando essa metodologia.

Uma alternativa que poderia ser utilizada para avaliar a eficiências de encapsulação do RES nas formulações desenvolvidas foi a utilização da separação do RES livre por cromatografia de exclusão de tamanho, utilizando uma coluna de vidro empacotada com Sephadex G-50.

Assim, após o preparo das NLSs contendo RES realizou-se análise cromatográfica por exclusão de tamanho, empregando como fase estacionária o Sephadex G-50, com o objetivo de se determinar a eficiência de encapsulação do RES. Desta maneira, buscou-se a separação de NLS contendo o RES encapsulado daquelas frações contendo apenas o RES livre. Após, as frações separadas foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis em 306 nm (fármaco RES) e em 410 nm (espalhamento), para detecção do RES livre e encapsulado, respectivamente. A eluição foi realizada após 24 horas da obtenção das NLS.

As análises das frações de NLS contendo RES encapsulado e das frações contendo o RES livre das dispersões estão descritas nas Figuras 32 a 34.

Figura 32. Análise das frações de NLS sem o fármaco por espectrofotometria em 306 nm e em 410 nm após análise cromatográfica por exclusão de tamanho.



Verificou-se na Figura 32, que após a eluição da formulação sem RES há a presença de um pico de absorbância entre as frações 16 a 24, demonstrando que algum componente da formulação poderia apresentar eluição diferente das dispersões de NLSs formadas.

Figura 33. Análise das frações de NLS contendo RES encapsulado e das frações de RES livre por espectrofotometria em 306 nm e em 410 nm após análise cromatográfica por exclusão de tamanho da formulação F1.RES.

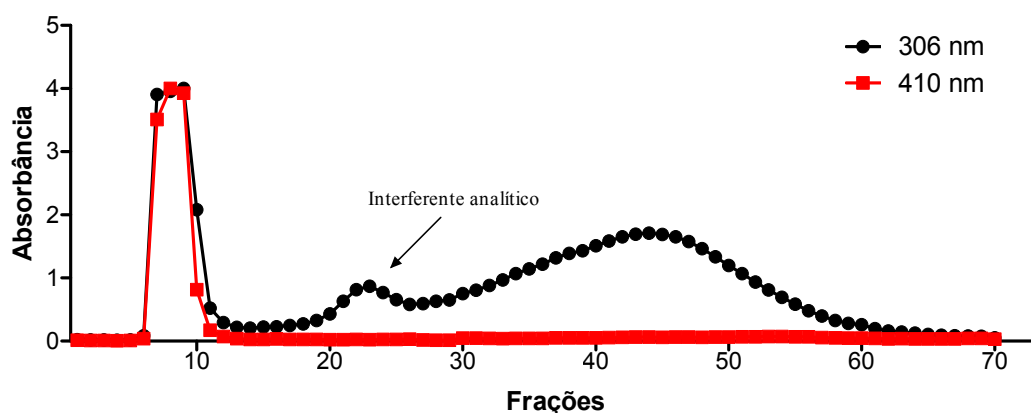
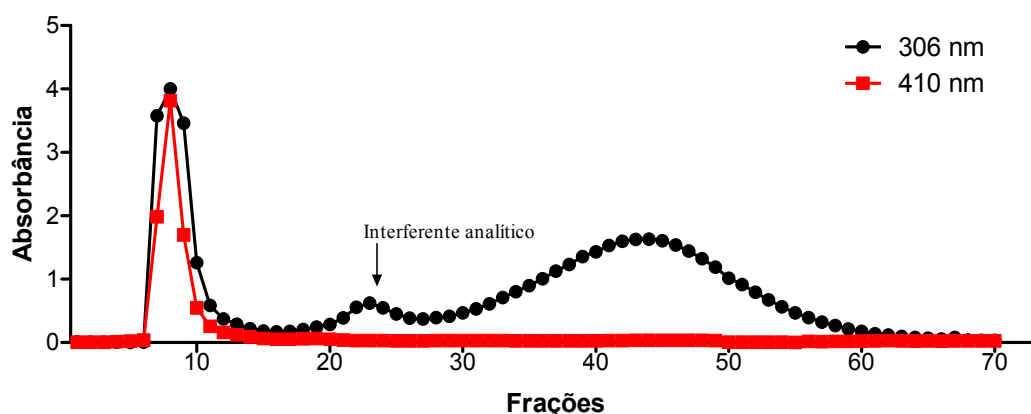


Figura 34. Análise das frações de NLS contendo RES encapsulado e das frações de RES livre por espectrofotometria em 306 nm e em 410 nm após análise cromatográfica por exclusão de tamanho da formulação F2.RES.



Pelas Figuras 33 e 34, verificou-se que o pico de absorbância observado na análise das frações das formulações sem o fármaco (Figura 32) interfere na separação do RES livre para ambas as formulações analisadas por cromatografia por exclusão de tamanho (F1.RES e F2.RES). Desta maneira, o cálculo da concentração de RES livre estava maior do que a concentração utilizada no preparo das dispersões.

Por esse motivo, buscou-se a utilização de outra metodologia para a separação das NLSs contendo RES encapsulado do RES livre (item 3.2.6).

Assim, a eficiência de encapsulação (EE%) e a capacidade de carga (CC%) do RES foram quantificados indiretamente através da quantidade do RES ($\mu\text{g/mL}$) existente fora das

NLS de acordo com metodologia analítica validada, descrita anteriormente (equação da reta obtida foi $y = 0.1009x + 0.0377$ e $R^2 = 0.9982$).

A Tabela 16 demonstra os resultados obtidos para o ensaio de eficiência de encapsulação (EE%), 24 horas após o preparo das formulações e após 30 dias de armazenamento.

Tabela 16. Eficiência de Encapsulação (EE%) e capacidade de carga (CC%) do *trans*-resveratrol nas NLSs após armazenamento em geladeira (4° C) (média $\pm$ desvio padrão, n=3).

	Eficiência de Encapsulação (%)		Capacidade de Carga (%)	
	T1	T30	T1	T30
F1.RES	46,76 $\pm$ 1,61 ^{A, a}	52,77 $\pm$ 4,91 ^a	2,33 $\pm$ 0,08 ^{B, b}	2,66 $\pm$ 0,25 ^c
F2.RES	38,62 $\pm$ 9,28 ^{A, a}	55,60 $\pm$ 1,54 ^a	1,94 $\pm$ 0,47 ^{B, d}	2,79 $\pm$ 0,07 ^e

Verificou-se na Tabela 16 que a formulação F1.RES apresentou porcentagem de eficiência de encapsulação significativamente igual a formulação F2.RES, no tempo 24 horas. Também não há diferença significativa entre a EE(%) nos tempos 24 horas e 30 dias. Desta maneira, aproximadamente, 50% do RES utilizado na formulação está encapsulado no sistema.

Há uma relação inversamente proporcional entre o coeficiente de partição do fármaco e a liberação do mesmo. Fármacos com alto coeficiente de partição apresentam baixa liberação do fármaco, o que resulta em baixa expulsão do fármaco da matriz lipídica. Além disso, baixa expulsão do fármaco pode ser observada também quando o mesmo está homogeneamente disperso na matriz lipídica (ÜNER; YENER, 2007). Estudo conduzido por GARDOUH et al. (2013) demonstrou que a glicerina pode retardar a expulsão do fármaco de nanopartículas lipídicas sólidas, por contribuir para o aumento da viscosidade da fase aquosa do sistema. Desta maneira, o fato das formulações não apresentarem mudanças significativas na EE% do RES, pode-se ser atribuído à baixa expulsão do RES da matriz lipídica, o que demonstra eficiente encapsulamento do RES. Além disso, o efeito *burst* é reduzido com o aumento do tamanho da partícula, o que promove a liberação sustentada do fármaco. Os resultados de diâmetro hidrodinâmico médio demonstraram que a formulação F1 apresentou aumento no tamanho da partícula após a adição do RES (F1.RES), o que poderia contribuir para a redução do efeito *burst* de liberação do fármaco.

A capacidade de carga (CC%) permite correlacionar à quantidade de fármaco encapsulado na NLS em função da quantidade de lipídio presente na formulação (GARDOUH et al., 2013).

Tanto a EE% quanto a CC% estão relacionados com as propriedades físico-químicas do fármaco, bem como a interação deste com o lipídeo. Dentre os principais fatores descritos na

literatura para que se obtenha adequada EE% e CC% estão: solubilidade do fármaco no lipídeo, miscibilidade entre fármaco e lipídeo, estrutura físico-química da matriz lipídica e polimorfismo da matriz lipídica (MÜLLER et al., 2000b; SOUTO et al., 2011).

Moléculas lipídicas com configurações termodinâmicas na forma polimórfica α são consideradas mais instáveis, o que permite um maior encapsulamento de fármaco, por possuírem um empacotamento menos rígido; desta maneira, permitem elevada capacidade de carga. Porém, são necessárias estratégias preventivas durante o armazenamento para evitar que formas polimórficas instáveis se transformem em formas polimórficas mais estáveis (forma polimórfica β) (SOUTO et al., 2011).

A incorporação de fármacos utilizando a capacidade de carga é usualmente de 1 a 5%. Porém, já foi demonstrado em estudo conduzido por WESTESEN et al. (1997), que ubiquinona encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas apresentou capacidade de carga de até 50%.

O pré-requisito para obter-se uma capacidade de carga suficiente é a alta solubilidade do fármaco no lipídeo fundido. A solubilidade do fármaco no lipídeo fundido pode ser aumentada através da adição de solubilizantes (ATTAMA et al., 2012).

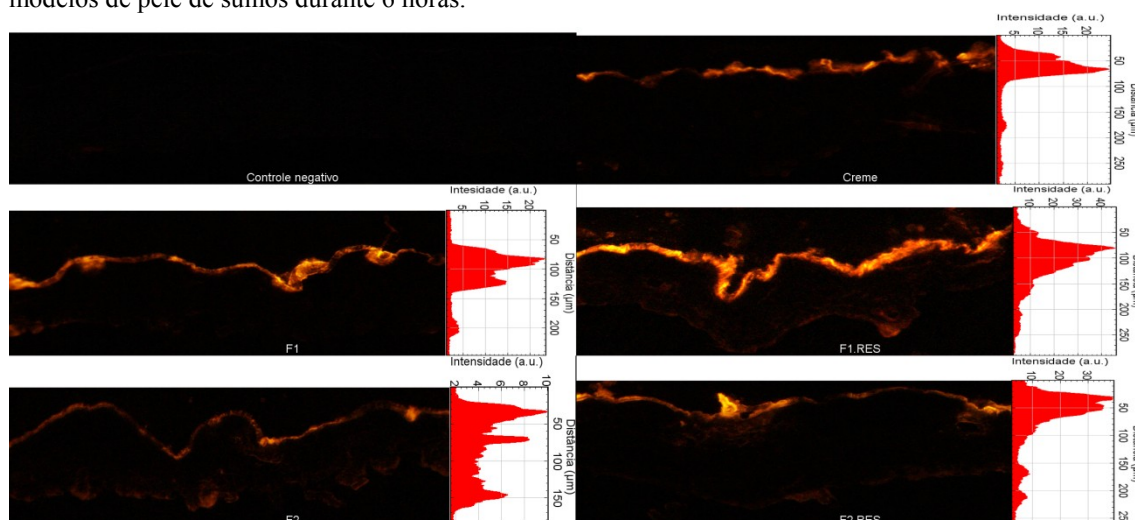
Um estudo conduzido por HU et al. (2005) avaliou a influência da presença de lipídeo líquido, o ácido oleico, na eficiência de encapsulação e na capacidade de carga em NLSs e carreadores lipídicos nanoestruturados (NCLs), os quais foram produzidos utilizando ácido esteárico como lipídeo sólido. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a eficiência de encapsulação aumentou de 47,67 para 69,95% e a capacidade de carga aumentou de 2,30 para 3,50% quando a porcentagem de ácido oleico aumentou de 0 para 30%, respectivamente. Os resultados obtidos pelos autores em relação às NLSs (sem a adição de ácido oleico) corroboram com os resultados encontrados (Tabela 16), com EE% próximos a 50% e CC% em torno de 2,50%.

JENNING et al. (2000), JENNING; GOHLA (2001) e SOUTO et al. (2004) reportaram que ao adicionar lipídeo líquido nas preparações de nanopartículas lipídicas sólidas, a ordenação massiva dos cristais sofre desordenação, o que resulta em imperfeições na matriz lipídica, garantindo espaço para acomodar as moléculas de fármaco, aumentando a capacidade de carga e a eficiência de encapsulamento.

4.8 Penetração cutânea in vitro das NLSs em pele de suínos

A Figura 35 demonstra a penetração de Rhodamina PE veiculado em base galênica O/A aniônica e em NLSs contendo ou não RES encapsulado em modelos de pele suína após 6 horas de tratamento.

Figura 35. Penetração das NLSs. Rhodamine PE encapsulado em emulsão O/A e em NLSs aplicada nos modelos de pele de suínos durante 6 horas.



Pode-se verificar na Figura 35 que todos os tratamentos apresentaram acúmulo do fluoróforo Rhodamina PE nas camadas superiores da pele suína, sendo observado maior acúmulo no estrato córneo. Verifica-se que tanto o creme, quanto a formulação F1, não apresentaram penetração das mesmas pelas camadas viáveis da epiderme. Porém, quando a F1 continha encapsulado o RES (F1.RES), a mesma foi capaz de alcançar camadas mais profundas da pele, como a derme. Já as formulações catiônicas (F2 e F2.RES) foram capazes de atingir as camadas viáveis da pele. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por CHEN et al. (2012), que avaliaram a mudança da permeação percutânea de fármacos encapsulados em nanopartículas com diferentes cargas superficiais, tais como: catiônica, aniônica e neutra. Os resultados desses pesquisadores demonstraram que a carga superficial das nanopartículas lipídicas apresenta grande influência sobre a permeação cutânea de fármacos, sendo que a carga superficial catiônica atuou como um promotor da permeação cutânea de fármacos.

Vários estudos tem demonstrado o aumento da permeação cutânea de fármacos quando os mesmos estão encapsulados em sistemas com carga superficial catiônica (ASHTIKAR et al., 2016; MAHOR et al., 2007; SHAH et al., 2015). Moléculas com carga são fracamente permeáveis através do estrato córneo, devido à sua baixa habilidade de partição dos lipídeos. Uma abordagem para aumentar a permeação dessas moléculas é a adição de uma porção de carga oposta para formar um par de íons lipofílicos capaz de particionar os lipídeos do estrato córneo e agir como um neutralizador de cargas temporário (KULKARNI, 2009). Em pH fisiológico, a pele humana apresenta uma leve carga negativa; entretanto, certos fármacos com carga positiva podem atravessar a pele com maior facilidade (KUMAR; PHILIP, 2007). Em resumo, o pH ácido da pele pode preferencialmente facilitar a penetração de nanopartículas de carga positiva (HAMBLIN et al., 2016).

4.9 Modelo de eficácia analgésica e anti-inflamatória in vivo através da atividade antinociceptiva e anti-edematogênia pelo teste de edema de pata em camundongos

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua como uma efetiva barreira protetora. A sua grande superfície de contato e a facilidade de acesso, faz da pele uma rota alternativa para a entrega de fármacos. Entretanto, a bioarquitetura da pele limita o transporte de moléculas através dela (PATHAK; THASSU, 2009).

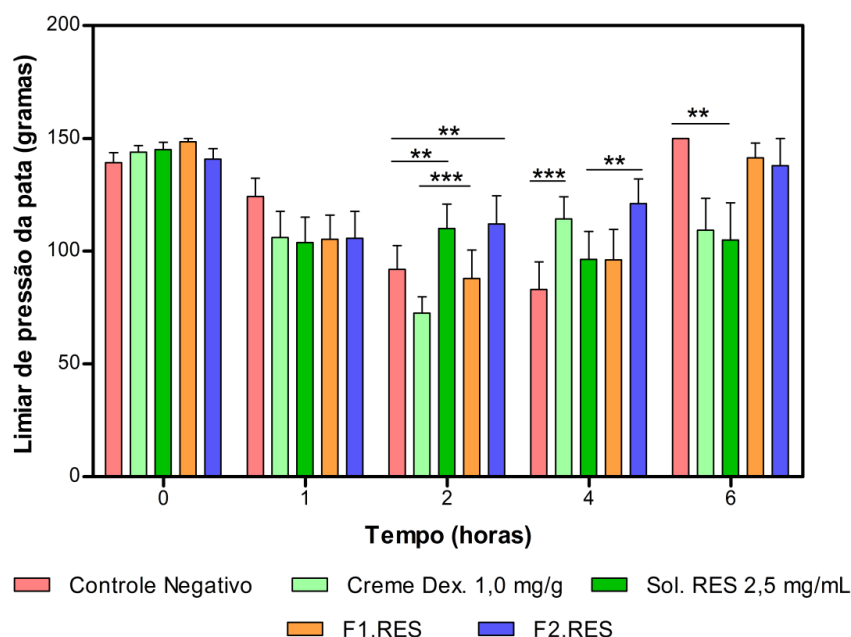
Os principais fatores reguladores para a quantidade e qualidade da melanina, produzida pelos melanócitos, incluem radiação ultravioleta, inflamação crônica, fricção da pele, assim como a estimulação anormal da liberação de α -MSH (hormônio estimulante de melanócitos do tipo α ou melanocortina), ASP (proteína sinalizadora AGOUTI) e MC1-R (BARTOLI MIOT et al., 2009; BRIGANTI et al., 2003).

As respostas inflamatórias desempenham papéis decisivos em diferentes fases do desenvolvimento do tumor, incluindo a iniciação, a promoção, a conversão maligna, a invasão e a metástase. Além disso, a inflamação também afeta a resposta imune (GRIVENNIKOV et al., 2010).

Melanoma é fortemente associado com processo inflamatório devido à altos níveis de secreção de citocinas, incluindo interleucina 8 (IL-8) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (CLAFFEY et al., 1996; MELNIKOVA; BAR-ELI, 2007). A secreção de citocinas podem estimular a ativação de NF- κ B, o qual está relacionado com a inibição da apoptose de células de melanoma (AMIRI; RICHMOND, 2005).

A eficácia anti-inflamatória do RES e do RES encapsulado em NLSS foi avaliada pelo teste de edema de pata de camundongos induzido por carragenina, os quais foram comparados com uma formulação comercial de dexametasona (1 mg/g) (GOH et al., 2015; JIN et al., 2015). O efeito antinociceptivo, o qual demonstra a ação dos tratamentos no limiar de dor após exercida uma pressão (gramas) sob a pata traseira esquerda do camundongo, está representado na Figura 36.

Figura 36. Eficácia antinociceptiva. O limiar nociceptivo foi determinado a partir da força aplicada à superfície dorsal da traseira inflamada (g) necessária para que o camundongo retirasse sua pata (n=14).



A média de limiar de pressão da pata (g) de todos os animais estudados no T0h foi de $150 \pm 8,99$ g (Figura 36), sendo que todos os grupos foram significativamente iguais o controle negativo ($p>0,05$).

Após análise estatística 2-way ANOVA, verificou-se que após 1 hora de administração da carragenina (T1h), não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre o limiar de pressão da pata (g) entre todos os grupos estudados, demonstrando que a indução da inflamação pela carragenina foi semelhante em todos os grupos estudados.

No T2h, verifica-se que tanto a solução de RES e a formulação F2.RES apresentaram significativa redução da nocicepção em comparação com os grupos controle, tratados com o creme de dexametasona e F1.RES ($p<0,05$), demonstrando que esses tratamentos promoveram manutenção do limiar de pressão da pata (g) em relação ao T1h, o que demonstra uma ação mais rápida no início da redução da inflamação. Os resultados encontrados na Figura 13, demonstraram que a formulação F2.RES apresentou uma permeação mais profunda da pele, atingindo as células da camada basal da epiderme e derme, quando comparadas com os demais grupos o que poderia favorecer a rápida ação antinociceptiva da mesma.

Após 4h de tratamento, verifica-se que tanto o grupo tratado com a formulação F2.RES e tanto o tratado com o creme de dexametasona, apresentaram maior redução da nocicepção quando comparados com os demais grupos. O grupo tratado com o creme de dexametasona apresentou, apesar de ação mais lenta na ação antinociceptiva, potente ação analgésica, sendo um importante controle positivo. Além disso, a semelhança estatística entre o grupo tratado com

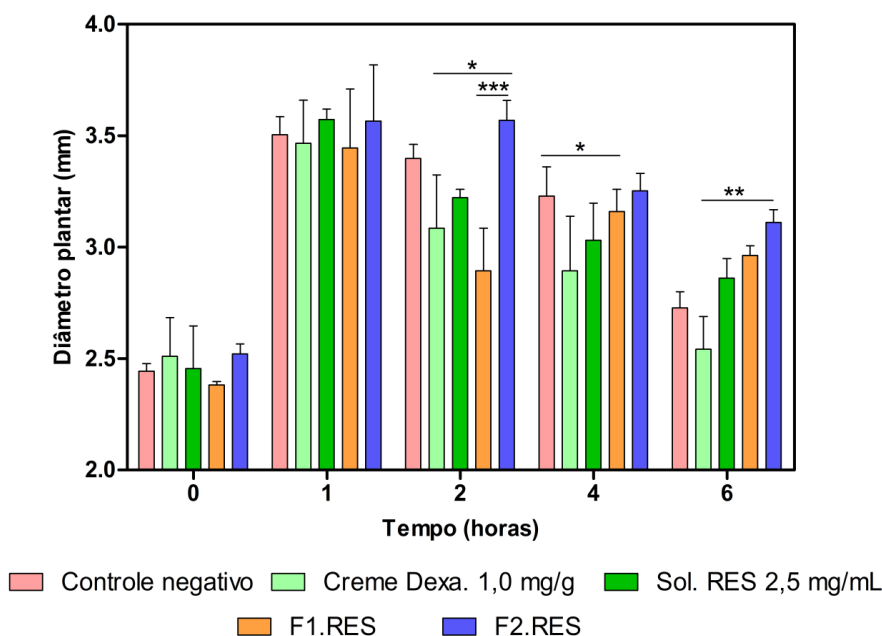
o creme de dexametasona com o grupo tratado com a formulação F2.RES demonstra a potente ação analgésica e rápida ação desta formulação, com ação em 2h de tratamento, confirmando a rápida permeação em formulações catiônicas em comparação com formulações aniônicas (F1.RES).

O estrato córneo apresenta carga superficial negativa, assim formulações tópicas com carga superficial positiva podem apresentar bioadesão superior que formulações com carga superficial negativa (BASPINAR; BORCHERT, 2012), o que pode explicar o aumento da ação nociceptiva da F2.RES em relação à F1.RES.

Após 6h de tratamento, verifica-se que o controle negativo atingiu o máximo de limiar de pressão da pata (g) de 150 g (Figura 36), demonstrando o final do efeito inflamatório, e tanto o grupo tratado com o creme de dexametasona, quanto o grupo tratado com a formulação F2.RES, não apresentaram diferenças significativas com o controle negativo ($p>0,05$). A solução de RES e a formulação F1.RES foram significativamente semelhantes na redução do limiar de pressão da pata; entretanto, não foram suficientes na redução antinociceptiva, o que pode ser devido à menor permeação do fármaco por esses veículos. Mesmo o fato do RES estar em uma solução hidroalcoólica, um promotor de permeação, não contribuiu para a completa permeação do mesmo.

Além da ação nociceptiva, foi avaliado também a atividade antiedematogênica das formulações desenvolvidas, as quais estão demonstradas na Figura 37.

Figura 37. Atividade antiedematogênica. Diâmetro da pata traseira esquerda (mm) (n=14).



Após análise estatística *2-way ANOVA*, verifica-se na Figura 37 que não há diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos no T0h e no T1h, demonstrando que o diâmetro médio plantar basal e o edema formado após a adição de carragenina foram semelhantes para todos os grupos estudados.

Durante todo o tempo de estudo, verifica-se que não há diferença significativa entre todos os tratamentos em comparação com o grupo controle negativo ($P>0,05$), com exceção apenas do tempo 4h para o grupo tratado com a formulação F1.RES, demonstrando que a formulação F1.RES apresentou redução do edema da pata, mais rapidamente que os demais grupos.

Após 6h de tratamento, verifica-se que o grupo tratamento com a formulação F2.RES apresenta diferença significativa do diâmetro plantar (mm) médio em relação ao grupo tratado com dexametasona ($p<0,05$), sendo que o grupo tratado com o creme de dexametasona apresentou menor diâmetro plantar (mm).

A resposta inflamatória aguda é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e a infiltração celular, levando a formação do edema (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A injeção de carragenina na pata do animal induz a formação de um edema em duas fases, sendo a primeira fase caracterizado por um edema de menor intensidade e não relacionado com a dose de carragenina utilizada; enquanto a segunda fase desenvolve-se após 24 horas, exibindo um pronunciado edema com máximo efeito em 48 e 72 horas (HENRIQUES et al., 1986).

Um estudo conduzido por POSADAS et al. (2004) avaliou se o desenvolvimento do edema é dependente da idade e o peso dos animais testados. Os resultados desse estudo demonstraram que animais com 3 ($15,6 \pm 0,29$ g) ou 4 ($21,8 \pm 0,69$ g) semanas de idade apresentam significativamente menor formação de edema quando comparados com animais mais velhos. Esses dados sugerem que, no ponto de 6 h, mesmo que o volume da pata seja reduzido, existe uma infiltração celular consistente mantida no mesmo nível até 24 h.

Os animais utilizados em nosso estudo apresentavam-se com 4 semanas de idade (~25,0 g), o que pode explicar a baixa redução do edema pelos tratamentos, sendo todos eles significativamente semelhantes ao controle negativo (sem tratamento).

Para se obter resultados reprodutivos relacionados ao edema, é necessário a utilização de camundongos de 7 a 8 semanas de idade, pesando mais de 30,0 gramas. Além disso, quando camundongos jovens são utilizados, deve-se considerar que a distribuição da enzima e o início do mediador podem mudar consistentemente (POSADAS et al., 2004).

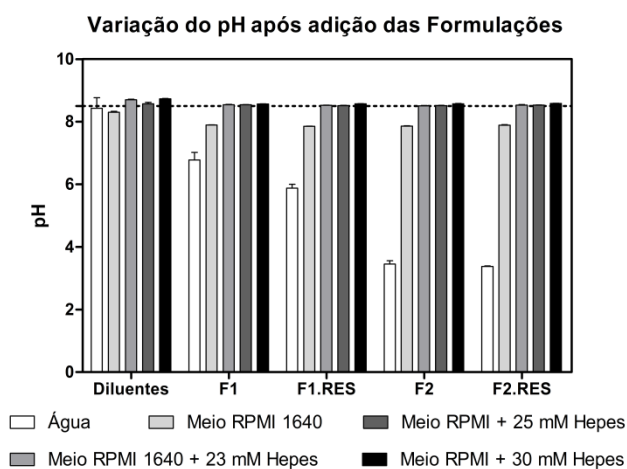
4.10 Avaliação das condições de cultivo celular para a realização dos ensaios de MTT e da Calceína

4.10.1 Avaliação do pH do meio para o cultivo celular

O pH adequado para o cultivo celular, para a maioria das células de mamíferos, é entre 7,2 a 7,4. O não atendimento desse critério pode resultar em efeitos nocivos para as células; desta maneira, o meio de cultura deve apresentar uma capacidade tamponante. A principal causa para a mudança de pH é o CO₂ produzido durante o metabolismo celular (YANG; XIONG, 2012). A maioria dos meios contem bicarbonato, necessitando de 5,0% de dióxido de carbono atmosférico para manter o pH do meio de cultura em 7,4. HEPES é um tampão orgânico, o qual é frequentemente adicionado ao meio de cultura para reduzir a necessidade e a dependência do bicarbonato (MASTERS; STACEY, 2007).

A adição das formulações ao meio de cultura para o tratamento das linhagens celulares pode resultar em alterações do microambiente e do pH do meio. Assim, foi avaliado a alteração do pH do meio de cultura com e sem HEPES após a adição das formulações no mesmo (100 µM), bem como avaliou-se o pH das formulações dispersas em água na mesma concentração, o resultado está representado na Figura 38.

Figura 38. Variação do pH dos meios após a adição das formulações.



A Figura 38 demonstra que o pH médio dos diluentes utilizados foi de 8,5. Conforme os dados obtidos, pode-se verificar que a adição das formulações à água promoveu a diminuição do seu pH, sendo que as F2 e F2.RES são as que apresentam o maior caráter ácido (pH ~4,0). A redução do pH do meio também pode ser evidenciado quando as formulações foram adicionadas no meio sem HEPES. Já para os meios acrescidos de HEPES (23, 25 e 30 mM), verificou-se que houve a manutenção do pH dos mesmos após a adição das formulações. Assim, para a realização de todos os ensaios posteriores, utilizou-se meio com 23 mM de HEPES para o

tratamento das linhagens celulares, uma vez que essa concentração foi suficiente para a manutenção do pH e menores concentrações diminuem o risco de citotoxicidade.

4.10.2 Avaliação da influência das formulações nas leituras de viabilidade celular

A toxicidade de nanopartículas tem sido extensivamente estudada; entretanto, é uma área relativamente nova e vários são os desafios devido a ausência de protocolos padronizados. Para isso, várias são as considerações a serem tomadas para se obter dados reais e confiáveis (HILLEGASS et al., 2010; KONG et al., 2011).

Para decidir sobre o método a ser utilizado para avaliar a citotoxicidade de nanopartículas, é importante escolher o método apropriado capaz de mensurar a toxicidade de interesse sem uma interpretação errônea de resultados falso-positivos e falso-negativos de toxicidade (KONG et al., 2011).

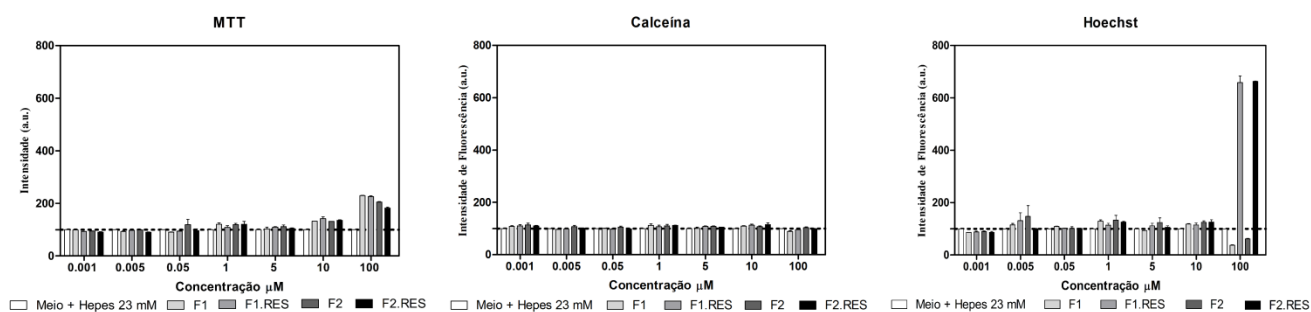
Muitas nanopartículas absorvem luz na faixa UV-Vis, sendo que a absorção e a dispersão da luz pelas nanopartículas pode levar a imprecisões nos dados; tem sido observado, por exemplo, que muitas nanopartículas quando estão dispersas em meio de cultura sem células absorvem luz a 525 nm, mesmo comprimento de onda utilizado no ensaio de MTT. Essa absorbância aumenta com o aumento da concentração das nanopartículas dispersas no meio e podem interferir os resultados da análise de MTT (DÍAZ et al., 2008).

A supressão de fluorescência também pode ser observada. Um estudo demonstrou que o negro de carbono pode acarretar em diminuição da fluorescência à medida que a concentração de negro de carbono aumenta (AAM; FONNUM, 2007).

A absorbância do meio de cultura e a dispersão de nanopartículas em meio de cultura devem ser previamente mensurados, a fim de avaliar os efeitos de ambos na absorbância obtida a partir das células tratadas com as nanopartículas (PARK et al., 2009a). Embora tenha sido descrito que as nanopartículas podem interferir com os ensaios de citotoxicidade com resultados falso-positivo e -negativo, é difícil prever qual tipo de nanopartícula apresentará esses efeitos (DHAWAN; SHARMA, 2010; JONES; GRAINGER, 2009; PARK et al., 2009b). Assim, sugere-se que sejam realizados pelo menos dois ou mais ensaios independentes, utilizando diferentes metodologias, para evitar os erros (KONG et al., 2011).

Sendo assim, a Figura 39 demonstra a interferência das dispersões das formulações desenvolvidas, em diferentes concentrações de RES (μM), em meio de cultura contendo 23 mM de HEPES, na absorção de luz a 570 nm, mesmo comprimento de onda utilizado no ensaio de MTT e sobre as fluorescências verde e azul para o ensaio de citotoxicidade por calceína.

Figura 39. Interferência das formulações nas leituras de MTT e Live/Dead.



De acordo com os resultados representados na Figura 39, verifica-se que as dispersões de nanopartícula em meio de cultura com HEPES absorvem luz no mesmo comprimento de onda utilizado para o ensaio de MTT de maneira dose-dependente, bem como a intensidade da fluorescência do Hoechst, sendo que em concentrações maiores observa-se maior absorbância do que em concentrações menores. Uma vez que o Hoechst não é utilizado de maneira quantitativa no ensaio de citotoxicidade, sendo utilizado apenas como corante para marcação do núcleo para a avaliação microscópica das células, a interferência na sua intensidade não traria resultados falso-positivos para a análise.

Já para os valores de intensidade de fluorescência da calceína, verifica-se que não há interferência das dispersões de nanopartículas em meio de cultura em relação à intensidade de fluorescência para o ensaio de calceína para todas as concentrações testadas, sendo o ensaio de calceína um método confiável para a avaliação da citotoxicidade das formulações desenvolvidas.

4.11 Citotoxicidade das NLSs pelo método de MTT e calceína

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* avalia a capacidade intrínseca de um material em promover alteração metabólica nas células em cultura, podendo culminar ou não em morte celular. O parâmetro mais comumente utilizado para avaliar a citotoxicidade é a viabilidade celular (ROGERO et al., 2003).

A citotoxicidade de formulações pode ser determinada pelo cálculo do número de células viáveis nos poços tratados com NLS, comparando com o número de células viáveis em poços não tratados (branco). Os resultados são apresentados em porcentagem de células viáveis. Desta maneira, altas porcentagens de células viáveis indicam baixa toxicidade, sendo que 10% indica alta toxicidade, de 11 a 40% apresenta moderada toxicidade, de 40 a 70% apresenta baixa toxicidade e $\geq 70\%$ ausência de toxicidade (SHUBAR et al., 2008).

As linhagens celulares utilizadas foram melanoma murino (B16F10) e queratinócitos humanos imortalizados (HaCat), utilizada como controle de células saudáveis. Os resultados

referentes à viabilidade celular (%) e o IC_{50} , o qual foi calculado automaticamente pelo software GraphPad Prim[®] 5.0, estão demonstrados na Figura 40, para o ensaio de MTT, e Figura 41, para o ensaio de calceína. Todos os experimentos foram realizados em três experimentos independentes (n=3).

Figura 40. Citotoxicidade das formulações F1 e F1.RES; F2 e F2.RES, para a linhagem celular de HaCat e para a linhagem celular de melanoma B16F10, utilizando MTT.

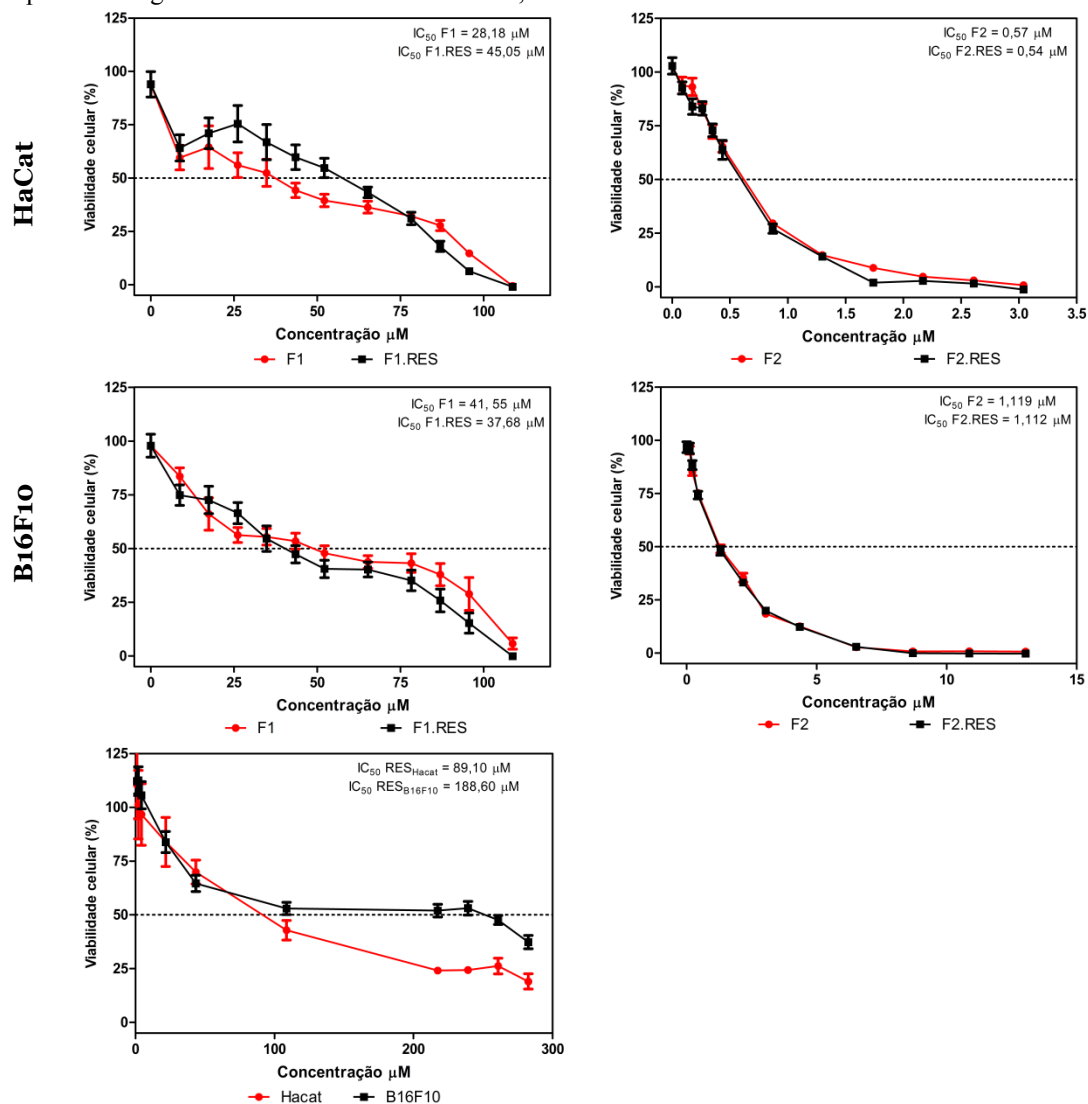


Figura 41. Citotoxicidade das formulações F1 e F1.RES; F2 e F2.RES, para a linhagem celular de HaCat e para a linhagem celular de melanoma B16F10, utilizando calceína.

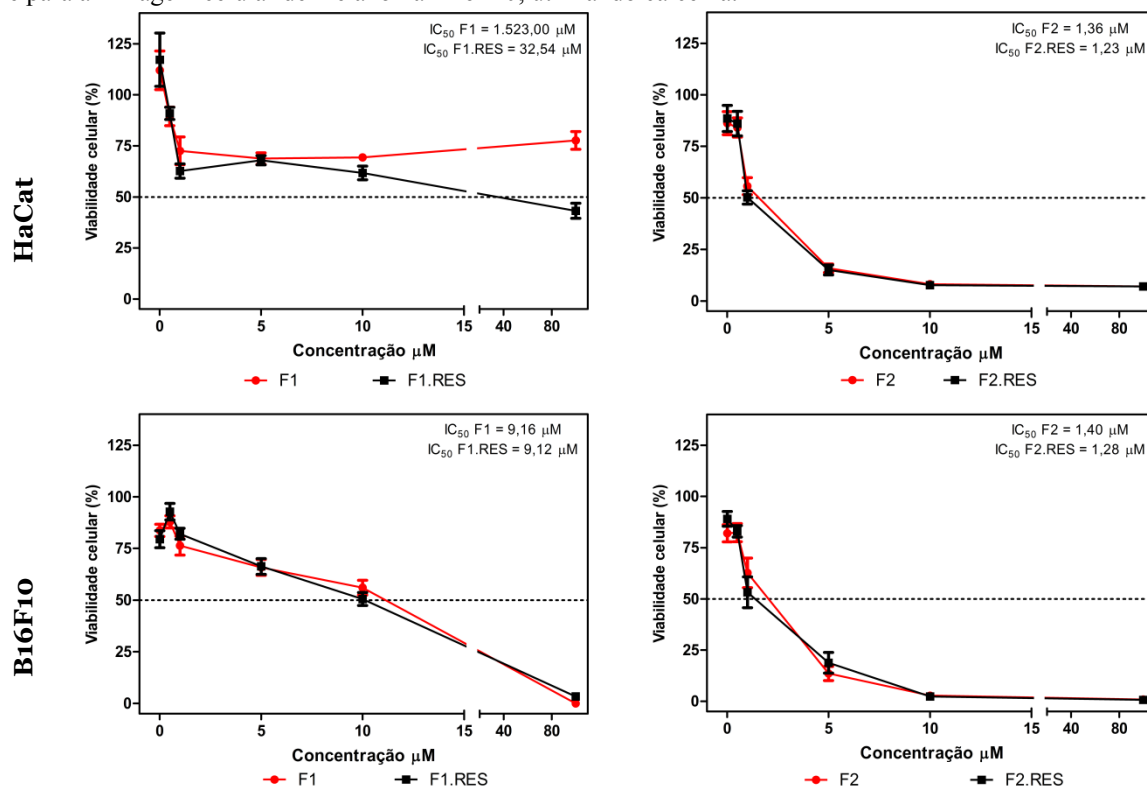
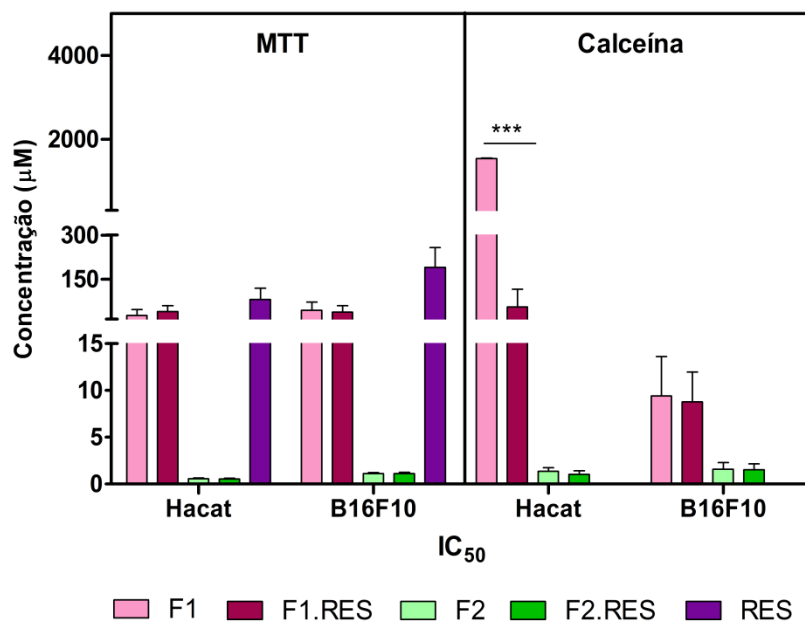


Figura 42. IC₅₀ para as formulações desenvolvidas para a linhagem HaCat e B16F10 nos ensaios de MTT e calceína.



De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que para o ensaio de MTT (Figura 40) ambas as formulações com e sem RES, não apresentaram diferença significativa na

citotoxicidade para as duas linhagens estudadas. O mesmo não ocorre, quando as formulações são avaliadas pelo ensaio de calceína (Figura 41), no qual se verifica que para a linhagem HaCat, a formulação F1 apresentou baixa toxicidade em todas as concentrações avaliadas. Já a formulação F1.RES, apresentou citotoxicidade quando utilizadas em doses mais altas (~100 μ M).

É possível verificar na Figura 42, que de acordo com o IC_{50} das formulações F1 e F1.RES no ensaio de calceína, ambas as formulações apresentaram ser mais citotóxicas para a linhagem tumoral B16F10 (9 μ M e 8 μ M, respectivamente para F1 e F1.RES), do que para a linhagem HaCat (~1500 μ M e 55 μ M, respectivamente para F1 e F1.RES), uma vez que são necessárias doses de até 7 vezes menores que as utilizadas para a linhagem HaCat para resultar em citotoxicidade das células tumorais, demonstrando que essas formulações apresentaram seletividade para células tumorais. Porém esse mesmo efeito não pode ser verificado no ensaio de MTT, no qual ambas as formulações apresentaram IC_{50} ~30 μ M para as duas linhagens celulares estudadas.

As formulações F2 e F2.RES demonstraram ser mais citotóxicas do que as formulações F1 e F1.RES para as duas linhagens testadas e nos dois ensaios realizados, MTT e calceína. Verificou-se que para alcançar 50% da viabilidade celular foram necessários 1,13 e 1,12 μ M para a linhagem tumoral e 0,57 e 0,53 μ M para a linhagem saudável, respectivamente, no ensaio de MTT e 1,60 e 1,51 μ M para a linhagem tumoral e 1,34 e 1,04 μ M para a linhagem saudável, respectivamente, no ensaio de calceína.

Com os resultados obtidos, pode-se verificar que a viabilidade celular em ambas as linhagens quando tratadas com as formulações F1 e F1.RES sofrem maior influência do método utilizado do que quando são tratadas com a formulação F2 e F2.RES.

A incorporação de tensoativos catiônicos, como o brometo de cetiltrimetilamônio (BC) nas NLS pode favorecer o direcionamento para as células tumorais, as quais possuem alta densidade de carga negativa devido à exposição de fosfatidilserina (FS) na superfície das membranas celulares (IWASAKI et al., 2009; SAKAMOTO et al., 2010a). Os resultados obtidos demonstram alta citotoxicidade para as formulações F2 e F2.RES quando comparado com as formulações F1 e F1.RES (sem BC). Porém, pode ser evidenciado que as formulações F2 e F2.RES apresentaram citotoxicidade semelhante nas linhagens estudadas, não havendo seletividade para as linhagens tumorais.

Tensoativos apresentam característica citotóxica, uma vez que promovem rompimento da membrana celular (LEE et al., 2000). Desta maneira, se faz necessário à utilização de concentrações bastante diluídas dessas formulações para se avaliar a ação citotóxica do fármaco encapsulado ou reduzir o tempo de tratamento nas células. Porém, ao se diluir as formulações, o fármaco também é diluído, podendo fazer com que o mesmo não apresente a ação esperada.

Tensoativos catiônicos são bastante citotóxicos quando comparados com outros tensoativos (LEE et al., 2000) fazendo com que a diluição das formulações que contem esse componente, necessite serem maiores.

Ambas as formulações F1.RES e F2.RES demonstraram-se mais citotóxicas que o RES em solução, aproximadamente 82 e 190 μM para a linhagem saudável HaCat, e a linhagem tumoral B16F10, respectivamente. Verifica-se que o RES necessita de uma dose aproximadamente 2 vezes maior para alcançar a mesma citotoxicidade de 50% para a linhagem tumoral (B16F10), do que para a linhagem saudável (HaCat). Células tumorais normalmente apresentam mecanismos que as tornam mais resistentes à terapia que as células saudáveis, como, por exemplo, a inativação de fármacos, alteração de alvos celulares, supressão do fármaco, mecanismos de efluxo, entre outros mecanismos; desta maneira, se faz necessário à utilização de maiores concentrações de fármacos para a produção do mesmo efeito (VINOGRADOV; WEI, 2012)

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é utilizado como estudo preliminar para avaliar as concentrações de trabalho para a continuidade dos estudos *in vitro*, os quais serão necessários para estimar os efeitos da formulação no ciclo celular e no ensaio de internalização. Desta maneira, foram considerados os valores de IC_{50} das formulações obtidos no ensaio com calceína para a continuidade dos estudos.

4.12 Ciclo celular das linhagens HaCat e B16F10 após o tratamento com NLSs

A divisão celular consiste em dois processos consecutivos, principalmente caracterizados pela replicação do DNA e a segregação dos cromossomos replicados em duas células distintas (ELLEDGE, 1996). A replicação do DNA ocorre em uma parte específica da interfase, chamada fase S, a qual é precedida por uma lacuna chamada G1, durante a qual a célula é preparada para a síntese de DNA e seguida pela lacuna chamada de G2, na qual a célula se prepara para a mitose. Assim, as fases G1, S, G2 e M são as subdivisões tradicionais no ciclo celular padrão (VERMEULEN et al., 2003).

A análise do ciclo celular pode também ser utilizada para avaliar e quantificar apoptose, mecanismo de morte celular programada, por meio da análise de células com menos conteúdo de DNA que $2n$, o que são chamados em células com sub-G0/G1. Durante a apoptose, o DNA é degradado por endonucleases celulares; desta maneira, os núcleos de células em apoptose contêm menos DNA do que núcleos de células saudáveis, resultando em um pico sub-G0/G1 no histograma de fluorescência, que pode ser utilizado para determinar a quantidade de células apoptóticas em uma amostra (NICOLETTI et al., 1991; RICCARDI; NICOLETTI, 2006).

O ensaio de citometria avalia a intensidade de fluorescência resultante da ligação do fluorocromo ao DNA, a qual é diretamente proporcional à quantidade do material genético presente no núcleo celular.

As Figuras 43 e 44 demonstram a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular das linhagens HaCat e B16F10, respectivamente, após o tratamento com as NLSs e solução de RES, bem como de solução de doxorubicina a 0,5 µg/mL (controle positivo).

Figura 43. Ciclo celular da linhagem HaCat após 12 horas de tratamento com as NLSs, e recuperadas durante 24, 48 e 72 horas.

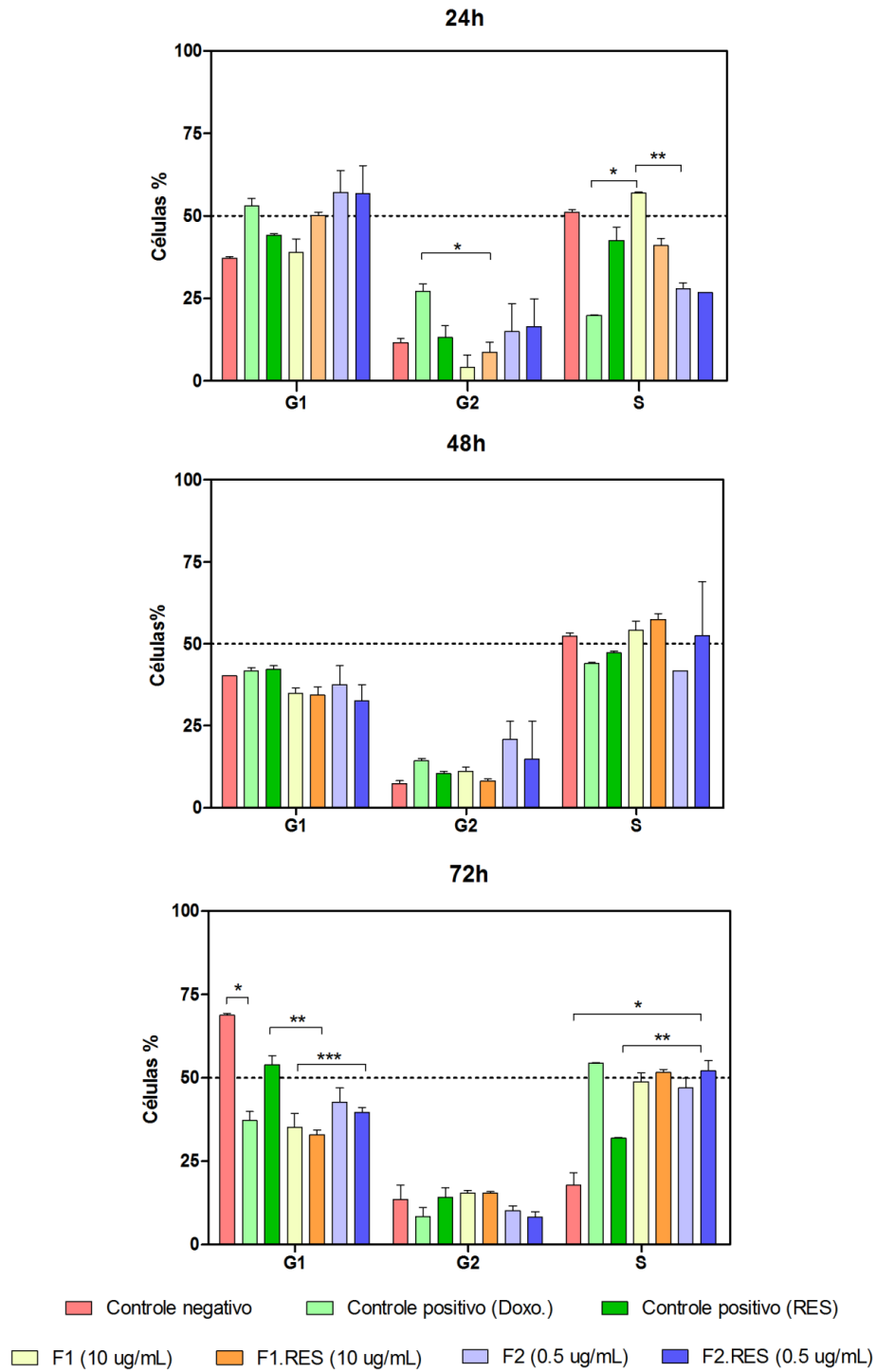
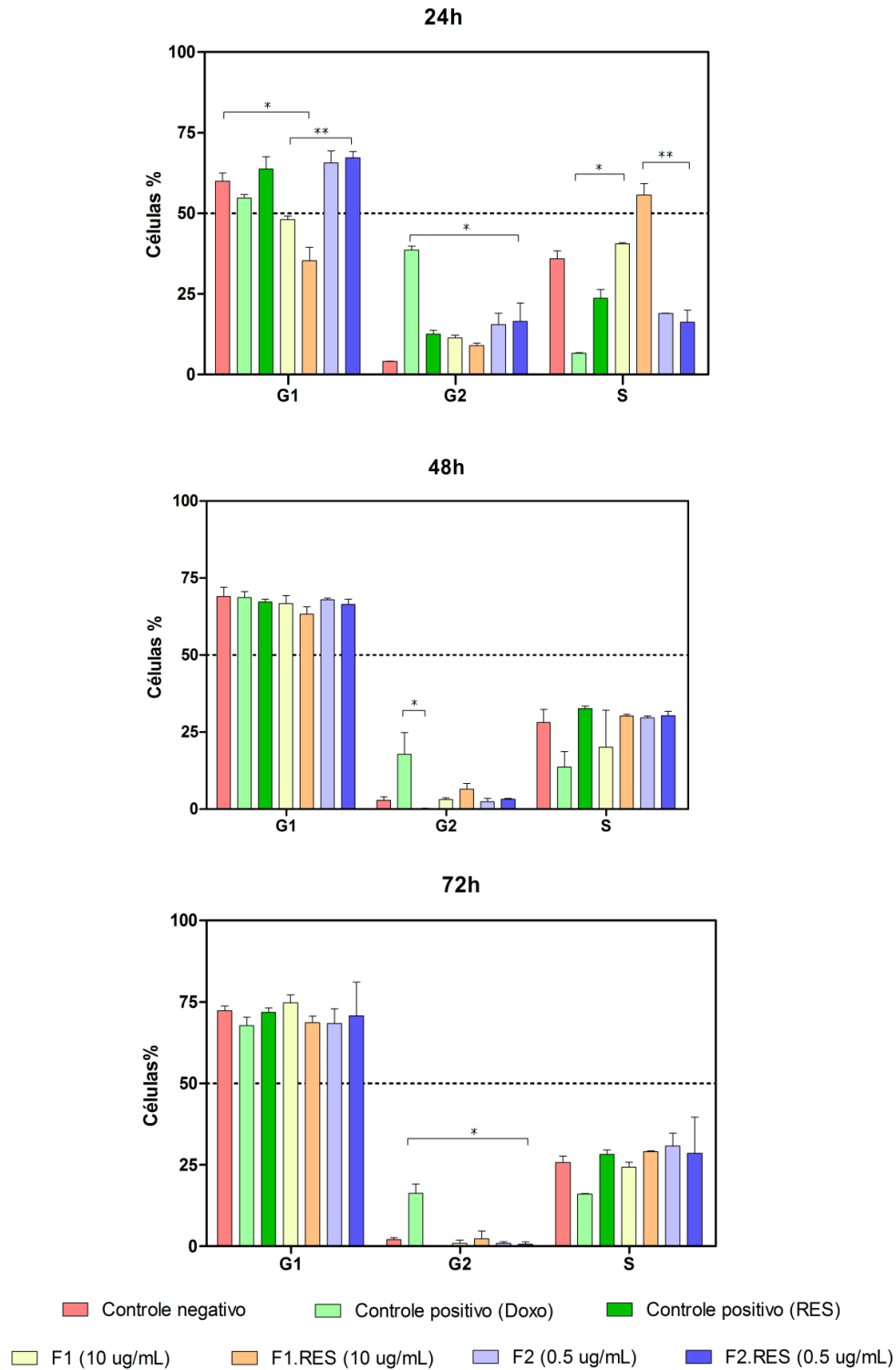


Figura 44. Ciclo celular da linhagem B16F10 após 12 horas de tratamento com as NLSs, e recuperadas durante 24, 48 e 72 horas.



Conforme demonstrado nas Figuras 43 e 44, podemos observar que o tratamento das células com as formulações de NLSs é capaz de promover parada do ciclo celular.

Pôde ser observado na Figura 43, após 24 horas, que a porcentagem de células HaCat nas fases G2/M do ciclo celular foi aumentada para o tratamento com controle positivo (doxorrubicina) e para as formulações F2 e F2.RES. Além disso, observou-se diminuição da porcentagem de células HaCat na fase S do ciclo celular para os tratamentos com F2, F2.RES e F1.RES, além do controle positivo (doxorrubicina), fase na qual a célula sintetiza uma cópia completa do DNA em seu núcleo (SCHAFER, 1998). Ela também duplica uma estrutura organizadora de microtúbulos chamada de centrossomo. Os centrossomos ajudam a separar o DNA durante a fase M (SANTELLI, 2009). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos referentes à viabilidade celular, o qual demonstrou um aumento significativo nas taxas de mortalidade para o tratamento com as formulações F1.RES, F2 e F2.RES. Verifica-se ainda que houve recuperação das células após 48 e 72 horas após o tratamento.

Para as células tratadas com a formulação F1, observa-se que não houve alteração significativa na porcentagem de células na fase G2/M e houve significativo aumento na porcentagem de células na fase S, demonstrando que não houve parada no ciclo celular, resultados esses correspondentes ao ensaio de viabilidade celular pelo ensaio com calceína, no qual demonstra ausência de citotoxicidade por esse tratamento (Figura 42).

Na Figura 44, após 24 horas, verifica-se o mesmo efeito no ciclo celular das células B16F10, com exceção para as células tratadas com as formulações F1 e F1.RES, que o observado para as células HaCat. Verifica-se na Figura 44 que a porcentagem de células B16F10 nas fases G2/M do ciclo celular foi aumentada para o tratamento com controle positivo (doxorrubicina) e para as formulações F2 e F2.RES. Além disso, também pôde ser observada diminuição da porcentagem de células B16F10 na fase S do ciclo celular para os tratamentos com F2, F2.RES, além do controle positivo (doxorrubicina). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos referentes à viabilidade celular das células B16F10, os quais foram mais citotóxicos para as formulações F2 e F2.RES do que para as células HaCat. Assim, como para as células HaCat, verifica-se que houve recuperação das células após 48 e 72 horas após o tratamento, com exceção das células tratadas com o controle positivo (doxorrubicina).

Para as células tratadas com a formulação F1 e F1.RES, observa-se que não houve alteração significativa na porcentagem de células na fase G2/M e houve significativo aumento na porcentagem de células na fase S, demonstrando que não houve parada no ciclo celular.

4.13 Ensaio de internalização celular nas linhagens HaCat e B16F10

A interação entre as partículas coloidais e as células é de extrema importância, uma vez que essa interação apresenta um impacto importante na administração de medicamentos ou de genes. Várias rotas para a absorção de partículas pelas células são conhecidas (IVERSEN et al., 2011).

Ensaio quantitativo para avaliar a internalização de nanopartículas são necessários e vem sendo relatados na literatura. Além das microscopias, a análise por citometria de fluxo de alto rendimento (classificação de células por fluorescência, FACS) é a metodologia mais descrita (AI et al., 2005; REIBETANZ et al., 2007; ZAUNER et al., 2001).

FACS é um método de alto rendimento, que permite análises automatizadas célula a célula, avaliando desde o tamanho da célula que passa a rugosidade de sua superfície; além disso, quando equipado com detectores de fluorescência, possibilita a quantificação de fluorescência por célula (SHAPIRO, 2005).

Após a execução do ensaio de citometria por FACS os resultados foram plotados em gráficos de densidade bidimensional (2D), e o número de eventos que foram detectados foram codificado por cores. As figuras 45, 46 e 47 demonstram os resultados do ensaio de internalização celular após o tratamento das células com as formulações desenvolvidas, bem como para as que foram tratadas com o controle, sendo tratamento com meio sem soro (controle negativo) e SLN padrão marcada com Rhodamina PE (controle positivo).

Figura 45. Ensaio de internalização celular por citometria de fluxo. Controle negativo (esquerda) e controle positivo (direita) de internalização após 4 horas de tratamento com meio de cultura sem soro e NLSS padrão marcadas com Rhodamina PE, respectivamente.

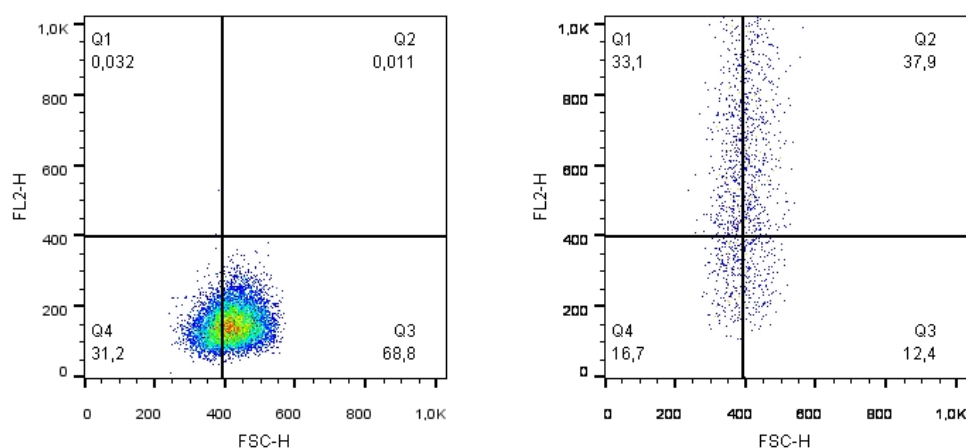


Figura 46. Ensaio de internalização celular por citometria de fluxo para a linhagem de queratinócitos imortalizados (HaCat). Células tratadas com correspondente 10 μ M de RES para as formulações F1 e F1.RES (parte superior esquerda e direita, respectivamente), e 1 μ M de RES para as formulações F2 e F2.RES (parte inferior esquerda e direita, respectivamente).

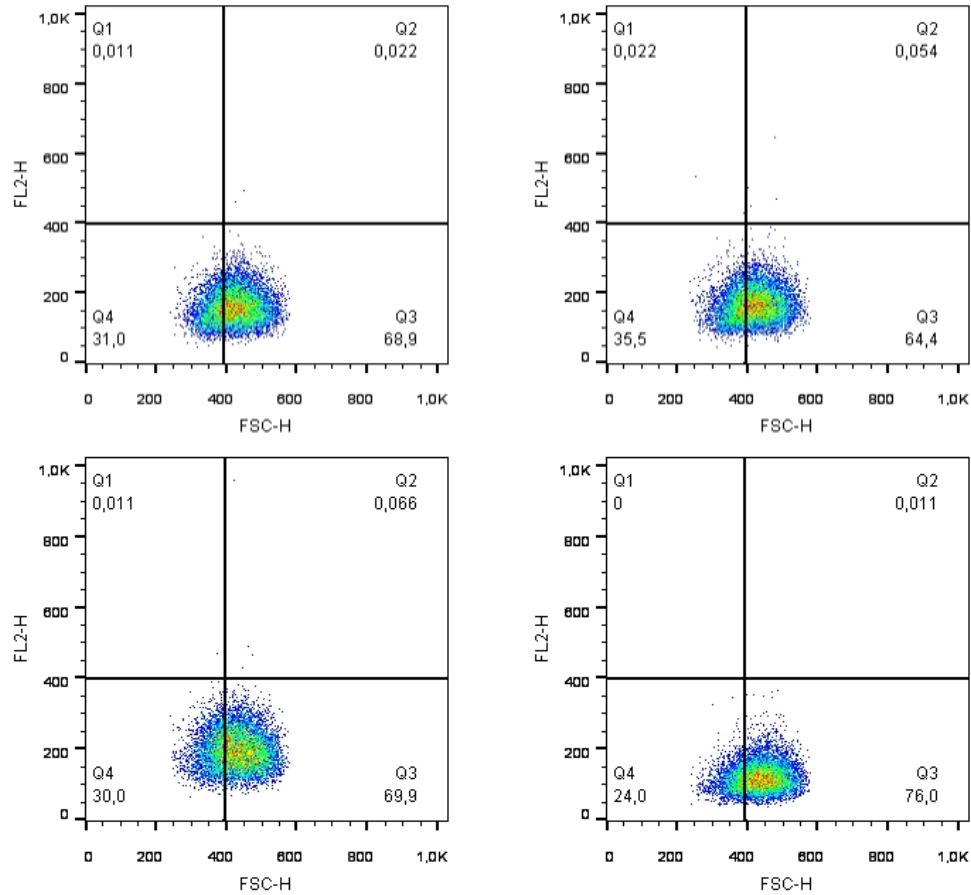
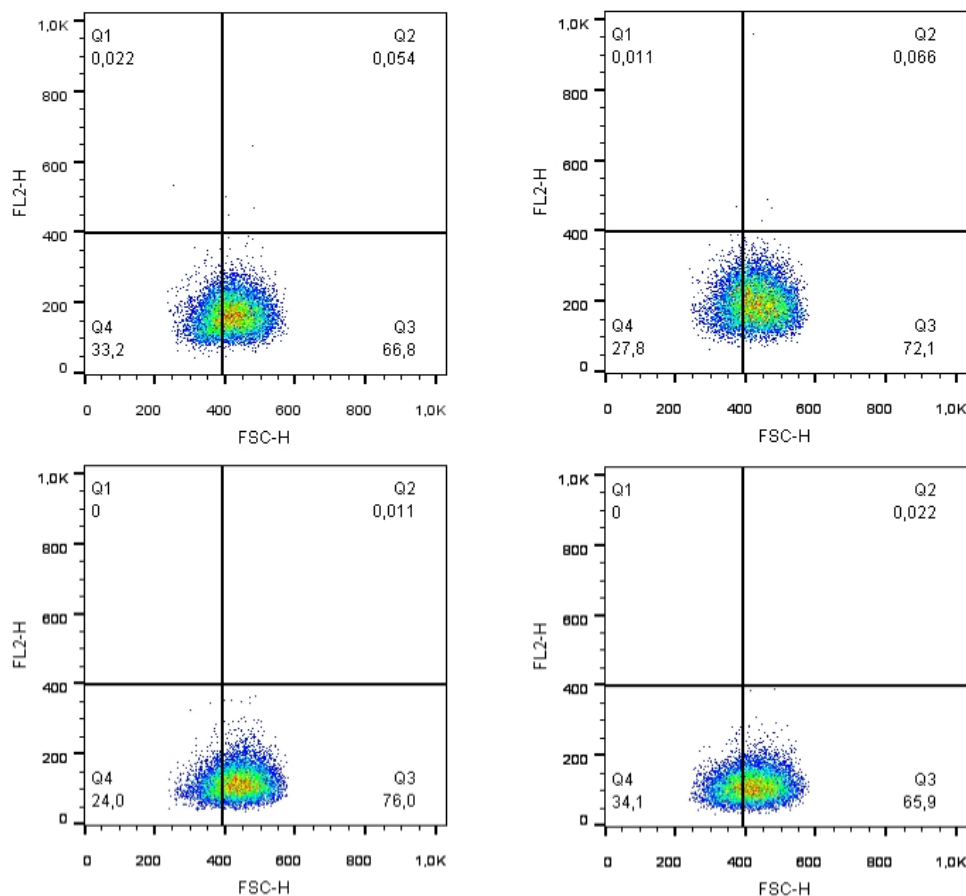


Figura 47. Ensaio de internalização celular por citometria de fluxo para a linhagem de melanoma murino (B16F10). Células tratadas com correspondente 10 μ M de RES para as formulações F1 e F1.RES (parte superior esquerda e direita, respectivamente), e 1 μ M de RES para as formulações F2 e F2.RES (parte inferior esquerda e direita, respectivamente).



O gráfico de densidade 2D pode ser dividido em quatro quadrantes, sendo que os principais eventos de espalhamento direto correspondem às partículas grandes, como, por exemplo, células ou células com nanopartículas associadas, enquanto que os eventos menores de espalhamento direto correspondem a partículas menores, como, por exemplo, nanopartículas ou detritos. A alta intensidade de fluorescência, por outro lado, corresponde a objetos que contêm nanopartículas marcadas com fluoróforo. No estudo foi utilizado fluoróforo vermelho. Desta maneira, pode ser associado ao quadrante superior esquerdo (Q1), baixa dispersão para frente com alta fluorescência, o que significa partículas pequenas com alta fluorescência vermelha (nanopartículas marcadas). O quadrante inferior esquerdo (Q4) refere-se à baixa dispersão para frente com baixa fluorescência, o que significa partículas pequenas com baixa fluorescência (detritos celulares ou fragmentos de nanopartículas). O quadrante superior direito (Q2) corresponde à alta dispersão para frente com alta fluorescência, o que significa partículas grandes com alta fluorescência (células com partículas internalizadas ou células com partículas associadas). Não é possível distinguir células com partículas internalizadas de células com

partículas aderentes à sua superfície exterior. O quadrante inferior direito (G3) corresponde à alta dispersão para frente com baixa fluorescência, o que significa partículas grandes com baixa fluorescência (células com ausência de internalização) (SEMMLING et al., 2008).

Assim, de acordo com as Figuras 46 e 47, pode-se observar que não houve internalização celular para as linhagens estudadas após 4 horas de tratamento.

Vários são os fatores determinantes da internalização celular, dentre eles pode ser destacado o tipo celular, o diâmetro médio, o formato das partículas, a carga superficial, a concentração de partículas utilizadas, o tempo de tratamento e o ciclo celular (FRÖHLICH, 2012; SEMMLING et al., 2008; TREUEL et al., 2013; ZAUNER et al., 2001).

ZAUNER et al. (2001) avaliaram a capacidade de diferentes linhagens celulares na internalização de microesferas de diferentes tamanhos (20 a 1010 nm). Os resultados desse estudo demonstraram que todas as linhagens celulares internalizaram as partículas de 20 nm; entretanto, para as microesferas maiores que 90 nm, houve distinção de internalização de acordo com a linhagem celular utilizada, sendo que algumas linhagens celulares puderam internalizar partículas com 1010 nm, tais como o carcinoma de células escamosas HNX 14C e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), as quais apresentaram pelo menos 70% de internalização das microesferas.

Um estudo conduzido por REJMAN et al. (2004) avaliou a influência do tamanho da partícula nos mecanismos de internalização em células B16F10. Os resultados demonstraram que a internalização de partículas com diâmetro entre 50 e 100 nm foi relativamente um processo rápido, sendo que em 30 minutos havia 50% de células com partículas internalizadas. Em contraste, partículas com aproximadamente 200 nm, após 4 horas de tratamento, não tinham atingido o compartimento lisossômico. Além disso, os pesquisadores evidenciaram que, embora uma porção das partículas com diâmetro próximo a 200 nm foi internalizada via mediada por clatrina, esse processo foi substancialmente lento, e uma significativa internalização apenas tornou-se aparente após várias horas, demonstrando que o atraso na internalização é tempo-dependente. Os resultados demonstraram ainda que o tamanho da partícula determina a via de entrada nas células, sendo que a endocitose mediada por clatrina demonstrou que o limite de tamanho para que haja a internalização foi de até 200 nm.

O diâmetro hidrodinâmico médio das formulações desenvolvida foi de $195,0 \pm 3,34$ nm, $241,3 \pm 48,33$ nm, $159,15 \pm 4,78$ nm e $158,25 \pm 33,92$ nm para F1, F1.RES, F2 e F2.RES, respectivamente (Figura 27), valores próximos a 200 nm, o que faz com que o processo de internalização possa ter sido mais lento, necessitando, possivelmente, de maior tempo de estudo.

Outro fator importante para a entrada das nanopartículas pelas células é a carga superficial. As nanopartículas catiônicas podem entrar nas células escapando da rota de endocitose tradicional, esse mecanismo de rápida internalização, é conhecida como translocação

direta, e é uma entrada não convencional, geralmente complementar à endocitose. No entanto, os mecanismos de translocação direta de NPs catiônicas através das membranas celulares para o citossol ainda não são entendidos. Além disso, a relação entre translocação direta e endocitose também não é clara (LIN; ALEXANDER-KATZ, 2013). Esses efeitos não foram observados pelas células tratadas com as formulações catiônicas (F2 e F2.RES), o que contribui para a repetição do ensaio, utilizando maior tempo de tratamento.

Para ensaios de internalização celular com mais de 10 horas de tratamento, outro fator deve ser considerado, o ciclo celular. Estudo conduzido por TREUEL et al. (2013) demonstrou que a internalização de nanopartículas não dependia da fase do ciclo celular durante as primeiras 10 horas de tratamento; entretanto, as diferenças iniciam-se uma vez que há divisão celular durante a exposição das nanopartículas. As células em G0/G1 apresentam uma redução da concentração de nanopartículas internalizadas em comparação com as células nas outras fases. Quando as células que estavam expostas às nanopartículas se dividem e começa a entrar na fase S, a concentração de nanopartículas internalizadas é novamente reduzida em comparação com as células em fase G2/M. Esse efeito foi observado em diferentes linhagens celulares, utilizando diferentes meios.

Assim, antes de sugerir que não há a internalização das nanopartículas desenvolvidas, deveremos repetir os ensaios considerando as inúmeras variáveis que influenciam na internalização celular.

5. Conclusões

Os resultados dos ensaios de caracterizações físico-químicas realizadas, como o tamanho médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das NLSs, mostraram que as formulações compostas por brometo de cetrimônio apresentaram menor diâmetro médio quando comparadas com as formulações sem esse tensoativo catiônico.

As fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica (AFM) demonstraram que as formulações apresentaram a formação de estruturas em escala nanométrica, e que a morfologia pode ser alterada ao mudar a composição das formulações, sendo que as formulações sem BC (F1 e F1.RES) apresentaram morfologia anisométrica ovalada, ao passo que as formulações acrescidas de BC (F2 e F2.RES) apresentaram a formação de estruturas com morfologia esférica.

As análises de calorimetria exploratória diferencial demonstraram que houve redução da entalpia obtida das entalpias esperadas para todas as formulações, o que demonstra a interação desses componentes na formação dos sistemas. Pode-se verificar ainda ausência dos picos de fusão do RES nas formulações.

O método analítico desenvolvido para a quantificação do *trans*-resveratrol se mostrou satisfatório em relação à RDC n° 899/2003 e pode ser aplicado nas análises de RES encapsulado em nanopartículas.

A formulação F1.RES apresentou eficiência de encapsulação significativamente igual à formulação F2.RES (~50% do RES está encapsulado no sistema).

O ensaio de penetração *in vitro* das formulações desenvolvidas demonstrou que as formulações catiônicas (F2 e F2.RES) foram as que apresentaram maior permeação cutânea, sendo que no ensaio antinociceptivo e anti-edematogênico *in vivo* pôde ser observado que após 4 horas do tratamento, a formulação F2.RES apresentou significativa redução da atividade antinociceptiva. Em relação ao diâmetro médio plantar (mm), todos os tratamentos foram semelhantes ao controle negativo, o que pode ser decorrente da idade e peso dos animais.

É possível verificar na Figura 52, que de acordo com o IC₅₀ das formulações F1 e F1.RES no ensaio de calceína, ambas as formulações apresentaram ser mais citotóxicas para a linhagem tumoral B16F10 (9 µM e 8 µM, respectivamente para F1 e F1.RES), do que para a linhagem HaCat (~1500 µM e 55 µM, respectivamente para F1 e F1.RES), uma vez que são necessárias doses de até 7 vezes menores que as utilizadas para a linhagem HaCat para resultar em citotoxicidade das células tumorais, demonstrando que essas formulações apresentaram seletividade para células tumorais. Ambas as formulações F1.RES e F2.RES demonstraram ser mais citotóxicas que o RES em solução.

Os resultados demonstraram que o tratamento das células com as formulações desenvolvidas foi capaz de promover parada do ciclo celular após 24 horas de recuperação. O tratamento tanto da célula B16F10 quanto da célula HaCat demonstrou que a porcentagem de células nas fases G2/M do ciclo celular foi aumentada para o tratamento com as formulações F2 e F2.RES. Além disso, de diminuição da porcentagem de células na fase S do ciclo celular, fase na qual a célula sintetiza uma cópia completa do DNA em seu núcleo. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos referentes à viabilidade celular.

Para as células tratadas com a formulação F1 não houve alteração significativa na porcentagem de células na fase G2/M e houve significativo aumento na porcentagem de células na fase S, demonstrando que não houve parada no ciclo celular, para ambas as linhagens estudadas. Já para a formulação F1.RES observa-se houve distinção da ação de acordo com a linhagem celular, para a B16F10 não houve parada no ciclo celular, já para a linhagem HaCat houve parada do ciclo celular.

Os ensaios de internalização celular por citometria de fluxo demonstraram que não houve internalização celular para as linhagens estudadas após 4 horas de tratamento com as formulações desenvolvidas. Porém, novos ensaios deverem ser realizados considerando as inúmeras variáveis que influenciam na internalização celular.

Mediante os resultados apresentados, pôde-se concluir que as formulações catiônicas apresentaram melhor efeito biológico, com maior permeação cutânea *in vitro* e melhor ação antinociceptiva e antiedematogênica *in vivo*, quando comparado com as formulações aniônicas. Entretanto, as formulações aniônicas demonstraram-se mais estáveis em relação ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersidade e potencial zeta.

6. Referências

AAM, B. B.; FONNUM, F. Carbon black particles increase reactive oxygen species formation in rat alveolar macrophages in vitro. **Archives of toxicology**, v. 81, n. 6, p. 441-446, 2007.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual review of immunology**, v. 17, n. 1, p. 593-623, 1999.

ADES, A.; CARVALHO, J. P.; GRAZIANI, S. R.; AMANCIO, R. F.; SOUEN, J. S.; PINOTTI, J. A.; MARANHÃO, R. C. Uptake of a Cholesterol-Rich Emulsion by Neoplastic Ovarian Tissues. **Gynecologic Oncology**, v. 82, n. 1, p. 84-87, 2001.

AGAYAN, R. R.; HORVATH, T.; MCNAUGHTON, B. H.; ANKER, J. N.; KOPELMAN, R. Optical manipulation of metal-silica hybrid nanoparticles. Optical Science and Technology, the SPIE 49th Annual Meeting, 2004. International Society for Optics and Photonics. p.502-513.

AI, H.; PINK, J. J.; SHUAI, X.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. Interactions between self-assembled polyelectrolyte shells and tumor cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 73, n. 3, p. 303-312, 2005.

ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 4, p. 331-341, 2013.

ALNASIF, N.; ZOSCHKE, C.; FLEIGE, E.; BRODWOLF, R.; BOREHAM, A.; RÜHL, E.; ECKL, K.-M.; MERK, H.-F.; HENNIES, H. C.; ALEXIEV, U. Penetration of normal, damaged and diseased skin—An in vitro study on dendritic core-multishell nanotransporters. **Journal of Controlled Release**, v. 185, p. 45-50, 2014.

AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; BARRATT, G.; RENOIR, J.-M. Polyester-poly (ethylene glycol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: physicochemical and opsonization properties. **Pharmaceutical research**, v. 20, n. 7, p. 1063-1070, 2003.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

AMIRI, K. I.; RICHMOND, A. Role of nuclear factor- κ B in melanoma. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 24, n. 2, p. 301-313, 2005.

AMRI, A.; CHAUMEIL, J.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. Administration of resveratrol: what formulation solutions to bioavailability limitations? **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 182-193, 2012.

ANDREWS, S. N.; JEONG, E.; PRAUSNITZ, M. R. Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum. **Pharmaceutical research**, v. 30, n. 4, p. 1099-1109, 2013.

APOPA, P.; QIAN, Y.; SHAO, R.; GUO, N.; SCHWEGLER-BERRY, D.; PACURARI, M.; PORTER, D.; SHI, X.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. **Particle and fibre toxicology**, v. 6, n. 1, p. 1, 2009.

ASHTIKAR, M.; NAGARSEKAR, K.; FAHR, A. Transdermal delivery from liposomal formulations—Evolution of the technology over the last three decades. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 126-140, 2016.

ATTAMA, A. A.; MOMOH, M. A.; BUILDERS, P. F. **Lipid nanoparticulate drug delivery systems: a revolution in dosage form design and development**. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 9535108107.

AUFFAN, M.; ROSE, J.; BOTTERO, J.-Y.; LOWRY, G. V.; JOLIVET, J.-P.; WIESNER, M. R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. **Nature nanotechnology**, v. 4, n. 10, p. 634-641, 2009.

BARBOSA, R.; DA SILVA, C.; BELLA, T.; DE ARAÚJO, D.; MARCATO, P.; DURÁN, N.; DE PAULA, E. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing the local anesthetic dibucaine designed for topical application. *Journal of Physics: Conference Series*, 2013. IOP Publishing. p.012035.

BAREFORD, L. M.; SWAAN, P. W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 8, p. 748-758, 2007.

BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 1, p. 21-50, 2010.

BARTOLI MIOT, L. D.; AMANTE MIOT, H.; GUIMARAES DA SILVA, M.; ALENCAR MARQUES, M. Fisiopatologia do melasma. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623-635, 2009.

BASPINAR, Y.; BORCHERT, H.-H. Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions—Is there a benefit of the positive charge? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1, p. 247-252, 2012.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 9, n. 5, p. 497-508, 2012.

BHATTACHARYA, S.; DARJATMOKO, S. R.; POLANS, A. S. Resveratrol Modulates the Malignant Properties of Cutaneous Melanoma via Changes in the Activation and Attenuation of the Anti-apoptotic Proto-oncogenic Protein Akt/PKB. **Melanoma research**, v. 21, n. 3, p. 180, 2011.

BIKLE, D. D.; XIE, Z.; TU, C.-L. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. **Expert review of endocrinology & metabolism**, v. 7, n. 4, p. 461-472, 2012.

BINKS, B. P.; WHITBY, C. P. Nanoparticle silica-stabilised oil-in-water emulsions: improving emulsion stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 253, n. 1, p. 105-115, 2005.

BOEHM, H. Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. **Carbon**, v. 40, n. 2, p. 145-149, 2002.

BOREHAM, A.; PFAFF, M.; FLEIGE, E.; HAAG, R.; ALEXIEV, U. Nanodynamics of dendritic core-multishell nanocarriers. **Langmuir**, v. 30, n. 6, p. 1686-1695, 2014.

BORGIA, S. L.; SCHLUPP, P.; MEHNERT, W.; SCHÄFER-KORTING, M. In vitro skin absorption and drug release—a comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 2, p. 380-389, 2008.

BRASIL. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. ANVISA. Diário Oficial da União, Brasília: 47 p. 2003.

BREITENBACH, J. S.; RINNERTHALER, M.; TROST, A.; WEBER, M.; KLAUSEGGER, A.; GRUBER, C.; BRUCKNER, D.; REITSAMER, H. A.; BAUER, J. W.; BREITENBACH, M. Transcriptome and ultrastructural changes in dystrophic Epidermolysis bullosa resemble skin aging. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 6, p. 389-411, 2015.

BRIGANTI, S.; CAMERA, E.; PICARDO, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 2, p. 101-110, 2003.

BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405-411, 2011.

BYRNE, J. D.; BETANCOURT, T.; BRANNON-PEPPAS, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1615-1626, 2008.

CADAU, S.; LEOTY-OKOMBI, S.; NAKAJIMA, S.; ANDRE-FREI, V. Endothelialized and innervated 3D skin glycated model. **Journal of Dermatological Science**, v. 84, n. 1, p. e147, 2016.

CADAU, S.; LEOTY-OKOMBI, S.; PAIN, S.; BECHETOILLE, N.; ANDRÉ-FREI, V.; BERTHOD, F. In vitro glycation of an endothelialized and innervated tissue-engineered skin to screen anti-AGE molecules. **Biomaterials**, v. 51, p. 216-225, 2015.

CALDERÓN, M.; QUADIR, M. A.; SHARMA, S. K.; HAAG, R. Dendritic polyglycerols for biomedical applications. **Advanced Materials**, v. 22, n. 2, p. 190-218, 2010.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer research**, v. 47, n. 4, p. 936-942, 1987.

CHANG, E.; THEKKEK, N.; YU, W. W.; COLVIN, V. L.; DREZEK, R. Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake. **Small**, v. 2, n. 12, p. 1412-1417, 2006.

CHANG, T.-S. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. **Materials**, v. 5, n. 9, p. 1661-1685, 2012.

CHAO, T.-Y.; LAVIS, L. D.; RAINES, R. T. Cellular uptake of ribonuclease A relies on anionic glycans. **Biochemistry**, v. 49, n. 50, p. 10666-10673, 2010.

CHEN, H.; CHANG, X.; DU, D.; LIU, W.; LIU, J.; WENG, T.; YANG, Y.; XU, H.; YANG, X. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 110, n. 2, p. 296-306, 2006.

CHEN, Y.; ZHOU, L.; YUAN, L.; ZHANG, Z.; LIU, X.; WU, Q. Formulation, characterization, and evaluation of in vitro skin permeation and in vivo pharmacodynamics of surface-charged tripterine-loaded nanostructured lipid carriers. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 3023-3032, 2012.

CHOI, K. Y.; CHUNG, H.; MIN, K. H.; YOON, H. Y.; KIM, K.; PARK, J. H.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. **Biomaterials**, v. 31, n. 1, p. 106-114, 2010.

CHOI, K. Y.; MIN, K. H.; YOON, H. Y.; KIM, K.; PARK, J. H.; KWON, I. C.; CHOI, K.; JEONG, S. Y. PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1880-1889, 2011.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R. N.; POMBO-NASCIMENTO, E.; VENTURA, D. M. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev bras farm**, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

CHORILLI, M.; PRESTES, P.; RIGON, R.; LEONARDI, G.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V.; OLIVEIRA, A. G. D.; SCARPA, M. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 182-188, 2011.

CHUAH, Y. K.; BASIR, R.; TALIB, H.; TIE, T. H.; NORDIN, N. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. **International journal of inflammation**, v. 2013, 2013.

CIDES, L.; ARAUJO, A.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J. Thermal behaviour, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 84, n. 2, p. 441-445, 2006.

CLAFFEY, K. P.; BROWN, L. F.; DEL AGUILA, L. F.; TOGNAZZI, K.; YEO, K.-T.; MANSEAU, E. J.; DVORAK, H. F. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. **Cancer research**, v. 56, n. 1, p. 172-181, 1996.

COTTART, C. H.; NIVET-ANTOINE, V.; LAGUILLIER-MORIZOT, C.; BEAUDEUX, J. L. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 1, p. 7-16, 2010.

DALE, B.; RESING, K.; LONSDALE-ECCLES, J. Filaggrin: A Keratin Filament Associated Proteina. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 455, n. 1, p. 330-342, 1985.

DAMINK, L.; DIJKSTRA, P.; VAN LUYN, M.; VAN WACHEM, P.; NIEUWENHUIS, P.; FEIJEN, J. Changes in the mechanical properties of dermal sheep collagen during in vitro degradation. **Journal of biomedical materials research**, v. 29, n. 2, p. 139-147, 1995.

DAMINK, L. O.; DIJKSTRA, P.; VAN LUYN, M.; VAN WACHEM, P.; NIEUWENHUIS, P.; FEIJEN, J. In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water-soluble carbodiimide. **Biomaterials**, v. 17, n. 7, p. 679-684, 1996.

DANCIK, Y.; BIGLIARDI, P. L.; BIGLIARDI-QI, M. What happens in the skin? Integrating skin permeation kinetics into studies of developmental and reproductive toxicity following topical exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 252-281, 2015.

DAUSEND, J.; MUSYANOVYCH, A.; DASS, M.; WALTHER, P.; SCHREZENMEIER, H.; LANDFESTER, K.; MAILÄNDER, V. Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. **Macromolecular bioscience**, v. 8, n. 12, p. 1135-1143, 2008.

DE BRUM, T. L.; FIEL, L. A.; CONTRI, R. V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules have diverse skin penetration. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 773-780, 2015.

DECUZZI, P.; FERRARI, M. The Receptor-Mediated Endocytosis of Nonspherical Particles. **Biophysical journal**, v. 94, n. 10, p. 3790-3797, 2008.

DETONI, C. B.; SOUTO, G. D.; DA SILVA, A. L. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and Skin Penetration of Different E-Resveratrol-Loaded Supramolecular Structures. **Photochem. Photobiol.**, v. 88, n. 4, p. 913-921, 2012.

DHAWAN, A.; SHARMA, V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 398, n. 2, p. 589-605, 2010.

DÍAZ, B.; SÁNCHEZ-ESPINEL, C.; ARRUEBO, M.; FARO, J.; DE MIGUEL, E.; MAGADÁN, S.; YAGÜE, C.; FERNÁNDEZ-PACHECO, R.; IBARRA, M. R.; SANTAMARÍA, J. Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. **Small**, v. 4, n. 11, p. 2025-2034, 2008.

DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. Mechanisms of endocytosis. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 857-902, 2009.

DOWLING, A.; CLIFT, R.; GROBERT, N.; HUTTON, D.; OLIVER, R.; O'NEILL, O.; PETHICA, J.; PIDGEON, N.; PORRITT, J.; RYAN, J. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. **London: The Royal Society & The Royal Academy of Engineering Report**, p. 61-64, 2004.

DUBE, D. H.; BERTOZZI, C. R. Glycans in cancer and inflammation—potential for therapeutics and diagnostics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 6, p. 477-488, 2005.

ELLEDGE, S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1664, 1996.

ESTIMATIVA, I. **Incidência de câncer no Brasil [Internet]**: Estimativa 2016.

FALCONER, J.; ROSS, J.; FEARON, K.; HAWKINS, R.; O'RIORDAIN, M.; CARTER, D. Effect of eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth in vitro of human pancreatic cancer cell lines. **British journal of cancer**, v. 69, n. 5, p. 826, 1994.

FARAGE, M. A.; MILLER, K. W.; ELSNER, P.; MAIBACH, H. I. Characteristics of the aging skin. **Advances in wound care**, v. 2, n. 1, p. 5-10, 2013.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, 2009.

FAZIO, M.; OLSEN, D.; UITTO, J. Skin aging: lessons from cutis laxa and elastoderma. **Cutis**, v. 43, n. 5, p. 437-444, 1989.

FIELD, C. J.; SCHLEY, P. D. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 6, p. 1190S-1198S, 2004.

FLAMAND, N.; MARROT, L.; BELAIDI, J.-P.; BOUROUF, L.; DOURILLE, E.; FELTES, M.; MEUNIER, J.-R. Development of genotoxicity test procedures with Episkin®, a reconstructed human skin model: Towards new tools for in vitro risk assessment of dermally applied compounds? **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 606, n. 1, p. 39-51, 2006.

FREEDMAN, J. A.; TYLER, D. S.; NEVINS, J. R.; AUGUSTINE, C. K. Use of gene expression and pathway signatures to characterize the complexity of human melanoma. **Am J Pathol**, v. 178, n. 6, p. 2513-22, 2011.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 5577-91, 2012.

GABIZON, A.; MARTIN, F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. **Drugs**, v. 54, n. 4, p. 15-21, 1997.

GAL, D.; OHASHI, M.; MACDONALD, P. C.; BUCHSBAUM, H. J.; SIMPSON, E. R. Low-density lipoprotein as a potential vehicle for chemotherapeutic agents and radionucleotides in the management of gynecologic neoplasms. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 139, n. 8, p. 877-885, 1981.

GALICHET, A.; WEIBEL, M.; HEIZMANN, C. W. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 370, n. 1, p. 1-5, 2008.

GANDINI, S.; AUTIER, P.; BONIOL, M. Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 107, n. 3, p. 362-366, 2011.

GARBE, C.; EIGENTLER, T. K.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHILD, A.; KIRKWOOD, J. M. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. **Oncologist**, v. 16, n. 1, p. 5-24, 2011.

GARDOUH, A. R.; GAD, S.; GHONAIM, H. M.; GHORAB, M. M. Design and characterization of glyceryl monostearate solid lipid nanoparticles prepared by high shear homogenization. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 3, p. 326-346, 2013.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GEHM, B. D.; MCANDREWS, J. M.; CHIEN, P.-Y.; JAMESON, J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 25, p. 14138-14143, 1997.

GKOGKOLOU, P.; BÖHM, M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging? **Dermato-endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 259-270, 2012.

GLOMB, M. A.; MONNIER, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 17, p. 10017-10026, 1995.

GOH, J. Z.; TANG, S. N.; CHIONG, H. S.; YONG, Y. K.; ZURAINI, A.; HAKIM, M. N. evaluation of antinociceptive activity of nanoliposome-encapsulated and free-form diclofenac in rats and mice. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 297, 2015.

GONÇALEZ, M.; CORRÊA, M.; CHORILLI, M. Skin delivery of kojic Acid-loaded nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of skin aging. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

GOVINDARAJAN, B.; SLIGH, J. E.; VINCENT, B. J.; LI, M.; CANTER, J. A.; NICKOLOFF, B. J.; RODENBURG, R. J.; SMEITINK, J. A.; OBERLEY, L.; ZHANG, Y. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 3, p. 719-729, 2007.

GRILL, A. E.; JOHNSTON, N. W.; SADHUKHA, T.; PANYAM, J. A review of select recent patents on novel nanocarriers. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, n. 2, p. 137-142, 2009.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GUO, L.; PENG, Y.; YAO, J.; SUI, L.; GU, A.; WANG, J. Anticancer Activity and Molecular Mechanism of Resveratrol–Bovine Serum Albumin Nanoparticles on Subcutaneously Implanted Human Primary Ovarian Carcinoma Cells in Nude Mice. **Cancer biotherapy & radiopharmaceutics**, v. 25, n. 4, p. 471-477, 2010.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147, 2007.

HAMBLIN, M. R.; AVCI, P.; PROW, T. **Nanoscience in Dermatology**. Elsevier Science, 2016. ISBN 9780128029459.

HAMMES, H.-P.; HOERAUF, H.; ALT, A.; SCHLEICHER, E.; CLAUSEN, J. T.; BRETZEL, R. G.; LAQUA, H. Nε (carboxymethyl) lysin and the AGE receptor RAGE colocalize in age-related macular degeneration. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 40, n. 8, p. 1855-1859, 1999.

HANAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HELGASON, T.; AWAD, T.; KRISTBERGSSON, K.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of colloid and interface science**, v. 334, n. 1, p. 75-81, 2009.

HENRIQUES, M.; SILVA, P.; MARTINS, M.; FLORES, C.; CUNHA, F.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...**[et al.], v. 20, n. 2, p. 243-249, 1986.

HILLIAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2873-2896, 2009.

HILLEGASS, J. M.; SHUKLA, A.; LATHROP, S. A.; MACPHERSON, M. B.; FUKAGAWA, N. K.; MOSSMAN, B. T. Assessing nanotoxicity in cells in vitro. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 3, p. 219-231, 2010.

HONG, R.-L.; HUANG, C.-J.; TSENG, Y.-L.; PANG, V. F.; CHEN, S.-T.; LIU, J.-J.; CHANG, F.-H. Direct Comparison of Liposomal Doxorubicin with or without Polyethylene Glycol Coating in C-26 Tumor-bearing Mice Is Surface Coating with Polyethylene Glycol Beneficial? **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 11, p. 3645-3652, 1999.

HOO, C. M.; STAROSTIN, N.; WEST, P.; MECARTNEY, M. L. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 1, p. 89-96, 2008.

HORI, M.; YAGI, M.; NOMOTO, K.; ICHIJO, R.; SHIMODE, A.; KITANO, T.; YONEI, Y. Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. **Anti-Aging Medicine**, v. 9, n. 6, p. 125-134, 2012.

HOWARD, K. A.; RAHBK, U. L.; LIU, X.; DAMGAARD, C. K.; GLUD, S. Z.; ANDERSEN, M. Ø.; HOVGAAARD, M. B.; SCHMITZ, A.; NYENGAARD, J. R.; BESENBACHER, F. RNA interference in vitro and in vivo using a chitosan/siRNA nanoparticle system. **Molecular Therapy**, v. 14, n. 4, p. 476-484, 2006.

HU, F.-Q.; JIANG, S.-P.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; YE, Y.-Q.; ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 3-4, p. 167-173, 2005.

ICH. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). p. 17, 2005.

INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M.; VENIR, E.; SPAZIANI, M.; MARCHESINI, G. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distribution and rheological properties of ice cream mixes. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1864-1875, 2009.

IVERSEN, T.-G.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. **Nano Today**, v. 6, n. 2, p. 176-185, 2011.

IWASAKI, T.; ISHIBASHI, J.; TANAKA, H.; SATO, M.; ASAOKA, A.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface. **Peptides**, v. 30, n. 4, p. 660-668, 2009.

IYER, A. K.; KHALED, G.; FANG, J.; MAEDA, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug discovery today**, v. 11, n. 17, p. 812-818, 2006.

JAIN, A.; JAIN, K.; KESHARWANI, P.; JAIN, N. K. Low density lipoproteins mediated nanoplatfoms for cancer targeting. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, n. 9, p. 1-38, 2013.

JAIN, P. K.; LEE, K. S.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYED, M. A. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 14, p. 7238-7248, 2006.

JARACZ, S.; CHEN, J.; KUZNETSOVA, L. V.; OJIMA, I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 17, p. 5043-5054, 2005.

JENNING, V.; GOHLA, S. H. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of microencapsulation**, v. 18, n. 2, p. 149-158, 2001.

JENNING, V.; THÜNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, n. 2, p. 167-177, 2000.

JIN, H.; LOVELL, J. F.; CHEN, J.; NG, K.; CAO, W.; DING, L.; ZHANG, Z.; ZHENG, G. Cytosolic delivery of LDL nanoparticle cargo using photochemical internalization. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 810-816, 2011.

JIN, S. G.; YOUSAF, A. M.; SON, M. W.; JANG, S. W.; KIM, D. W.; KIM, J. O.; YONG, C. S.; KIM, J. H.; CHOI, H.-G. Mechanical properties, skin permeation and in vivo evaluations of dexibuprofen-loaded emulsion gel for topical delivery. **Archives of pharmacal research**, v. 38, n. 2, p. 216-222, 2015.

JOHNSON, S.; NGUYEN, V.; CODER, D. Assessment of cell viability. **Current protocols in cytometry**, p. 9.2. 1-9.2. 26, 2013.

JONES, C. F.; GRAINGER, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 438-456, 2009.

JORES, K.; MEHNERT, W.; DRECHSLER, M.; BUNJES, H.; JOHANN, C.; MÄDER, K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 217-227, 2004.

JUHLIN, L.; MAGNOLDO, T.; DARMON, M. Expression of loricrin in skin disorders. **Acta dermato-venereologica**, v. 72, n. 6, p. 407-409, 1992.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European journal of dermatology: EJD**, v. 12, n. 4, p. 390-9; quiz 400-1, 2001.

KARAIPEKLI, A.; SARİ, A.; KAYGUSUZ, K. Thermal conductivity improvement of stearic acid using expanded graphite and carbon fiber for energy storage applications. **Renewable Energy**, v. 32, n. 13, p. 2201-2210, 2007.

KHALIL, M.; MARCELLETTI, J. F.; KATZ, L. R.; KATZ, D. H.; POPE, L. E. Topical application of docosanol-or stearic acid-containing creams reduces severity of phenol burn wounds in mice. **Contact dermatitis**, v. 43, n. 2, p. 79-81, 2000.

KHIAO IN, M.; WALLMEYER, L.; HEDTRICH, S.; RICHARDSON, K.; PLENDL, J.; KAESSMEYER, S. The effect of endothelialization on the epidermal differentiation in human three-dimensional skin constructs—A morphological study. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 61, n. 2, p. 157-174, 2015.

KIM, A.; YANG, Y.; LEE, M. S.; YOO, Y. D.; LEE, H. G.; LIM, J. S. NDRG2 gene expression in B16F10 melanoma cells restrains melanogenesis via inhibition of Mitf expression. **Pigment cell & melanoma research**, v. 21, n. 6, p. 653-664, 2008.

KIM, J.; WAN, C. K.; J O'CARROLL, S.; SHAIKH, S. B.; NICHOLSON, L. F. The role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in neuronal differentiation. **Journal of neuroscience research**, v. 90, n. 6, p. 1136-1147, 2012a.

KIM, M. Y. Nitric oxide triggers apoptosis in A375 human melanoma cells treated with capsaicin and resveratrol. **Molecular medicine reports**, v. 5, n. 2, p. 585-591, 2012.

KIM, S.; NG, W. K.; DONG, Y.; DAS, S.; TAN, R. B. Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 1, p. 37-42, 2012b.

KITTLER, S.; GREULICH, C.; GEBAUER, J.; DIENDORF, J.; TREUEL, L.; RUIZ, L.; GONZALEZ-CALBET, J.; VALLET-REGI, M.; ZELLNER, R.; KÖLLER, M. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 512-518, 2010.

KONG, B.; SEOG, J. H.; GRAHAM, L. M.; LEE, S. B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 929-941, 2011.

KRASNICI, S.; WERNER, A.; EICHHORN, M. E.; SCHMITT-SODY, M.; PAHERNIK, S. A.; SAUER, B.; SCHULZE, B.; TEIFEL, M.; MICHAELIS, U.; NAUJOKS, K. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. **International journal of cancer**, v. 105, n. 4, p. 561-567, 2003.

KRISTL, J.; TESKAČ, K.; CADDEO, C.; ABRAMOVIĆ, Z.; ŠENTJURC, M. Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 2, p. 253-259, 2009.

KÜCHLER, S.; RADOWSKI, M. R.; BLASCHKE, T.; DATHE, M.; PLENDL, J.; HAAG, R.; SCHÄFER-KORTING, M.; KRAMER, K. D. Nanoparticles for skin penetration enhancement—a comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 243-250, 2009.

KUKOWSKA-LATALLO, J. F.; CANDIDO, K. A.; CAO, Z.; NIGAVEKAR, S. S.; MAJOROS, I. J.; THOMAS, T. P.; BALOGH, L. P.; KHAN, M. K.; BAKER, J. R. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 12, p. 5317-5324, 2005.

KULKARNI, V. S. **Handbook of non-invasive drug delivery systems: science and technology**. Elsevier, 2009. ISBN 0815520263.

KUMAR, R.; PHILIP, A. Modified transdermal technologies: Breaking the barriers of drug permeation via the skin. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 1, p. 633-644, 2007.

KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K. Preparation and characterization of Paliperidone loaded solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 562-568, 2013.

KUNSTFELD, R.; WICKENHAUSER, G.; MICHAELIS, U.; TEIFEL, M.; UMEK, W.; NAUJOKS, K.; WOLFF, K.; PETZELBAUER, P. Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes diminishes tumor angiogenesis and melanoma growth in a "humanized" SCID mouse model. **Journal of investigative dermatology**, v. 120, n. 3, p. 476-482, 2003.

KUO, Y.-C.; CHEN, H.-H. Effect of electromagnetic field on endocytosis of cationic solid lipid nanoparticles by human brain-microvascular endothelial cells. **Journal of drug targeting**, v. 18, n. 6, p. 447-456, 2010.

KUO, Y.-C.; LIANG, C.-T. Catanionic solid lipid nanoparticles carrying doxorubicin for inhibiting the growth of U87MG cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 131-137, 2011.

KUO, Y.-C.; WANG, C.-C. Cationic solid lipid nanoparticles with primary and quaternary amines for release of saquinavir and biocompatibility with endothelia. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 101-105, 2013.

LABARRE, D.; VAUTHIER, C.; CHAUVIERRE, C.; PETRI, B.; MÜLLER, R.; CHEHIMI, M. M. Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush. **Biomaterials**, v. 26, n. 24, p. 5075-5084, 2005.

LEAMON, C. P.; REDDY, J. A. Folate-targeted chemotherapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 8, p. 1127-1141, 2004.

LEE, J. K.; KIM, D. B.; KIM, J. I.; KIM, P. Y. In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. **Toxicology in vitro**, v. 14, n. 4, p. 345-349, 2000.

LIN, J.; ALEXANDER-KATZ, A. Cell membranes open "doors" for cationic nanoparticles/biomolecules: insights into uptake kinetics. **Acs Nano**, v. 7, n. 12, p. 10799-10808, 2013.

LIU, J.; HU, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 2, p. 191-195, 2007.

LOWE, J. S. **Stevens & Lowe Histologia Humana**. Elsevier Brasil, 2015. ISBN 8535236899.

LUNDBERG, B. Preparation of drug low density lipoprotein complexes for delivery of antitumoral drugs via the low density lipoprotein pathway. **Cancer research**, v. 47, n. 15, p. 4105-4108, 1987.

MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 1, p. 271-284, 2000.

MAHOR, S.; RAWAT, A.; DUBEY, P. K.; GUPTA, P. N.; KHATRI, K.; GOYAL, A. K.; VYAS, S. Cationic transfersomes based topical genetic vaccine against hepatitis B. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, n. 1, p. 13-19, 2007.

MAILÄNDER, V.; LORENZ, M. R.; HOLZAPFEL, V.; MUSYANOVYCH, A.; FUCHS, K.; WIESNETH, M.; WALTHER, P.; LANDFESTER, K.; SCHREZENMEIER, H. Carboxylated superparamagnetic iron oxide particles label cells intracellularly without transfection agents. **Molecular imaging and biology**, v. 10, n. 3, p. 138-146, 2008.

MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 11, p. 592-599, 2009.

MANUAL, P. OxiSelect™ Nε-(carboxymethyl) lysine (CML) Competitive ELISA Kit.

MARA MAINARDES, R.; CRISTINA COCENZA URBAN, M.; OLIVEIRA CINTO, P.; VINICIUS CHAUD, M.; CESAR EVANGELISTA, R.; PALMIRA DAFLON GREMIAO, M. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 3, p. 275-285, 2006.

MARCATO, P.; CAVERZAN, J.; ROSSI-BERGMANN, B.; PINTO, E.; MACHADO, D.; SILVA, R.; JUSTO, G.; FERREIRA, C.; DURÁN, N. Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreen. Biological effects and skin permeation. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 1880-1886, 2011.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 6, n. 2, 2009.

MASQUELIER, M.; VITOLS, S.; PETERSON, C. Low-density lipoprotein as a carrier of antitumoral drugs: In vivo fate of drug-human-low-density lipoprotein complexes in mice. **Cancer research**, v. 46, n. 8, p. 3842-3847, 1986.

MASTERS, J. R.; STACEY, G. N. Changing medium and passaging cell lines. **Nature protocols**, v. 2, n. 9, p. 2276-2284, 2007.

MCCARBERG, B.; D'ARCY, Y. Options in topical therapies in the management of patients with acute pain. **Postgraduate medicine**, v. 125, n. sup1, p. 19-24, 2013.

MCMAHON, H. T.; BOUCROT, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 8, p. 517-533, 2011.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 2, p. 165-196, 2001a.

_____. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, 2001b.

MEHREL, T.; HOHL, D.; ROTHNAGEL, J. A.; LONGLEY, M. A.; BUNDMAN, D.; CHENG, C.; LICHTI, U.; BISHOP, M. E.; STEVEN, A. C.; STEINERT, P. M. Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. **Cell**, v. 61, n. 6, p. 1103-1112, 1990.

MEI, Z.; CHEN, H.; WENG, T.; YANG, Y.; YANG, X. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 2, p. 189-196, 2003.

MELNIKOVA, V.; BAR-ELI, M. Inflammation and melanoma growth and metastasis: the role of platelet-activating factor (PAF) and its receptor. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 26, n. 3-4, p. 359-371, 2007.

MERTSCHING, H.; WEIMER, M.; KERSEN, S.; BRUNNER, H. Human skin equivalent as an alternative to animal testing. **GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär**, v. 3, n. 1, 2008.

MINAYO, M. C. D. S. Aging of the Brazilian population and challenges for the health sector. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 2, p. 208-210, 2012.

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y. Nanoparticles-a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2007.

MONNIER, V. M.; MUSTATA, G. T.; BIEMEL, K. L.; REIHL, O.; LEDERER, M. O.; ZHENYU, D.; SELL, D. R. Cross-linking of the extracellular matrix by the maillard reaction in aging and diabetes: an update on "a puzzle nearing resolution". **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, n. 1, p. 533-544, 2005.

MOSBY, I. **Mosby's dictionary of medicine, nursing & health professions**. Elsevier Health Sciences, 2013. ISBN 0323074030.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, S.; EDMUNDS, M.; LEI, X.; OTTAVIANI, M. F.; ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; TURRO, N. J. Original Contribution: Stearic acid delivery to corneum from a mild and moisturizing cleanser. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 9, n. 3, p. 202-210, 2010.

MULLA, J.; KHAZI, I. Influence of process variables on particle size of solid lipid nanoparticles **Indian Journal of Novel Drug Delivery**, v. 1, n. 1, p. 47-49, 2009.

MÜLLER, R.; LUCKS, J. Arzneistoffträger aus festen lipidteilchen, feste lipidnanosphären (sln). **European patent**, v. 605497, 1996.

MÜLLER, R.; PETERSEN, R.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

MÜLLER, R.; RADTKE, M.; WISSING, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131-S155, 2002.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000a.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000b.

MULLER, R. H.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S. Production of solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. **Proceedings of the Controlled Release Society**, n. 20, p. 480-481, 1993.

NA, K.; SEONG LEE, E.; BAE, Y. H. Adriamycin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH-dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 87, n. 1, p. 3-13, 2003.

NDIAYE, M.; PHILIPPE, C.; MUKHTAR, H.; AHMAD, N. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 508, n. 2, p. 164-170, 2011.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Quim. Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

NEPAL, P. R.; HAN, H.-K.; CHOI, H.-K. Enhancement of solubility and dissolution of Coenzyme Q 10 using solid dispersion formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1, p. 147-153, 2010.

NEWA, M.; BHANDARI, K. H.; LI, D. X.; KWON, T.-H.; KIM, J. A.; YOO, B. K.; WOO, J. S.; LYOO, W. S.; YONG, C. S.; CHOI, H. G. Preparation, characterization and in vivo evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with poloxamer 188. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, n. 1, p. 228-237, 2007.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of immunological methods**, v. 139, n. 2, p. 271-279, 1991.

NIKOLAKIS, G.; ZOSCHKE, C.; MAKRANTONAKI, E.; HAUSMANN, C.; SCHÄFER-KORTING, M.; ZOUBOULIS, C. [Experimental models of human skin aging]. **Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, 2016.

NILES, R. M.; COOK, C. P.; MEADOWS, G. G.; FU, Y.-M.; MCLAUGHLIN, J. L.; RANKIN, G. O. Resveratrol is rapidly metabolized in athymic (nu/nu) mice and does not inhibit human melanoma xenograft tumor growth. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 10, p. 2542-2546, 2006.

NILES, R. M.; MCFARLAND, M.; WEIMER, M. B.; REDKAR, A.; FU, Y.-M.; MEADOWS, G. G. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 190, n. 2, p. 157-163, 2003.

NITHYA, S.; RADHIKA, T.; JEDDY, N. Loricrin-an overview. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 19, n. 1, p. 64, 2015.

NOGUCHI, Y.; WU, J.; DUNCAN, R.; STROHALM, J.; ULBRICH, K.; AKAIKE, T.; MAEDA, H. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. **Cancer Science**, v. 89, n. 3, p. 307-314, 1998.

NOMOTO, K.; YAGI, M.; ARITA, S.; OGURA, M.; YONEI, Y. Skin accumulation of advanced glycation end products and lifestyle behaviors in Japanese. **Anti-Aging Medicine**, v. 9, n. 6, p. 165-173, 2012.

NUTRITION, U. S. D. O. H. A. H. S. F. A. D. A. C. F. F. S. A. A. Guidance for Industry: Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging

Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that are Color Additives 2012.

OLAMI, H.; ZILBERMAN, M. Microstructure and in vitro cellular response to novel soy protein-based porous structures for tissue regeneration applications. **Journal of biomaterials applications**, p. 0885328215614713, 2015.

OLESEN, K. R.; BASSETT, D. R.; WILKERSON, C. L. Surfactant co-thickening in model associative polymers. **Progress in Organic Coatings**, v. 35, n. 1–4, p. 161-170, 1999.

OLIVEIRA, M. B.; PRADO, A. H. D.; BERNEGOSI, J.; SATO, C. S.; LOURENÇO BRUNETTI, I.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.; FRIBERG, S. E.; CHORILLI, M. Topical Application of Retinyl Palmitate-Loaded Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Skin Aging. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

OSMAN, M. A.; ATALLAH, A. Effect of the particle size on the viscoelastic properties of filled polyethylene. **Polymer**, v. 47, n. 7, p. 2357-2368, 2006.

OTT, C.; JACOBS, K.; HAUCKE, E.; SANTOS, A. N.; GRUNE, T.; SIMM, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox biology**, v. 2, p. 411-429, 2014.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.

OWENS III, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.

PAGEON, H. Reaction of glycation and human skin: the effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model. **Pathologie Biologie**, v. 58, n. 3, p. 226-231, 2010.

PAGEON, H.; TÉCHER, M.-P.; ASSELINEAU, D. Reconstructed skin modified by glycation of the dermal equivalent as a model for skin aging and its potential use to evaluate anti-glycation molecules. **Experimental gerontology**, v. 43, n. 6, p. 584-588, 2008.

PAGEON, H.; ZUCCHI, H.; DAI, Z.; SELL, D. R.; STRAUCH, C. M.; MONNIER, V. M.; ASSELINEAU, D. Biological effects induced by specific advanced glycation end products in the reconstructed skin model of aging. **BioResearch open access**, v. 4, n. 1, p. 54-64, 2015a.

PAGEON, H.; ZUCCHI, H.; PENNACCHI, P. C.; ASSELINEAU, D. Glycation and Skin Aging. 2015b.

PARK, M. V.; ANNEMA, W.; SALVATI, A.; LESNIAK, A.; ELSAESSER, A.; BARNES, C.; MCKERR, G.; HOWARD, C. V.; LYNCH, I.; DAWSON, K. A. In vitro developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 240, n. 1, p. 108-116, 2009a.

PARK, M. V.; LANKVELD, D. P.; VAN LOVEREN, H.; DE JONG, W. H. The status of in vitro toxicity studies in the risk assessment of nanomaterials. **Nanomedicine**, v. 4, n. 6, p. 669-685, 2009b.

PARLO, R., AND; COLEMAN, P. Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 16, p. 9997-10003, 1984.

PATHAK, Y.; THASSU, D. **Drug delivery nanoparticles formulation and characterization**. CRC Press, 2009. ISBN 1420078046.

PENDARIES, V.; LE LAMER, M.; CAU, L.; HANSMANN, B.; MALAISSE, J.; KEZIC, S.; SERRE, G.; SIMON, M. In a three-dimensional reconstructed human epidermis filaggrin-2 is essential for proper cornification. **Cell death & disease**, v. 6, n. 2, p. e1656, 2015.

PENNACCHI, P. C.; DE ALMEIDA, M. E. S.; GOMES, O. L. A.; FAIAO-FLORES, F.; DE ARAÚJO CREPALDI, M. C.; DOS SANTOS, M. F.; DE MORAES BARROS, S. B.; MARIA-ENGLER, S. S. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. **Tissue Engineering Part A**, v. 21, n. 17-18, p. 2417-2425, 2015.

PIRAS, S.; FURFARO, A.; DOMENICOTTI, C.; TRAVERSO, N.; MARINARI, U.; PRONZATO, M.; NITTI, M. RAGE expression and ROS generation in neurons: Differentiation versus damage. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

POHLMANN, A. R.; DETONI, C. B.; PAESE, K.; CORADINI, K.; BECK, R. C.; GUTERRES, S. S. Polymeric Nanocapsules for Topical Delivery. In: (Ed.). **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement**: Springer, 2016. p.201-221. ISBN 3662478617.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

POUMAY, Y.; DUPONT, F.; MARCOUX, S.; LECLERCQ-SMEKENS, M.; HERIN, M.; COQUETTE, A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. **Archives of dermatological research**, v. 296, n. 5, p. 203-211, 2004.

PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan®/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 340-347, 2008.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.

PUZIY, A.; PODDUBNAYA, O.; MARTÍNEZ-ALONSO, A.; SUÁREZ-GARCÍA, F.; TASCÓN, J. Synthetic carbons activated with phosphoric acid: I. Surface chemistry and ion binding properties. **Carbon**, v. 40, n. 9, p. 1493-1505, 2002.

QUADIR, M. A.; HAAG, R. Biofunctional nanosystems based on dendritic polymers. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 484-495, 2012.

QUAN, T. **Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases**. CRC Press, 2016. ISBN 1498704646.

RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. **Trends in cell biology**, v. 5, n. 3, p. 85-87, 1995.

RADOWSKI, M. R.; SHUKLA, A.; VON BERLEPSCH, H.; BÖTTCHER, C.; PICKAERT, G.; REHAGE, H.; HAAG, R. Supramolecular aggregates of dendritic multishell architectures as universal nanocarriers. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1265-1269, 2007.

RAJADHYAKSHA, M.; ANDERSON, R. R.; WEBB, R. H. Video-rate confocal scanning laser microscope for imaging human tissues in vivo. **Applied optics**, v. 38, n. 10, p. 2105-2115, 1999.

RAJADHYAKSHA, M.; GROSSMAN, M.; ESTEROWITZ, D.; WEBB, R. H.; ANDERSON, R. R. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 6, p. 946-952, 1995.

RAN, S.; DOWNES, A.; THORPE, P. E. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. **Cancer research**, v. 62, n. 21, p. 6132-6140, 2002.

RANDALL, L. O. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn**, v. 111, p. 409-419, 1957.

REIBETANZ, U.; HALOŽAN, D.; BRUMEN, M.; DONATH, E. Flow cytometry of HEK 293T cells interacting with polyelectrolyte multilayer capsules containing fluorescein-labeled poly (acrylic acid) as a pH sensor. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1927-1933, 2007.

REIHL, O.; BIEMEL, K. M.; LEDERER, M. O.; SCHWACK, W. Pyridinium-carbaldehyde: active Maillard reaction product from the reaction of hexoses with lysine residues. **Carbohydrate research**, v. 339, n. 3, p. 705-714, 2004.

REJMAN, J.; OBERLE, V.; ZUHORN, I. S.; HOEKSTRA, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. **Biochemical Journal**, v. 377, n. 1, p. 159-169, 2004.

REQUENA, J. R.; FU, M. X.; AHMED, M. U.; JENKINS, A. J.; LYONS, T. J.; BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. **Biochemical Journal**, v. 322, n. 1, p. 317-325, 1997.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.

RIGON. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas para administração cutânea de trans-resveratrol. 2013.

RIGON; FACHINETTI, N.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H.; CHORILLI, M. Skin Delivery and in Vitro Biological Evaluation of Trans-Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Skin Disorder Therapies. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 116, 2016.

RISTORCELLI, E.; BERAUD, E.; VERRANDO, P.; VILLARD, C.; LAFITTE, D.; SBARRA, V.; LOMBARDO, D.; VERINE, A. Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells. **The FASEB journal**, v. 22, n. 9, p. 3358-3369, 2008.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROHIT, B.; PAL, K. I. A method to prepare solid lipid nanoparticles with improved entrapment efficiency of hydrophilic drugs. **Current Nanoscience**, v. 9, n. 2, p. 211-220, 2013.

RUDLING, M. J.; COLLINS, V. P.; PETERSON, C. O. Delivery of aclacinomycin A to human glioma cells in vitro by the low-density lipoprotein pathway. **Cancer research**, v. 43, n. 10, p. 4600-4605, 1983.

SAHA, R. N.; VASANTHAKUMAR, S.; BENDE, G.; SNEHALATHA, M. Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. **Molecular Membrane Biology**, v. 27, n. 7, p. 215-231, 2010.

SAKAMOTO, J. H.; VAN DE VEN, A. L.; GODIN, B.; BLANCO, E.; SERDA, R. E.; GRATTONI, A.; ZIEMYS, A.; BOUAMRANI, A.; HU, T.; RANGANATHAN, S. I. Enabling

individualized therapy through nanotechnology. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 57-89, 2010a.

SAKAMOTO, J. H.; VAN DE VEN, A. L.; GODIN, B.; BLANCO, E.; SERDA, R. E.; GRATTONI, A.; ZIEMYS, A.; BOUAMRANI, A.; HU, T.; RANGANATHAN, S. I.; DE ROSA, E.; MARTINEZ, J. O.; SMID, C. A.; BUCHANAN, R. M.; LEE, S.-Y.; SRINIVASAN, S.; LANDRY, M.; MEYN, A.; TASCIOITTI, E.; LIU, X.; DECUZZI, P.; FERRARI, M. Enabling individualized therapy through nanotechnology. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 57-89, 2010b.

SANDILANDS, A.; SUTHERLAND, C.; IRVINE, A. D.; MCLEAN, W. I. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. **J Cell Sci**, v. 122, n. 9, p. 1285-1294, 2009.

SANTELLI, M. M. **Interação da crisotila com células de carcinoma de pulmão humano em cultura: interferência com a mitose utilizando genes repórteres e microscopia em tempo real e estudo do potencial genotóxico**. 2009. Universidade de São Paulo

SANTOS-NOGUEIRA, E.; REDONDO CASTRO, E.; MANCUSO, R.; NAVARRO, X. Randall-Selitto test: a new approach for the detection of neuropathic pain after spinal cord injury. **Journal of neurotrauma**, v. 29, n. 5, p. 898-904, 2012.

SCHÄFER-KORTING, M.; ROMERO, E. L. Core-Shell Nanotransporters for the Skin. In: (Ed.). **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement**: Springer, 2016. p.241-251.

SCHAFER, K. The cell cycle: a review. **Veterinary pathology**, v. 35, n. 6, p. 461-478, 1998.

SCHÄFER, V.; VON BRIESEN, H.; ANDREESEN, R.; STEFFAN, A.-M.; ROYER, C.; TRÖSTER, S.; KREUTER, J.; RÜBSAMEN-WAIGMANN, H. Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting. **Pharmaceutical research**, v. 9, n. 4, p. 541-546, 1992.

SCHERER, D.; KUMAR, R. Genetics of pigmentation in skin cancer—a review. **Mutation research**, v. 705, n. 2, p. 141, 2010.

SCHMADER, K. E.; BARON, R.; HAANPÄÄ, M. L.; MAYER, J.; O'CONNOR, A. B.; RICE, A. S.; STACEY, B. Treatment considerations for elderly and frail patients with neuropathic pain. *Mayo Clinic Proceedings*, 2010. Elsevier. p.S26-S32.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, n. 2, p. 171-179, 1997.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 1, p. 83-96, 1994.

SEETAPAN, N.; BEJRAPHA, P.; SRINUANCHAI, W.; RUKTANONCHAI, U. R. Rheological and morphological characterizations on physical stability of gamma-oryzanol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs). **Micron**, v. 41, n. 1, p. 51-58, 2010.

SELL, D. R.; BIEMEL, K. M.; REIHL, O.; LEDERER, M. O.; STRAUCH, C. M.; MONNIER, V. M. Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix relationship with diabetes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12310-12315, 2005.

SEMBA, R. D.; NICKLETT, E. J.; FERRUCCI, L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 65, n. 9, p. 963-975, 2010.

SEMMLING, M.; KREFT, O.; MUÑOZ JAVIER, A.; SUKHORUKOV, G. B.; KÄS, J.; PARAK, W. J. A Novel Flow-Cytometry-Based Assay for Cellular Uptake Studies of Polyelectrolyte Microcapsules. **Small**, v. 4, n. 10, p. 1763-1768, 2008.

SEVERINO, P.; PINHO, S. C.; SOUTO, E. B.; SANTANA, M. H. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic–lipophilic balance of stearic acid and stearic acid–capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 125-130, 2011.

SHAH, S. M.; ASHTIKAR, M.; JAIN, A. S.; MAKHIJA, D. T.; NIKAM, Y.; GUDE, R. P.; STEINIGER, F.; JAGTAP, A. A.; NAGARSENKER, M. S.; FAHR, A. LeciPlex, invasomes, and liposomes: a skin penetration study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1, p. 391-403, 2015.

SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry**. John Wiley & Sons, 2005. ISBN 0471434035.

SHENG, Y.; LIU, C.; YUAN, Y.; TAO, X.; YANG, F.; SHAN, X.; ZHOU, H.; XU, F. Long-circulating polymeric nanoparticles bearing a combinatorial coating of PEG and water-soluble chitosan. **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2340-2348, 2009.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHUBAR, H. M.; MAYER, J. P.; HOPFENMÜLLER, W.; LIESENFELD, O. A new combined flow-cytometry-based assay reveals excellent activity against *Toxoplasma gondii* and low toxicity of new bisphosphonates in vitro and in vivo. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1110-1119, 2008.

SHUKLA, Y.; SINGH, R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p. 1-8, 2011.

SLIVINSKY, G. G.; HYMER, W. C.; BAUER, J.; MORRISON, D. R. Cellular electrophoretic mobility data: A first approach to a database. **Electrophoresis**, v. 18, n. 7, p. 1109-1119, 1997.

SOARES, S.; FONTE, P.; COSTA, A.; ANDRADE, J.; SEABRA, V.; FERREIRA, D.; REIS, S.; SARMENTO, B. Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 2, p. 370-381, 2013.

SONVICO, F.; MORNET, S.; VASSEUR, S.; DUBERNET, C.; JAILLARD, D.; DEGROUARD, J.; HOEBEKE, J.; DUGUET, E.; COLOMBO, P.; COUVREUR, P. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. **Bioconjugate chemistry**, v. 16, n. 5, p. 1181-1188, 2005.

SOUTO, E.; ALMEIDA, A.; MULLER, R. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin Effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, n. 4, p. 317-331, 2007.

SOUTO, E.; WISSING, S.; BARBOSA, C.; MÜLLER, R. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 71-77, 2004.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C. Nanopartículas de lípidios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Quim. Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762-1769, 2011.

STERN, D.; DU YAN, S.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 12, p. 1615-1625, 2002.

STEVEN, A.; BISHOP, M.; ROOP, D.; STEINERT, P. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin—two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. **Journal of structural biology**, v. 104, n. 1-3, p. 150-162, 1990.

STURM, R. GSTP1 and MC1R in melanoma susceptibility. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 6, p. 1155-1156, 2012.

SUN, J.; SIMON, S. The melting behavior of aluminum nanoparticles. **Thermochimica acta**, v. 463, n. 1, p. 32-40, 2007.

TESKAČ, K.; KRISTL, J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 61-69, 2010.

TREUEL, L.; JIANG, X.; NIENHAUS, G. U. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 10, n. 82, p. 20120939, 2013.

ULRICH, M.; KRUEGER-CORCORAN, D.; ROEWERT-HUBER, J.; STERRY, W.; STOCKFLETH, E.; ASTNER, S. Reflectance confocal microscopy for noninvasive monitoring of therapy and detection of subclinical actinic keratoses. **Dermatology**, v. 220, n. 1, p. 15-24, 2009.

ÜNER, M.; YENER, G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. **International journal of nanomedicine**, v. 2, n. 3, p. 289, 2007.

VAGHASIYA, H.; KUMAR, A.; SAWANT, K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 49, n. 2, p. 311-322, 2013.

VALENTE, V.; SERAFIM, R. B.; DE OLIVEIRA, L. C.; ADORNI, F. S.; TORRIERI, R.; DA CUNHA TIRAPELLI, D. P.; ESPREAFICO, E. M.; OBA-SHINJO, S. M.; MARIE, S. K. N.; PACO-LARSON, M. L. Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) levels is correlated with glioblastoma cells survival. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62200, 2013.

VAN LUYN, M.; VAN WACHEM, P.; DAMINK, L. O.; DIJKSTRA, P.; FEIJEN, J.; NIEUWENHUIS, P. Secondary cytotoxicity of cross-linked dermal sheep collagens during repeated exposure to human fibroblasts. **Biomaterials**, v. 13, n. 14, p. 1017-1024, 1992a.

VAN LUYN, M.; VAN WACHEM, P.; OLDE DAMINK, L.; DIJKSTRA, P.; FEIJEN, J.; NIEUWENHUIS, P. Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens. **Journal of biomedical materials research**, v. 26, n. 8, p. 1091-1110, 1992b.

VAZ, C. M.; DE GRAAF, L. A.; REIS, R. L.; CUNHA, A. M. In vitro degradation behaviour of biodegradable soy plastics: effects of crosslinking with glyoxal and thermal treatment. **Polymer Degradation and Stability**, v. 81, n. 1, p. 65-74, 2003.

VENUGOPAL, J.; PRABHAKARAN, M. P.; LOW, S.; CHOON, A. T.; DEEPIKA, G.; GIRI DEV, V.; RAMAKRISHNA, S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. **Curr Pharm Des.**, v. 15, n. 15, p. 1799-1808, 2009.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

VINA, J.; BORRAS, C.; MIQUEL, J. Theories of ageing. **IUBMB life**, v. 59, n. 4, p. 249, 2007.

VINOGRADOV, S.; WEI, X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. **Nanomedicine**, v. 7, n. 4, p. 597-615, 2012.

VOLKOVOVA, K.; BILANICOVA, D.; BARTONOVA, A.; LETASIOVA, S.; DUSINSKA, M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. **Environ Health**, v. 28, n. 11, p. S1-S12, 2012.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug metabolism and disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

WANG, Y.; SU, D.-M.; WANG, R.-H.; LIU, Y.; WANG, H. Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. **Neuroscience**, v. 132, n. 1, p. 49-56, 2005.

WESTESEN, K.; BUNJES, H.; KOCH, M. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. **Journal of Controlled Release**, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1997.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A. M.; LI, Y.; WU, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 491-504, 2007.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A. M.; XUE, H. Y.; BABAKHANIAN, K.; WU, X. Y. A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 317, n. 3, p. 1372-1381, 2006.

XIA, T.; KOVOCHICH, M.; LIONG, M.; ZINK, J. I.; NEL, A. E. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. **ACS nano**, v. 2, n. 1, p. 85-96, 2007.

XU, Z.; CHEN, L.; GU, W.; GAO, Y.; LIN, L.; ZHANG, Z.; XI, Y.; LI, Y. The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. **Biomaterials**, v. 30, n. 2, p. 226-32, 2009.

YANG, X.-Y.; LI, Y.-X.; LI, M.; ZHANG, L.; FENG, L.-X.; ZHANG, N. Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. **Cancer Letters**, v. 334, n. 2, p. 338-345, 2013.

YANG, Z.; XIONG, H.-R. **Culture conditions and types of growth media for mammalian cells**. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 9535107887.

YANG, Z.; YANG, S.; MISNER, B. J.; CHIU, R.; LIU, F.; MEYSKENS, F. L. Nitric oxide initiates progression of human melanoma via a feedback loop mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease-1/redox factor-1, which is inhibited by resveratrol. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 12, p. 3751-3760, 2008.

YINGCHONCHAROEN, P.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: what is available and what is yet to come. **Pharmacological reviews**, v. 68, n. 3, p. 701-787, 2016.

YOKOTA, M.; TOKUDOME, Y. The Effect of Glycation on Epidermal Lipid Content, Its Metabolism and Change in Barrier Function. **Skin pharmacology and physiology**, v. 29, n. 5, p. 231-242, 2016.

YONEDA, K.; STEINERT, P. M. Overexpression of human loricrin in transgenic mice produces a normal phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 22, p. 10754-10758, 1993.

YOO, J.-W.; CHAMBERS, E.; MITRAGOTRI, S. Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 21, p. 2298-2307, 2010.

ZAMBAUX, M.; BONNEAUX, F.; GREF, R.; MAINCENT, P.; DELLACHERIE, E.; ALONSO, M.; LABRUDE, P.; VIGNERON, C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. **Journal of Controlled Release**, v. 50, n. 1, p. 31-40, 1998.

ZAUNER, W.; FARROW, N. A.; HAINES, A. M. In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. **Journal of Controlled Release**, v. 71, n. 1, p. 39-51, 2001.

ZHANG, L. W.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. **Toxicological Sciences**, v. 110, n. 1, p. 138-155, 2009.

ZHANG, N.; SAID, A.; WISCHKE, C.; KRAL, V.; BRODWOLF, R.; VOLZ, P.; BOREHAM, A.; GERECKE, C.; LI, W.; NEFFE, A. T. Poly [acrylonitrile-co-(N-vinyl pyrrolidone)] nanoparticles—Composition-dependent skin penetration enhancement of a dye probe and biocompatibility. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 116, p. 66-75, 2017.

ZHANG, Z.; MICHNIAK-KOHN, B. B. Tissue engineered human skin equivalents. **Pharmaceutics**, v. 4, n. 1, p. 26-41, 2012.

ZHOU, S.; CUI, Z.; URBAN, J. Dead cell counts during serum cultivation are underestimated by the fluorescent live/dead assay. **Biotechnology journal**, v. 6, n. 5, p. 513-518, 2011.

ZIMMERMANN, E.; MÜLLER, R. H. Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions in artificial gastrointestinal media. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 203-210, 2001.

ZOSCHKE, C.; SCHILRREFF, P.; L ROMERO, E.; M BRANDNER, J.; SCHAFER-KORTING, M. Dendritic nanoparticles for cutaneous drug delivery-testing in human skin and reconstructed human skin. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 20, p. 2784-2800, 2015.

ZUR MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery–drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 149-155, 1998.

Capítulo 2

Caracterização da permeabilidade de nanopartículas em pele humana reconstituída

Roberta Balansin Rigon

Resumo

A morfologia da pele sofre alterações consideráveis ao longo dos anos, mas o efeito da função barreira da pele precisa ser elucidada para o aumento e direcionamento de sistemas de liberação de fármacos tópicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver modelo de pele humano reconstituída (PHR) e avaliar os efeitos da glicação do colágeno na diferenciação de queratinócitos na PHR. Para a glicação, o colágeno foi incubado com 10 mM de D-ribose durante 3 semanas, dializadas com água durante 48 horas. O colágeno glicado foi homogenizado com colágeno não glicado (1:1) e usado para a PHR. Queratinócitos e fibroblastos jovens provenientes de prepúcio juvenil foram usados no compartimento epidérmico e dérmico de todas as PHR. A PHR foram submetidas a imunofluorescência, microscopia confocal e microscopia eletrônica. Foram detectados 30% do colágeno glicado por espectroscopia de fluorescência e uma quantidade significativa de carboximetil lisina foi observada pela imunofluorescência nos modelos glicados. A D-ribose demonstrou ser não citotóxica. A espessura do estrato córneo aumentou 3 vezes nos modelos glicados comparada a PHR juvenil, sendo que o estrato córneo mais denso foi observado no modelo glicado. Houve modificação da expressão de marcadores de diferenciação terminais de queratinócitos, como, por exemplo, a filagrina e loracrina, bem como a expressão de integrinas. Não houve diminuição da espessura dérmica nos modelos glicados comparados com a PHR juvenil e envelhecida. De acordo com os dados *in vivo*, o colágeno na PHR aparentou mais grumoso do que os modelos não-glicados. A microscopia eletrônica confirmou o aumento da espessura do estrato córneo com abundância de células do estrato granuloso às custas do estrato espinhoso da PHR glicada. Além disso, a nítida distinção entre o estrato córneo e granuloso desaparecem. O grânulo de querato-hialina aparecem finamente distribuídos através do queratinócitos dentro das PHR glicadas quando comparadas com as PHR não-glicadas, onde as células revelam-se com maior agregação dos grânulos. A morfologia alterada dos pontos de querato-hialina aponta para diferenças no processo de diferenciação dos queratinócitos. Nenhuma diferença foi observada nos queratinócitos do estrato basal: em ambos os modelos de PHR, glicado e não-glicado são intimamente aderidos ao compartimento dérmico por uma lâmina basal intacta. Diferenças na estrutura do colágeno puderam ser visíveis através da microscopia eletrônica. Nanocarriadores CMS marcados com Bodipy penetraram através das PHR glicadas após 6 horas, porém não houve penetração nas PHR não-glicadas. Em conclusão, os resultados demonstraram uma maior espessura do estrato córneo com biomarcadores alterados na diferenciação da epiderme das peles humanas reconstituídas com o colágeno glicado. Nanocarreadores promoveram aumento da penetração cutânea através da PHR glicada mesmo com uma maior espessura do estrato córneo.

Palavras-chave: pele humana reconstituída; glicação, envelhecimento cutâneo, penetração.

Abstract

Skin morphology markedly changes over the lifespan, but the effects on the skin barrier function remain to be elucidated for nanocarrier-enhanced and –targeted topical drug delivery. The aim of this work was develop reconstructed human skin (RHS) and investigate the effects of collagen glycation on keratinocyte differentiation in RHS. For glycation, collagen was incubated with 10 mM D-ribose for 3 weeks, dialyzed in water for 48 h, and analyzed by fluorescence spectroscopy. Glycated collagen was mixed with non-glycated collagen 1:1 and used for RHS. Juvenile keratinocytes from juvenile foreskin were used for the epidermal compartment of all RHS. Fibroblasts for glycated and non-glycated RHS were from juvenile foreskin. RHS were cultured for two weeks after the exposure to the air-liquid-interface and then subjected to immunofluorescence, reflectance confocal microscopy, and electron microscopy. We detected 30% of collagen glycation by fluorescence spectroscopy and significant amounts of carboxymethyl lysine staining in glycated models. D-ribose demonstrates to be non cytotoxicity. Stratum corneum thickness increased in glycated 3-fold compared to juvenile RHS with the most dense stratum corneum appearance in glycated RHS. Expression of keratinocyte terminal differentiation markers like filaggrin and loricrin as well as integrin expression was enhanced in glycated RHS whilst dermal thickness had no decreased in glycated models compared to juvenile and aged RHS. Reflectance confocal microscopy swiftly analyzes RHS morphology without damaging the constructs. In accordance with *in vivo* data, collagen appeared more lumpy in glycated than in non-glycated RHS. Electron microscopy confirmed a thicker stratum corneum with plenty of cell layers of stratum granulosum at the expense of the stratum spinosum of glycated RHS. Moreover, the sharp distinction between stratum corneum and granulosum vanishes. Keratohyalin granula appear fine-grained and distributed throughout the keratinocytes within glycated RHS compared to non-glycated RHS, where the cells reveal more aggregated granules. The altered morphology of keratohyalin granula points to differences in keratinocyte differentiation. No differences were observed in keratinocytes in the stratum basale: both glycated and non-glycated RHS are closely attached to the dermal compartment by an intact basal lamina. Differences in collagen structure become also visible by electron microscopy. Bodipy loaded onto CMS nanotransporters penetrated well into glycated RHS after 6 h, but not onto non-glycated RHS. In conclusion, the results prove a thicker stratum corneum with hallmarks of altered epidermal differentiation of reconstructed human skin with glycated collagen. Further studies will focus on the molecular cross-talk between glycated collagen and epidermal differentiation. Nanotransporters could increase a penetration into glycation RHS even with large stratum corneum thickness.

Keywords: Reconstructed human skin; glycation; skin aging, penetration.

1. Levantamento Bibliográfico

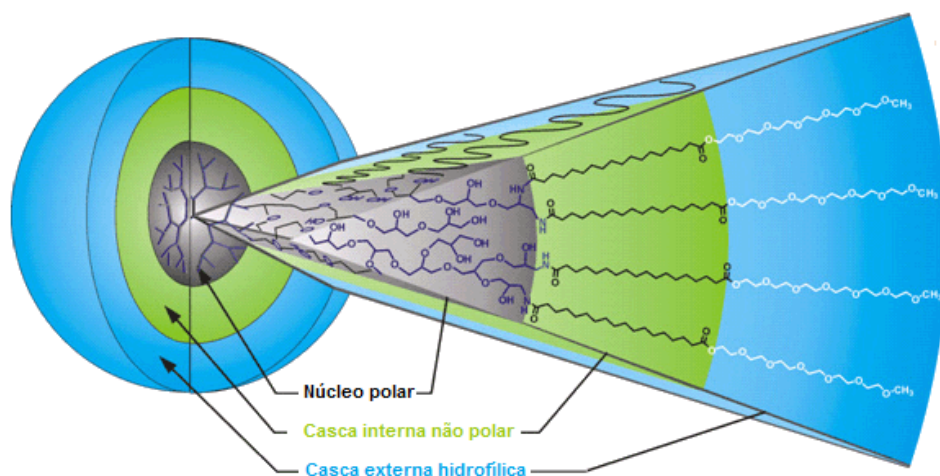
Uma formulação farmacêutica aplicada topicamente para o tratamento de uma doença local deve ser bem tolerada pelos pacientes (BAROLI, 2010). Produtos farmacêuticos têm sido desenvolvidos para prevenir o envelhecimento com o objetivo de retardar, parar, ou revertê-lo (CHORILLI et al., 2011; POHLMANN et al., 2016; RIGON et al., 2016). Novos fármacos e novos sistemas de liberação têm sido desenvolvidos e testados utilizando células e tecidos jovens, muitas vezes não considerando as diferenças relacionadas à idade, de acordo com a revisão desenvolvida por NIKOLAKIS et al. (2016).

Os sistemas de liberação de fármacos apresentam uma estratégia alternativa de carregamento de substâncias ativas através das camadas viáveis da pele. Fármacos encapsulados poderiam resultar em vantagens, tais como: aumento da estabilidade, melhor biodisponibilidade, controle de liberação do fármaco, aumento da penetração do fármaco, distribuição seletiva pelo tecido, redução da dose total requerida e minimizar os efeitos adversos ao tratamento (GRILL et al., 2009; SAHA et al., 2010; VENUGOPAL et al., 2009).

A nanotecnologia baseada em sistema de liberação de fármacos é extensivamente investigada na promoção de agentes farmacêuticos efetivos, mas um baixo sucesso tem sido reportado na permeação pela pele sem a modificação das barreiras cutâneas (PROW et al., 2011). Então, modelos experimentais de envelhecimento da pele humana são necessários para melhorar a pesquisa envolvendo envelhecimento e para que os cientistas possam prever com precisão as vantagens dos sistemas de liberação de fármacos no envelhecimento cutâneo (NIKOLAKIS et al., 2016).

Nanotransportadores com multinúcleos dendríticos (“*dendritic core-multishell*” (CMS), Figura 48) são uma classe de polímeros que promovem uma boa alternativa aos sistemas de liberação de fármacos para fármacos hidrofóbicos. Os nanotransportadores CMS consistem em uma arquitetura altamente ramificada numa forma globular. O núcleo de poliglicerol é revestido por conchas de dupla camada (camada hidrofóbica e hidrofílica), como os lipossomos. A casca externa possui um grande impacto sobre suas propriedades físico-químicas (BOREHAM et al., 2014; CALDERÓN et al., 2010; QUADIR; HAAG, 2012; RADOWSKI et al., 2007).

Figura 48. Nanotransportadores com multinúcleos dendríticos (“dendritic core-multishell” (CMS) (SCHÄFER-KORTING; ROMERO, 2016). A figura foi cortesia da Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting.



As interações multivalentes com grupos funcionais químicos modificáveis podem ser feitas para promover interações com substâncias biológicas (CALDERÓN et al., 2010). Os fármacos podem ser encapsulados nesses sistemas de liberação dendrítica através de complexos supramoleculares entre os andaimes dendríticos ou através de ligações covalentes nos grupos funcionais terminais das unidades da ramificação (QUADIR; HAAG, 2012).

DE BRUM et al. (2015) desenvolveram dois tipos de nanocápsulas utilizando praticamente os mesmos materiais para minimizar o impacto da superfície química ou o formato e a distribuição do diâmetro das partículas nos resultados e verificaram a penetração cutânea *in vitro* utilizando célula de Franz (pele de porco, como membrana). Os resultados demonstraram que nanocápsulas com maior flexibilidade promoveram penetração mais profunda e puderam atingir a derme.

Nanotransportadores CMS demonstraram ser promotores de penetração; porém, são necessárias investigações sobre os mecanismos de ação e os alvos específicos (ZOSCHKE et al., 2015).

A permeabilidade de nanopartículas em condições patológicas não tem sido muito explorada. Entretanto, a absorção cutânea de nanopartículas através da pele não saudável precisa ser considerada especialmente quando o fármaco é utilizado para a terapia de doenças que podem ocasionar mudanças na barreira da pele (ALNASIF et al., 2014).

De acordo com estudos realizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o número de pessoas idosas é constantemente crescente, bem como a expectativa de vida da população do Brasil (MINAYO, 2012). A pele sofre constantemente por deterioração estrutural e funcional com a idade e apresentam inúmeras apresentações clínicas que exercem um significativo impacto para a qualidade de vida dos idosos e são mais do que um mero

problema cosmético e estético (FARAGE et al., 2013). A maioria dos estudos para o desenvolvimento de estratégias para o tratamento e prevenção de envelhecimento cutâneo utiliza pessoas saudáveis e jovens ou testes animais.

A pele humana reconstituída (PHR) consiste no cultivo de células humanas primárias de pele (queratinócitos, fibroblastos e/ ou células tronco) em alta densidade de células sobre filtro de policarbonato inerte em uma interface de exposição ao ar (POUMAY et al., 2004). A engenharia de tecidos pode ser associada ao campo interdisciplinar na mimetização da pele humana normal (ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2012). A PHR tem sido amplamente utilizada para investigar aspectos sobre a biologia cutânea, assim como a segurança, eficácia pré-triagem, alternativa ao teste em animais, predizer o risco da genotoxicidade, teste de irritação cutânea e avaliação da permeação cutânea (FLAMAND et al., 2006; MERTSCHING et al., 2008).

Recentemente, há um interesse considerável no desenvolvimento de alternativas para substituir o uso de animais em pesquisa. A PHR é fisiologicamente comparável a pele humana natural e, por isso, é adequada à substituição ao teste utilizando animais (MERTSCHING et al., 2008). Entretanto, inúmeras modificações na estrutura da pele podem ser observadas na pele afetada pelo processo de envelhecimento. Assim, a construção tridimensional *in vitro* da pele humana envelhecida produz um modelo envelhecido que pode ser utilizado para a aplicação de experimentos de penetração cutânea *in vitro* (PAGEON, 2010; PENNACCHI et al., 2015).

A glicação de proteínas, como o colágeno, impacta sobre a funcionalidade e a estimulação de vias pró-inflamatórias, bem como sobre o aumento de processos oxidativos no tecido (GKOGKLOU; BÖHM, 2012). Uma vez que os produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end products* (AGEs)) acumulam-se com a idade do doador, a glicação é um processo importante não apenas para os pacientes diabéticos, mas também está presente como um biomarcador no envelhecimento intrínseco da pele.

Não há um consenso sobre os efeitos do envelhecimento e a fisiopatologia da pele, e a penetração de substâncias químicas na pele (DANCIK et al., 2015). O envelhecimento é um processo complexo, multifatorial onde fatores genéticos, endógenos e ambientais apresentam um importante papel (VINA et al., 2007). A glicação do colágeno pode representar um dos mais importantes fatores relacionado ao envelhecimento cutâneo, uma vez que a glicação pode estar envolvida no *cross-link* de colágeno, no estresse oxidativo, e na alterações intracelulares (GKOGKLOU; BÖHM, 2012). Então, a glicação pode ser um método *in vitro* que represente melhor as modificações multifatoriais presentes no envelhecimento cutâneo humano.

2. Objetivos

Os objetivos foram avaliar a penetração cutânea de nanotransportadores de alto peso molecular através da pele humana reconstituída (PHR) com glicação de colágeno e o conhecimento das mudanças no desenvolvimento e caracterização de modelos de pele organotípicos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Colágeno G ($\geq 95\%$ colágeno tipo I, $\leq 5\%$ colágeno tipo III, IV e V) (Biochrom, Berlim); Spectra/Por 4 Dialysis Tubing, 12-14 kD MWCO, 32 mm Flat-width, 30 metros/rolo (SpectrumLab), D-Ribose, tubo falcon, seringa, filtro com poro de 0.2 μm , tampão salina fóstato (PBS). Colágeno G, colágeno glicado, placa com 6 poços (Corning, Corning, NY, USA), meio DMEM (10x), pinças, tampão HEPES, inserções, câmara de Neubauer para a contagem das células. Meio CDM, meio para o crescimento de queratinócitos (Keratinocytes Growth Media, KGM medium), células de queratinócitos. Lamínula (Carl Roth, Karlsruhe), Cryo vial (Almeco, Esbjerg N, DK), Cryomold Standard (25x20x5 mm) Specimen Molds Disposable Vinyl (Sakura, Zoeterwonde, NL).

3.2 Métodos

3.2.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos

Foi realizada a avaliação da citotoxicidade *in vitro* da solução de glioxal e D-ribose em cultura de células de queratinócitos (NHK) e fibroblastos (NHDF) provenientes de tecido humano. Queratinócitos primários normais (passagem 3) foram obtidos a partir de circuncisões terapêuticas (aprovação do comitê de ética EA1/081/13); os pais assinaram o consentimento do termo informando sobre os usos científicos do material biológico. As NHK ou NHDF foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 10^4 células por poço com uma solução de glioxal ou d-ribose nas concentrações de 1,25 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio KGM ou DMEM completos sem soro fetal bovino (SFB), respectivamente, durante 24 e 48 horas a 37° C e 5,0% de CO₂; meio com 10 μL de água destilada foi utilizado como controle de veículo, respectiva quantidade de meio sem nutrientes foi utilizado como controle negativo e 0.005% [p/v] de dodecilsulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) foi utilizado como controle positivo (ZHANG et al., 2017). As células foram lavadas com tampão fosfato-salina (PBS) e a viabilidade das células foi mensurada através da avaliação da redução de MTT (GONÇALEZ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014). Três experimentos independentes foram conduzidos utilizando três diferentes doadores de células.

Após a remoção do tratamento e a lavagem das células com PBS, a solução de MTT (0.5 mg mL^{-1} em meio de cultura) foi adicionada a cada poço e as células foram incubadas a 37° C durante 4 horas. Então, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan solubilizados em 50 μL de DMSO. As placas foram homogeneizadas em agitador de placas (300 rpm) por 10 min e a absorbância foi mensurada a 570 nm em um leitor de microplacas (CARMICHAEL et al., 1987; MOSMANN, 1983).

3.2.2 Produção organotípica de modelos de pele humana reconstituída glicada

A metodologia de glicação da matriz de colágeno foi adaptada do protocolo estabelecido por PAGEON et al. (2008) e PENNACCHI et al. (2015). O colágeno G (3 a 5 mg.mL⁻¹) foi incubado na presença de D-ribose em PBS a temperatura ambiente durante 3 semanas e protegidos da luz; para o controle negativo, o colágeno g (3 a 5 mg.mL⁻¹) foi incubado com solução de PBS. Então, foi realizada uma diálise extensiva com água estéril a 4°C, durante 48 horas, sobre constante agitação, e a água estéril foi trocada a cada 12 horas. A diálise promove a remoção dos sais que não foram complexados com o colágeno durante a realização da glicação. Todo o processo foi realizado em ambiente estéril.

Após o processo de diálise, a glicação do colágeno foi monitorada por fluorescência. Para isso, uma alíquota de 1,5 mL de colágeno glicado foi solubilizada com pepsina (1 mg de pepsina em 5,0 mL de ácido acético 0,5 M) a 37° C, *overnight*. Então, a solução foi centrifugada a 10.000 g por 5 min; o sobrenadante contido no colágeno digerido foi mensurado a 440 nm λ .em (370 nm λ .ex.) para avaliar a quantidade de AGE totais e a 378 nm λ .em. (328 nm λ .ex.) para quantificar a pentosidina (PAGEON et al., 2008; PENNACCHI et al., 2015).

3.2.3 Pele reconstruída *in vitro*

O modelo de pele reconstruída foi realizado em 3 estágios. No primeiro estágio, o compartimento dérmico foi preparado. Para isso, o colágeno acelular foi preparado com a mistura de colágeno glicado (GLY+) e colágeno não-glicado (GLY-) na proporção de 1:1, de acordo com a Tabela 17. O colágeno acelular (1mL) foi transferido para cada inserção e foi incubado durante 2 horas até formar um gel.

No próximo estágio foi preparado o colágeno celular. Os fibroblastos cultivados foram tripsinizados e todo o processo descrito anteriormente foi repetido, mas agora os fibroblastos foram adicionados no meio FGM (0,8 x 10⁶ células em cada modelo), de acordo com a Tabela 17. O colágeno celular (3 mL) foi transferido à cada inserção e incubado por 24 horas a 37° C e 5,0% de CO₂. Após 24 horas de incubação, foram adicionados de 9 - 10 mL de meio CGM fora da inserção, a cada poço, e cerca de 2 mL no topo dos modelos. O compartimento dérmico foi incubado durante 7 dias, com trocas de meio a cada dois dias.

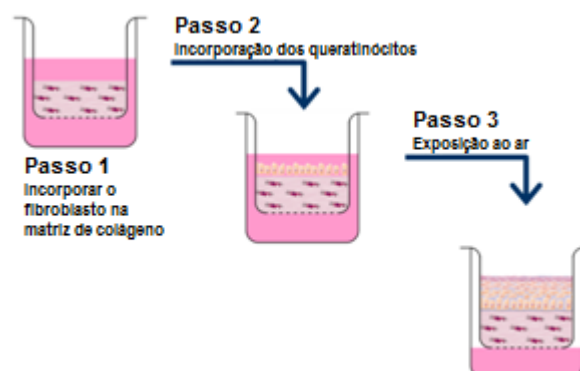
Tabela 17. Composição do compartimento dérmico.

Ingredientes	Proporção (%)	Acelular		Celular	
		Quantidade / 6-poços (μL)		Quantidade / 6-poços (μL)	
		GLY-	GLY+	GLY-	GLY+
Colageno G	40,0	6.400	3.200	18.080	9.040
Colágeno glicado	40,0	---	3.200	---	9.040
DMEM (10x)	5,0	400	400	1.130	1.130
Tampão HEPES	2,5	200	200	565	565
Solução de NaOH (0,7 mol.L ⁻¹)	2,5	200	200	565	565
Meio FGM	10,0	800	800	2.260	2.260
Fibroblasto (x10 ⁶)	0,8	0	0	4,8	4,8
Σ	100,0	8.000	8.000	22.600	22.600

O último estágio foi o preparo do compartimento epidérmico. Então, os queratinócitos cultivados foram tripsinizados e contados. Os queratinócitos foram ressuspensos em meio KGM (3×10^6 para cada modelo) e gentilmente pipetados sobre o compartimento dérmico (100 μL por modelo).

O meio CGM foi aspirado sobre a inserção e fora das mesmas. Todo o líquido foi removido sobre a superfície dos modelos sem danificar o compartimento dérmico. O meio CDM foi utilizado para preencher as inserções (9-10 mL por poço), mas não sobre os modelos. O nível do meio não pode exceder o nível da superfície das construções. Os modelos foram incubados durante 14 dias a 37° C e 5,0% de CO₂. Todo o processo está representado na Figura 48.

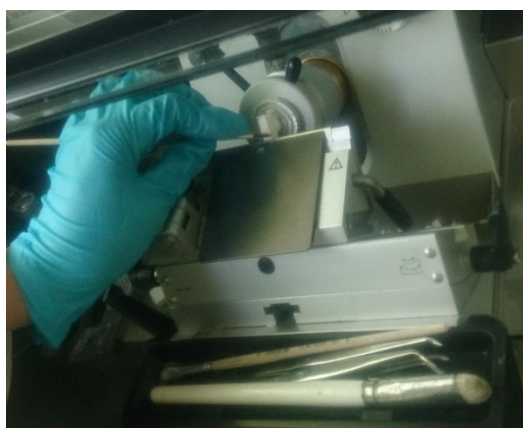
Figura 49. Preparo da pele humana reconstruída (PHR). A figura foi cortesia da Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting.



3.2.4 Crioseções

Para a análise histológica e imunofluorescência, os modelos foram congelados. Primeiramente, foi necessária mudança do meio de cultura um dia antes do congelamento. A pele reconstituída foi removida da inserção e colocada em uma placa de 6 poços. Após, a pele reconstituída foi inserida em um criomolde com meio para congelamento e colocadas em contato com nitrogênio líquido até que o líquido se tornasse um bloco sólido. Os criomoldes foram armazenados a -80°C durante 24 horas. Então, realizaram-se cortes histológicos (5-10 μm) utilizando criótomo (Leica CM 1510S), conforme demonstrado na Figura 49.

Figura 50. Corte histológico dos modelos de pele humana reconstituída para imunofluorescência e análise histológica.



3.2.5 Avaliação da espessura do estrato córneo, epiderme viável, e compartimento dérmico; e contagem de fibroblastos

A avaliação da espessura da pele foi mensurada utilizando 5 ou mais imagens de cada condição experimental e, para cada imagem foi realizado uma análise independente da área do estrato córneo, epiderme viável, e compartimento dérmico. O *software* ImageJ foi utilizado para editar as imagens, e os valores médios de cada condição foram usados para realizar a análise estatística.

3.2.5.1 Coloração com hematoxilina e eosina e avaliação da imunofluorescência

Os cortes histológicos dos modelos de pele reconstituída foram fixados com 4% de solução tampão de fosfato de formaldeído (Roti-Histofix 4%, ph 7.0, Carl Roth, Karlsruhe, Germany), durante 10 minutos. Então, os cortes foram coloridos com hematoxilina e eosina. Roti[®]_Histokit foi utilizado para proteger contra o branqueamento.

Para realizar a avaliação da imunofluorescência (IFA), os modelos de pele reconstituída foram fixados com 4% de solução tampão de fosfato de formaldeído (Roti-Histofix 4%, ph 7.0, Carl Roth, Karlsruhe, Germany), durante 10 minutos, seguidas pela lavagem com solução

de PBS por 5 minutos, solução de Triton X100 a 0,5%, durante 10 minutos para permeabilizar a membrana das células; e solução de 0,1% de Triton X100, durante 5 minutos. Foi utilizada a solução de soro de cabra em PBS (5,0%) para bloquear interações proteína-proteína não específica. O ensaio de imunomarcacão foi realizado empregando anticorpo policlonal de coelho anti-filagrina (anticorpo anti-filagrina, ab81468, Abcam, Cambridge, UK; 1/1000), anti-loracrina (anticorpo policlonal LOR, PA5-34945, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) e CML (anticorpo de coelho policlonal anti- carboximetil lisina, ab27684; Abcam, Cambridge, UK) para confirmar a presença de produtos de glicacão no compartimento dérmico, além de anticorpos de ratos monoclonais anti-integrina humana beta-1 (anticorpo anti-integrina beta 1 [4B7R], ab3167] (Cambridge, UK; 1/100))

Para promover a fluorescência, foi utilizado um kit comercial contendo um segundo anticorpo anti-rato e anti-coelho ligado a um fluoróforo, de acordo com a metodologia descrita no manual do fabricante. Os anticorpos utilizados foram anti-rato IgG (Alexa Fluor® 594 Conjugate) e anti-coelho IgG (Alexa Fluor® 488 Conjugate); Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, USA, respectivamente.

Todas as imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência e o *software* ImageJ foi utilizado para editar as imagens.

3.2.6 Avaliação por microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por KHIAO IN et al. (2015). Sucintamente, três modelos de cada condição (PHR não-glicada e glicada) foram fixados com solução de Karnovsky durante 4 horas, lavados com tampão gelado de cacodilato 0,1M (*cacodylic acid sodium salt trihydrate*, Roth, Karlsruhe, Germany), incubados em tetróxido de ósmio 1% (Chempur, Karlsruhe, Germany) por 120 minutos, desidratados com concentrações seriadas de etanol e lavados com óxido de propileno (1,2 Epoxypropan; VWR, Germany).

Análises semi-quantitativas da morfologia ultraestrutural foram feitas por microscopia eletrônica (Zeiss EM 903, Oberkochen, Germany). Foram capturadas fotos, as quais foram editadas no Adobe Photoshop Program (Adobe System, Unterschleissheim, Germany).

3.2.7 Elisa para a detecção de CML na pele reconstituída

Três modelos de cada pele (PHR não-glicada e glicada) foram utilizados para quantificar a quantidade de CML nas diferentes camadas da pele, epiderme e derme. Para isso, foram separadas a epiderme e a derme. A epiderme foi coletada em um tubo Eppendorf com 300 µL de PBS e uma bola de metal foi inserida no tubo, e a derme foi coletada em um tubo Eppendorf com 700 µL de PBS e uma bola de metal. As amostras foram lisadas utilizando *Tissuelyser*, durante 5 minutos e 25 Hz. Então, as amostras foram centrifugadas durante 30

segundos e 13000 rpm. Após, as amostras foram estocadas a -80°C durante 5 minutos e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi coletado e congelado a -80°C até que a Elisa pudesse ser realizada.

O CML foi quantificado utilizando o kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante: OxiSelect™ Nε-(carboxymethyl)lysine (CML) Competitive ELISA kit (MANUAL). Em todos 50 µL de cada amostra ou CML-BSA padrão foram adicionados nos poços da placa revestida com CML conjugado. As placas foram incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos em um agitador orbital. Foram adicionadas 50 µL de solução de anticorpo anti-CML a cada poço; a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora em agitador orbital. Os poços foram lavados 3 vezes com 250 µL com 1X tampão de lavagem e após, 100 µL de solução contendo o segundo anticorpo com HRP conjugado foi adicionado a cada poço e incubados por 1 hora a temperatura ambiente em agitador orbital. Os poços foram lavados novamente e a solução substrato foi utilizada a temperatura ambiente e incubadas durante 20 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL de solução de parada para cada poço. Os resultados foram lidos imediatamente no leitor de microplacas utilizando 450 nm.

3.2.8 Microscopia confocal reflectante (*Reflectance Confocal Microscopy* - RCM)

Um dispositivo RCM comercialmente disponível (Vivascope 1500, MAVIG GmbH, Munich, Lucid-Tech Inc., Henrietta, N.Y., USA) foi utilizado para a imagem de todos os modelos. Uma descrição detalhada da técnica e do dispositivo foi publicada anteriormente (RAJADHYAKSHA et al., 1999; RAJADHYAKSHA et al., 1995; ULRICH et al., 2009). Resumidamente, cada modelo foi sistematicamente avaliada por RCM: um mapeamento horizontal X-Y (dimensões do mapa: 4 mm x 4 mm) foi realizado para cada camada epidérmica começando pelo estrato córneo através de toda epiderme e até a derme reticular. Semelhantemente, 4-6 imagens individuais de RCM foram capturadas em cada camada da epiderme, em cada camada da epiderme, seguidas do protocolo de avaliação padrão e individualmente submetidas à análise descritiva durante o processo de avaliação.

3.2.9 Penetração de nanotransportadores CMS

A penetração de nanotransportadores CMS com ICC Bodipy encapsulados ou emulsão com Bodipy encapsulados, respectivamente, foi investigada de acordo com protocolo *in vitro* previamente publicado (ALNASIF et al., 2014). O desenvolvimento dos nanotransportadores CMS-ICC foi realizado por um grupo de pesquisa parceiro da Profa. Dra. Monika Schäfer-Korting e a sua composição não foi divulgada, a emulsão foi composta por 4% de monoestearato de glicerol 60; 6% de álcool estearílico; 7,5% por triglicerídeos de cadeia média (óleo neutro, Miglyol 812); 25,5% de vaselina branca; 7% de macrogol-1000-monoestearato

de glicerol; 10% de propilenoglicol, e 40% de água purificada. 30 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ das formulações testes foram aplicadas na superfície dos modelos de pele e incubadas durante 6 horas a 37° C, 5% de CO₂. Após as amostras foram lavadas para remover o excesso de fluoróforo e congeladas para realizar os cortes histológicos. As imagens fluorescentes (BZ-8000; Keyence, Neu-Isenburg, Germany) e as análises (BZ Analyzer[®], Keyence, Neu-Isenburg, Germany) foram realizadas de acordo com os procedimentos previamente publicados (BORGIA et al., 2008).

4. Resultados e Discussão

4.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos

Os modelos de glicação do colágeno podem ser produzidos através de modificações pós-traducionais de proteínas presentes na pele, tais como o colágeno, elastina, queratina e proteoglicanas, a partir da reação entre a função aldeído de açúcares reduzidos, como a glicose, ribose e frutose e a função amina livre de um aminoácido (lisina e arginina) da proteína, as quais foram a base Schiff e subsequentemente os produtos Amadori (HORI et al., 2012; PAGEON, 2010). Outra forma de obter glicação nos modelos de pele é a adição de produtos AGE intermediários, tais como o glioxal (GO), o qual pode induzir a expressão de carboximetil lisina (CML) (CADAU et al., 2016).

HORI et al. (2012) determinaram a formação de AGE através de fluorescência após a incubação de colágeno bovino tipo I com glicose e ribose. Após a incubação de 6 horas, os pesquisadores observaram que o colágeno é mais rapidamente glicado pela ribose do que pela glicose; a fluorescência relativa foi quatro vezes maior quando a ribose foi utilizada. Então, a ribose foi escolhida como açúcar redutor.

O glioxal é um eficiente *cross-linker* químico que é comumente utilizado como promotor eficiente para o *cross-linking* entre proteínas, especialmente para as aplicações biomédicas, desde que a proteína humana apresente alta taxa de recuperação enzimática, e o método de *cross-linking* possa assegurar a integridade e as propriedades mecânicas da proteína (DAMINK et al., 1995; DAMINK et al., 1996; VAZ et al., 2003). Entretanto, a despolimerização e a liberação química do *cross-linker* podem ser responsáveis por promover a citotoxicidade de fibroblastos no colágeno glicado (VAN LUYN et al., 1992a; VAN LUYN et al., 1992b).

OLAMI; ZILBERMAN (2015) demonstraram que o glioxal como um promotor de *cross-linker* apresenta um efeito citotóxico severo em células de fibroblastos, com uma sobrevivência celular de 10%.

YOKOTA; TOKUDOME (2016) avaliaram os efeitos da glicação em queratinócitos de pele humana imortalizada (HaCat) e demonstraram que o glioxal reduz a viabilidade celular de maneira concentração dependente.

Desde que as substâncias usadas para produzir a glicação do colágeno podem causar alguma toxicidade para os fibroblastos, avaliou-se a citotoxicidade *in vitro* da D-ribose e do glioxal em fibroblastos e queratinócitos. Os resultados referentes à viabilidade celular estão demonstrados nas Figuras 51 e 52.

Figura 51. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*. Porcentagem da viabilidade celular de fibroblastos após 24 horas (a) e 48 horas (b) de tratamento com D-ribose e glicoxal a 1,25 a 10,0 mM.

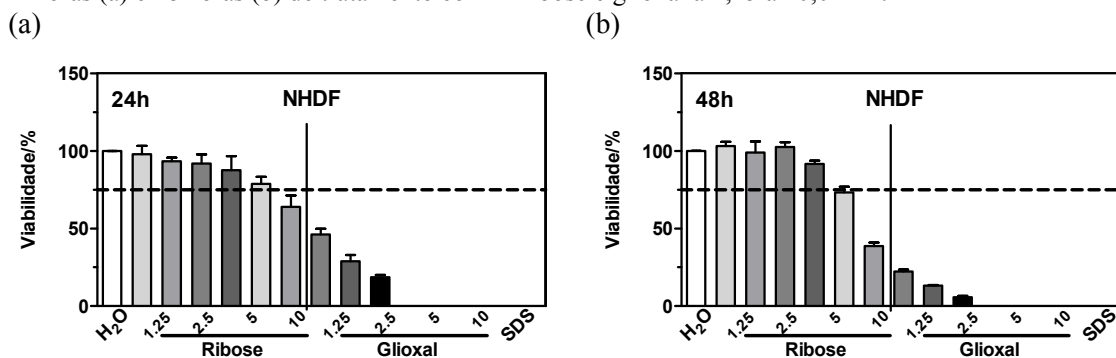
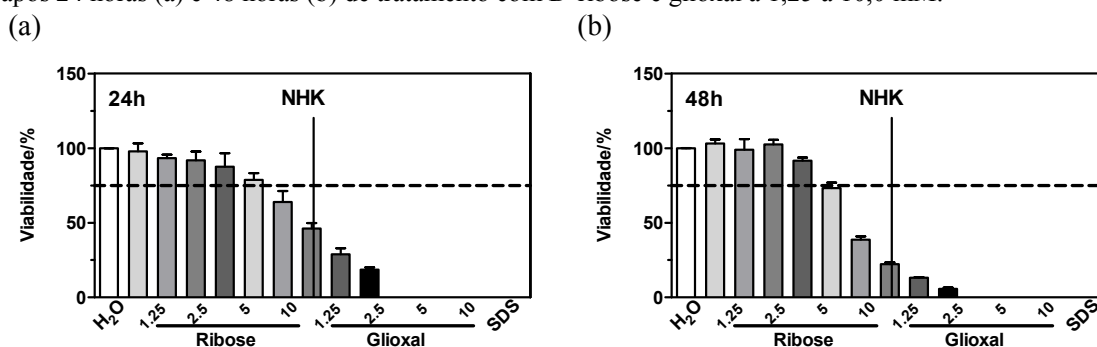


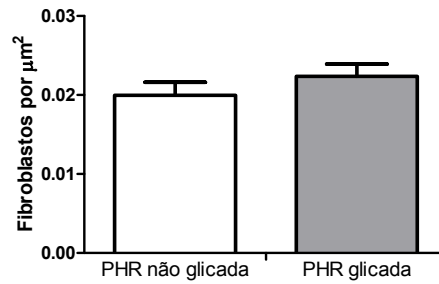
Figura 52. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*. Porcentagem da viabilidade celular de queratinócitos após 24 horas (a) e 48 horas (b) de tratamento com D-ribose e glicoxal a 1,25 a 10,0 mM.



A Figura 51 e 52 demonstraram que a D-ribose não é citotóxica para fibroblastos e queratinócitos após 24 e 48 horas nas concentrações menores que 5 mM. Entretanto, o glicoxal exibiu citotoxicidade tempo- e concentração-dependente em fibroblastos e queratinócitos; o glicoxal não foi citotóxico apenas na concentração de 1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Entretanto, após a contagem do número de fibroblastos presente no compartimento dérmico em ambos os modelos, PHR não-glicado e glicado, através do programa de ImageJ, não observadas diferenças significativas no número de fibroblastos (Figura 53). Então, é possível concluir que a matriz de colágeno glicado com D-ribose não é citotóxica para as células de fibroblastos.

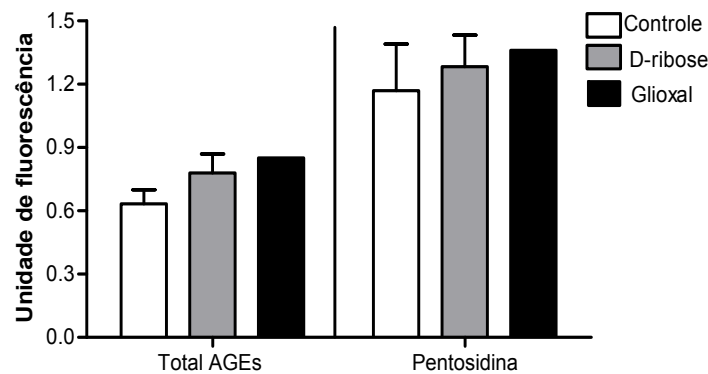
Figura 53. Contagem do número de fibroblastos no compartimento dérmico (n=3).



4.2 Produção de pele humana reconstituída com colágeno glicado

O colágeno G foi incubado com 10 mM de D-ribose ou glicoxal durante 3 semanas e o processo de glicação foi analisado por ensaio de fluorescência. O aumento da fluorescência após a incubação com D-ribose ou glicoxal poderiam demonstrar a presença de produtos AGE. A Figura 54 descreve o aumento da unidade de fluorescência para produtos AGE e pentosidina.

Figura 54. Produtos total AGEs produzidas através do processo de glicação. Unidade de fluorescência do colágeno controle e glicado (exposto à D-ribose ou ao glicoxal).



A Figura 54 demonstra o aumento da unidade de fluorescência para os produtos AGEs totais, os quais demonstram que o colágeno foi modificado após a incubação com D-ribose e glicoxal. Não houve diferença entre os grupos para a quantidade de pentosidina produzida. Uma análise individual demonstrou um aumento da unidade de fluorescência maior do que 30% para o colágeno exposto à D-ribose e ao glicoxal, o que é um indicativo para visualizar o processo de glicação. A Figura 54 também demonstra que a D-ribose e o glicoxal produzem a mesma quantidade de unidades fluorescentes. Então, o uso da D-ribose como promotor do processo de glicação é preferido, uma vez que a D-ribose não é citotóxica para as células (Figura 51 e 52).

4.3 Caracterização das PHR.

A coloração hematoxilina e eosina revelou completamente a epiderme estratificada e multilamelar após duas semanas de cultura das células humanas de queratinócitos sobre o

compartimento dérmico (Figura 55). É possível observar que o estrato córneo da PHR glicada é três vezes mais largo do que as PHR não-glicadas (Figura 56). Entretanto, não foram observadas diferenças na espessura da epiderme viável e do compartimento dérmico entre PHR não-glicada e glicada.

Figura 55. Coloração hematozilina e eosina (H&E) para os modelos de PHR não-glicada e glicada.

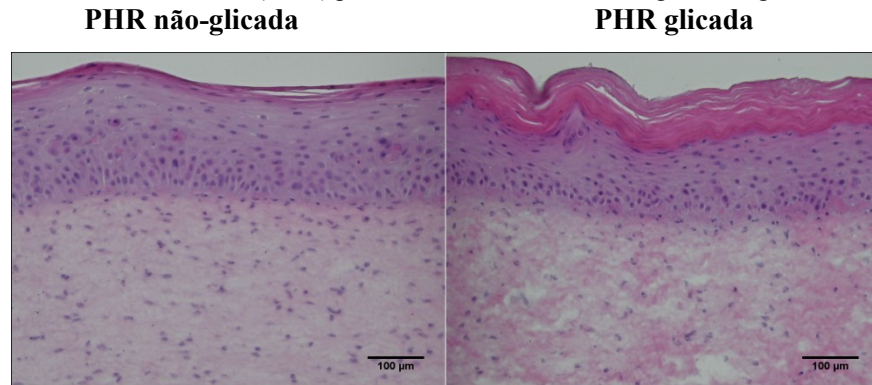
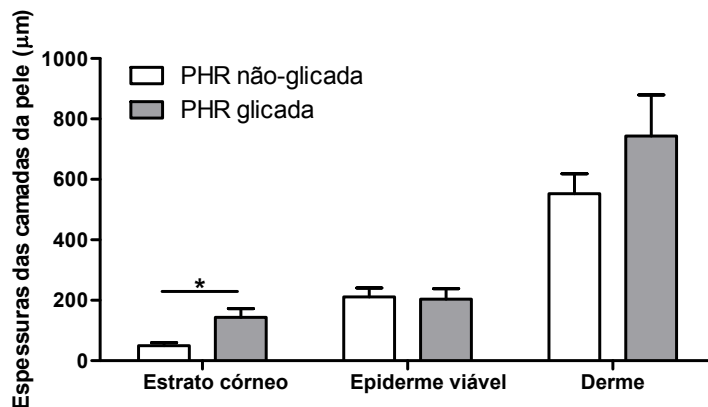


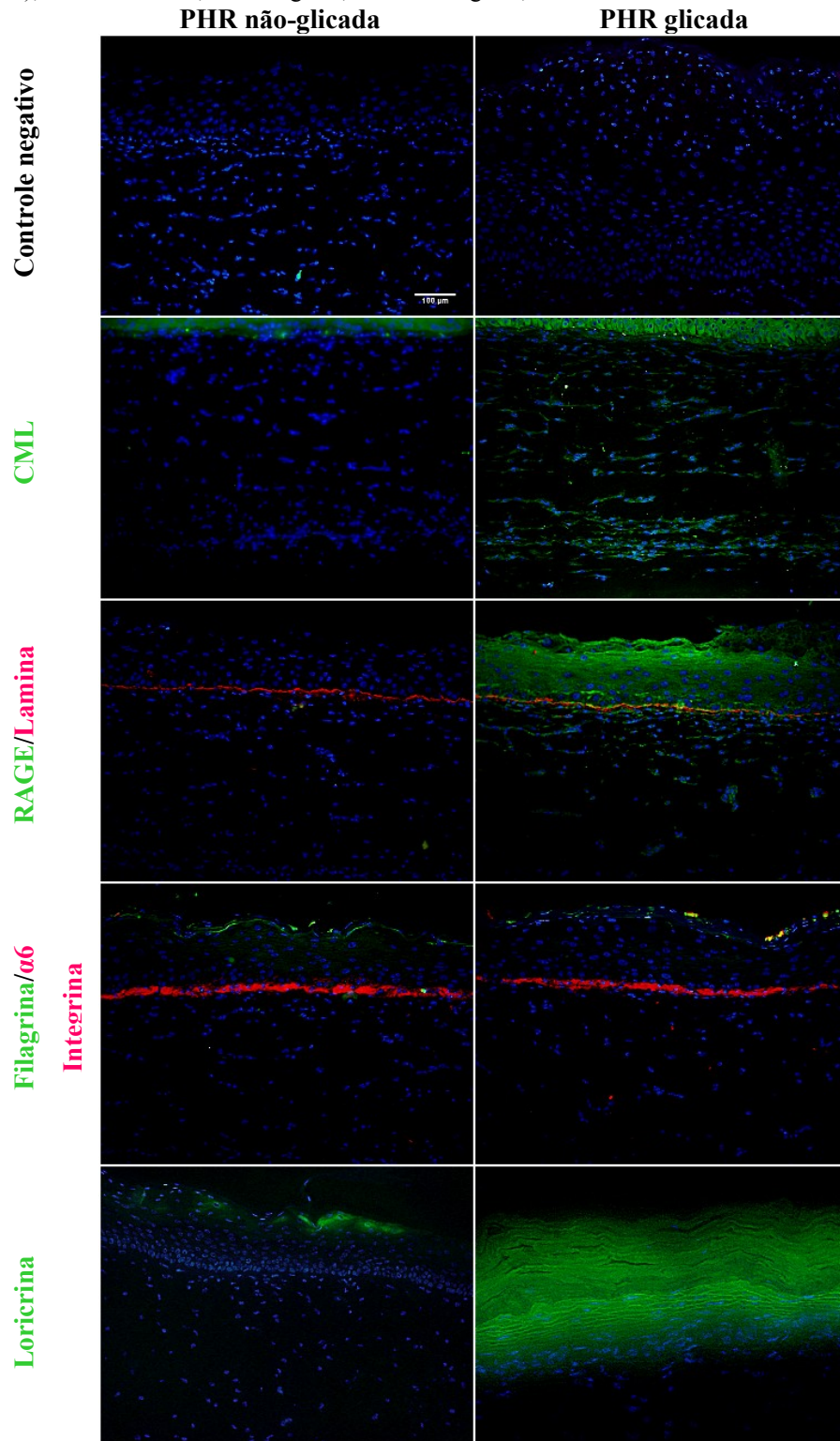
Figura 56. Espessura das camadas da pele dos modelos PHR não-glicado e glicado (n=3).



4.4 Ensaio de Imunofluorescência

Os resultados das alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares observadas após a coloração de imunofluorescência nas peles reconstituídas após a exposição ou não da matriz de colágeno são apresentados na Figura 57.

Figura 57. Coloração de imunofluorescência do modelo de pele reconstituída (n=4) preparadas com colágeno modificado por D-ribose (colágeno glicado) comparados com o controle (Colágeno não-glicado). Anticorpo anti-CML (Carboximetil lisina), anti-AGE (receptor para os produtos finais de glicação avançado); anti-laminina 5; anti-filagrina; anti- $\alpha 6$ integrina, e anti-loricrina.



Assim como observados na coloração H&E (Figura 55), ambos, epiderme e derme, foram modificadas pelo processo de glicação; o mesmo pode ser observado na

imunofluorescência (Figura 57); sendo possível verificar a alteração de alguns marcadores de diferenciação de queratinócitos.

O CML é um produto AGE, que pode ser produzido por dois diferentes mecanismos no processo de glicação, peroxidação lipídica e vias oxidativas (PAGEON et al., 2015b). A Figura 66 demonstrou o aumento de CML no comportamento dérmico nos modelos glicosados, provando a glicação nos modelos de PHR (PAGEON et al., 2015a). A interação dos AGE com o receptor de AGE (RAGE) na superfície das células altera a função celular (PAGEON et al., 2015b). Desta maneira, foi investigado também o aumento da expressão de RAGE nos modelos e observou-se que os modelos glicosados apresentaram aumento da expressão de RAGE, em especial os queratinócitos, estabelecendo o *cross-talk* entre os queratinócitos e a matriz dérmica. A glicação também promoveu uma interface na diferenciação dos queratinócitos (CADAU et al., 2015), como pode ser observado na Figura 57, a qual demonstra a diferença entre os modelos na expressão de filagrina e loracrina.

Recentemente, o papel de RAGE no processo fisiológico, como na diferenciação neuronal, tem sido demonstrado (KIM et al., 2012a). Na pele, RAGE tem sido envolvido no desenvolvimento de várias desordens inflamatórias (CHUAH et al., 2013) e o domínio intracelular de RAGE demonstrou induzir a apoptose das células (GALICHET et al., 2008). A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é induzida pelo estímulo de RAGE por meio da ativação de oxidase NADPH. Nas células neuronais, a geração de ROS induzida por RAGE pode estimular a diferenciação ou induzir a morte celular através do desequilíbrio do estado redox (PIRAS et al., 2016).

Cálcio é um regulador essencial do processamento de RAGE, sendo distribuído na epiderme em gradiente e apresentando maior concentração no estrato granuloso (BIKLE et al., 2012). O estrato granuloso recebe este nome devido à presença de grânulos de querato-hialina (STEVEN et al., 1990). A filagrina é localizada nos grânulos de querato-hialina no estrato granuloso; há dois tipos de grânulos, os maiores grânulos contêm pró-filagrina, precursor da filagrina, e os menores contêm loracrina, a qual pode ser o maior componente do envelope cornificado (BIKLE et al., 2012; DALE et al., 1985; MEHREL et al., 1990; PENDARIES et al., 2015). O fato de o cálcio estar mais concentrado no estrato granuloso e os resultados demonstrarem aumento da expressão de RAGE na epiderme, e RAGE ser modulado por cálcio, poderia explicar as diferenças entre os modelos glicosados e não-glicosados na filagrina e loracrina.

A filagrina apresentou-se reduzida nos modelos de pele glicosada quando comparadas com os modelos não-glicosados. A filagrina quando está ligada com a queratina contribui para formar uma matriz insolúvel, a qual atua como um andaime proteico que liga as proteínas do envelope corneificadas e os lipídeos que juntos formam o estrato córneo (SANDILANDS et al., 2009), e é importante para manter a hidratação na epiderme (BIKLE et al., 2012). A

filagrina é menos expressa no envelhecimento, dermatite atópica, psoríase, e ictiose vulgar; mas, há maior expressão na hiperqueratose (BREITENBACH et al., 2015).

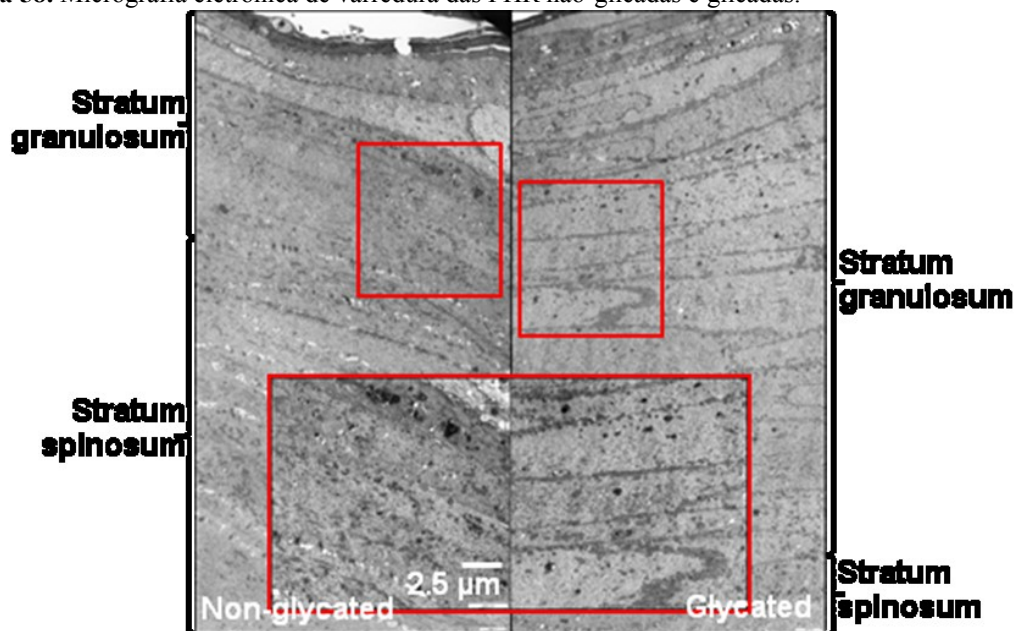
A loracrina apresenta aumento da sua expressão nos modelos glicados (Figura 56). Mais do que 70% do envelope cornificado é composto por loracrina, uma proteína estrutural diferenciada termicamente interage com queratina e promove a flexibilidade do envelope cornificado (NITHYA et al., 2015; YONEDA; STEINERT, 1993). Loracrina é também reduzida no envelhecimento cutâneo (QUAN, 2016).

Algumas desordens cutâneas, tais como a hiperqueratose, podem apresentar um aumento da expressão de loracrina, mas não na queratodermia ictiose vulgar. Outro resultado interessante foi que a loracrina não foi detectada nas desordens acompanhadas de paraqueratose, tais como a psoríase e prurigo nodular, entretanto, o tecido expressou filagrina (JUHLIN et al., 1992).

4.5 Ensaio de microscopia eletrônica

As mudanças nos grânulos de querato-hialina foram observadas pelos ensaios de microscopia eletrônica, de acordo com a Figura 58.

Figura 58. Micrografia eletrônica de varredura das PHR não-glicadas e glicadas.



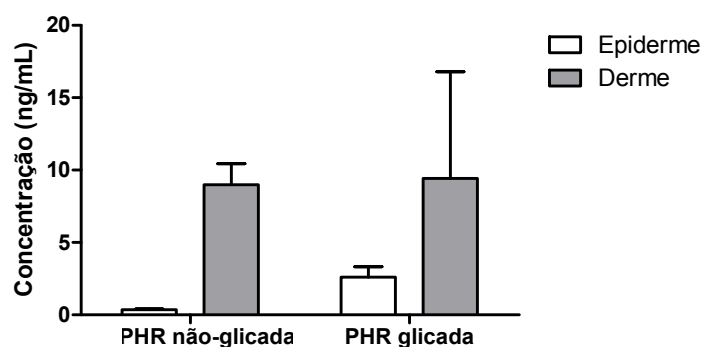
A microscopia eletrônica confirmou o aumento da espessura do estrato córneo com abundância de camadas de células de estrato granuloso à custa do estrato espinhoso no modelo de PHR glicada. Entretanto, a nítida distinção entre estrato córneo e granuloso desaparece. Os grânulos de querato-hialina demonstraram-se mais finos e distribuídos por todos os queratinócitos na PHR glicada quando comparado com a PHR não-glicada, onde as células

parecem estar com grânulos mais agregados. A morfologia alterada dos grânulos de queratohialina aponta para diferenças na diferenciação dos queratinócitos (STEVEN et al., 1990). Não foram observadas diferenças nos queratinócitos no estrato basal: ambos PHR não-glicada ou glicada são fortemente conectados ao compartimento dérmico através da lâmina basal.

4.6 Elisa para a detecção de CML na pele

De acordo com os resultados obtidos por imunofluorescência e microscopia eletrônica, pode-se observar que a incubação do colágeno com D-ribose mostrou mudanças significativas na epiderme. Então, também se avaliou a formação de CML nas diferentes camadas da pele. Para isso, a epiderme e a derme foram separadas e analisou-se a quantidade de CML, o qual é o principal produto AGE observado na pele humana, nos modelos construídos. De acordo com os resultados obtidos (Figura 59), a incubação do colágeno com D-ribose promoveu mudanças significativas na epiderme comparada com o controle. No compartimento dérmico, não foram observadas diferenças entre PHR não-glicada e glicada.

Figura 59. Formação CML na epiderme e derme nos modelos de PHR não-glicada e glicada após incubação com D-ribose.



Tem sido descrito o acúmulo de produtos AGEs na pele parcialmente através da ligação com o colágeno; AGEs na sinalização celular pode causar modificações celular (NOMOTO et al., 2012; OTT et al., 2014). Desde que a glicação do colágeno pode também causar a perda da elasticidade e a formação de rugas, AGEs na pele podem ser um indicativo de envelhecimento cutâneo (FAZIO et al., 1989; NOMOTO et al., 2012). Os principais AGEs são hidroimidazolona, N^ε-carboximetil-lisina (CML), pentosidina e glucosepano (SEMBA et al., 2010). O glucosepano é o mais importante AGE *cross-linker* no tecido humano.

Foi descrito que diferentes tipos de *cross-linkers* de colágeno que possibilitam a divisão dos *cross-linkers* formados durante o desenvolvimento e a maturação do colágeno e os que são originados durante o processo estocástico. O primeiro inclui os *cross-linkers* dependentes de

lisil oxidase (LOX) e o segundo, as reações de Maillard, oxidação e da peroxidação lipídica (MONNIER et al., 2005; REQUENA et al., 1997).

A demonstração de que os *cross-linkers* dependentes de LOX contribuem no envelhecimento e na ECM tem sido difícil, uma vez que estas ligações cruzadas desempenham um papel incontestável na estabilização de colágeno sintetizado recentemente; e é possível obter invariavelmente a proteína de reticulação por incubação em longo prazo de proteínas com carbonilos reativos (MONNIER et al., 2005).

Foi demonstrado que em oito décadas de vida os níveis de aditivos da reação de Maillard selecionados e o *cross-link* no colágeno humano normal é de 300 a 800 pmol/mg de proteína de CML; 400 a 1100 pmol/mg de proteína de Fructosil-lisina; 400 a 2000 pmol/mg de proteína de Glucosepano; e 2000 a 6000 pmol/mg de proteína de Ornitina (MONNIER et al., 2005; REIHL et al., 2004; SELL et al., 2005).

Em um estudo publicado por SELL et al. (2005) foi observado que o glucosepano é o mais importante *cross-linker* de colágeno senescente em pele humana. Foi descrito que até 120 mol% de modificação do colágeno helicoidal de cadeia tripla poderia ser responsável por contribuir na perda da digestibilidade do colágeno no envelhecimento; e a digestão do colágeno por enzimas pode aumentar os níveis de glucosepano.

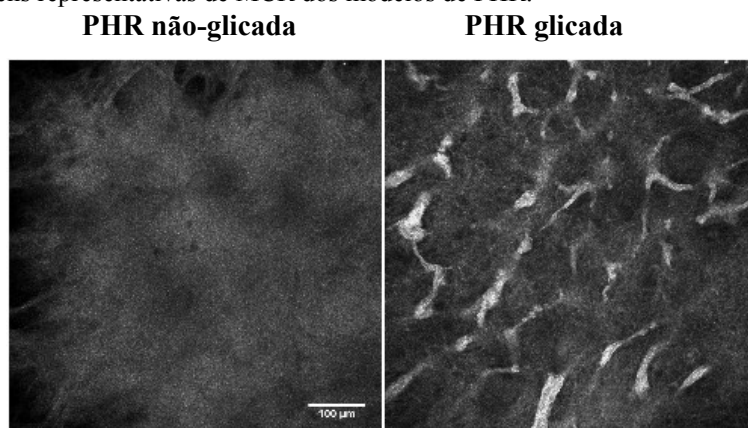
GLOMB; MONNIER (1995) demonstraram uma relação entre os compostos carbonilo, tais como o glioxal e o glicolaldeído, e a formação de CML durante a reação de Maillard. Eles observaram que a formação de CML a partir da glicose/lisina ou produtos de Amadori foi fortemente dependente da oxidação. Os resultados obtidos demonstraram um mecanismo importante da formação de CML, com papel significativo da autooxidação da glicose na formação de CML; mais do que isso, os pesquisadores também observaram que a autooxidação não é um fator de formação de CML mediada por glioxal. Então, 50% da formação de CML são originados pela oxidação dos produtos de Amadori e 50% a partir do estágio pré-Amadori largamente independente a partir da autooxidação de glicose. O CML também pode ser formado a partir da peroxidação de lipoproteínas (HAMMES et al., 1999).

O receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE) é um receptor multiligante e que é superexpresso por esses ligantes. Não há estudos que demonstrem qual produto AGE é responsável por promover maior resposta RAGE. O acúmulo de ligantes dita a biologia do receptor (STERN et al., 2002). De acordo com os resultados obtidos, o CML foi acumulado na epiderme através de diferentes métodos, imunofluorescência (dados não demonstrados) e ELISA (Figura 12); e o CML na epiderme aumentou a expressão de RAGE (Figura 10). Mas, mais que CML tenha sido descrito um *cross-linker* no envelhecimento e possa ser responsável por promover o aumento da expressão de RAGE; não foram observadas diferenças entre CML no compartimento dérmico (Figura 59).

4.7 Microscopia confocal de refletância (MCR)

A Figura 60 demonstra imagens representativas de microscopia confocal refletância (MCR) dos modelos de PHR não-glicosados e glicosados.

Figura 60. Imagens representativas de MCR dos modelos de PHR.

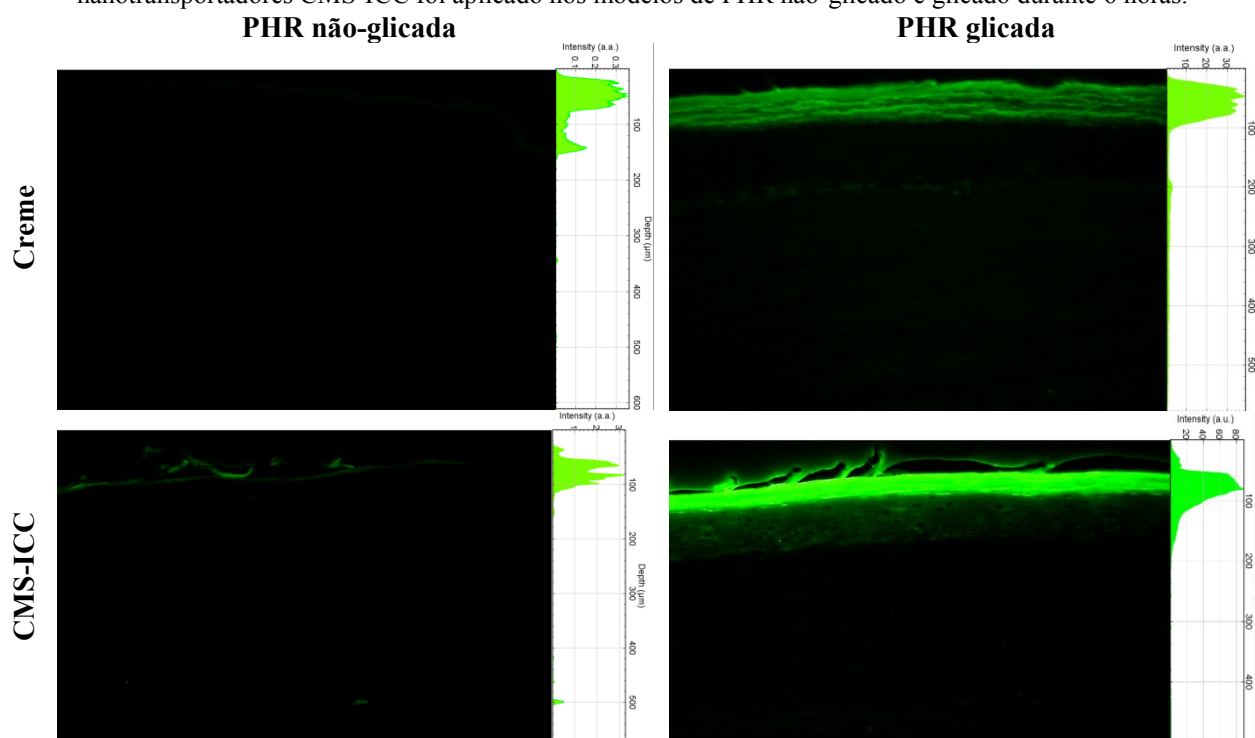


A microscopia confocal de refletância rapidamente analisa a morfologia dos modelos de PHR sem danificar as estruturas da mesma. É uma metodologia clínica que pode ser utilizada em pele de pacientes, o que permite a comparação dos resultados obtidos nos modelos de PHR. De acordo com os dados *in vivo*, o colágeno demonstrou-se condensado nas PHR glicosadas quando comparadas com as não-glicosadas o que pode ser devido ao *cross-link* do colágeno; além disso, podem-se observar feixes irregulares brilhantes, os quais são sugestivos de elastose. Entretanto, a microscopia confocal de refletância revelou aumento da espessura da epiderme dos modelos de PHR glicosadas.

4.8 Penetração de Nanotransportadores CMS

A Figura 61 demonstra a penetração de Bodipy encapsulado em creme e em nanotransportadores CMS-ICC em modelos de PHR não-glicosado e glicosado após 6 horas de tratamento.

Figura 61. Penetração em PHR não-glicadas e glicadas. Bodipy encapsulado em creme e em nanotransportadores CMS-ICC foi aplicado nos modelos de PHR não-glicado e glicado durante 6 horas.



As análises de fluorescência demonstraram que o Bodipy encapsulado nos nanotransportadores CMS-ICC penetrou através dos modelos de PHR glicada após 6 horas. Verifica-se nas imagens que os nanotransportadores CMS-ICC podem ser encontrados nas camadas viáveis de pele, estando presentes na camada basal da epiderme (Figura 61). Em contrapartida, na pele não-glicada, os nanotransportadores CMS-ICC foram acumulados exclusivamente no estrato córneo, não penetrando as camadas mais profundas da pele após 6 horas de ensaio.

O Bodipy encapsulado em base galênica convencional demonstrou acumular-se exclusivamente no estrato córneo e não penetrou nas camadas mais profundas da pele após 6 horas de ensaio em ambos os modelos de PHR, não-glicado e glicado.

Os idosos apresentam aumento de doenças neuropáticas devido à polifarmácia a que são submetidos (SCHMADER et al., 2010). Medicamentos tópicos podem oferecer uma alternativa à pacientes idosos, uma vez que este tipo de terapia geralmente apresenta baixo risco de promover efeitos adversos sérios, os quais podem incluir efeitos adversos do sistema nervoso central (MCCARBERG; D'ARCY, 2013).

O estrato córneo é a principal barreira para os sistemas de liberação de fármacos transepidérmicos; ela é composta por corneócitos mortos que são envoltos por uma matriz extracelular lipídica (ANDREWS et al., 2013).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que a espessura do estrato córneo no modelo de PHR glicada poderia dificultar a penetração de fármacos. Então, o uso de

alternativas que pudessem promover a penetração e permeação deveria ser investigado. Os nanotransportadores CMS demonstraram em estudos prévios que podem ser promotores de penetração, porém os modos pelos quais os nanotransportadores promovem a permeação ainda necessitam ser elucidados (Zoschke et al., 2015). O tamanho médio das partículas poliméricas (20-30 nm) pode resultar em superioridade na penetração. No entanto, o fato de a acumulação das nanopartículas dentro dos sulcos entre os corneócitos poder facilitar o transporte para camadas mais profundas da pele (KÜCHLER et al., 2009).

5. Conclusões

Os resultados demonstraram que entre os agentes redutores capazes de promover o cross-link do colágeno, a D-ribose apresentou menor toxicidade para as células de fibroblasto e queratinócitos; e, desta maneira, foi utilizada para a produção dos modelos de pele glicado. Foi possível observar que houve um aumento da espessura do estrato córneo com alteração dos biomarcadores de diferenciação da epiderme no modelo de PHR com colágeno glicado, demonstrando que a modificação do comportamento dérmico, promoveu alteração do processo de diferenciação da epiderme. Porém, mais estudos sobre o *cross-talk* molecular entre o colágeno glicado e a diferenciação da epiderme são necessários.

A microscopia confocal de reflectância demonstrou elastose no compartimento dérmico que pode ser um indicativo do cross-link.

Os nanotransportadores CMS promoveram a penetração de Bodipy no modelo de PHR glicada após 6 horas, porém não no modelo de PHR não-glicada.

Uma vez que a pele humana envelhecida apresenta redução da espessura da pele, com redução do estrato córneo. Os resultados obtidos até o momento demonstraram que o modelo de pele glicado desenvolvido não é um modelo de pele ideal para mimetizar o envelhecimento cutâneo.

6. Referências

- ALNASIF, N.; ZOSCHKE, C.; FLEIGE, E.; BRODWOLF, R.; BOREHAM, A.; RÜHL, E.; ECKL, K.-M.; MERK, H.-F.; HENNIES, H. C.; ALEXIEV, U. Penetration of normal, damaged and diseased skin—An in vitro study on dendritic core–multishell nanotransporters. **Journal of Controlled Release**, v. 185, p. 45-50, 2014.
- ANDREWS, S. N.; JEONG, E.; PRAUSNITZ, M. R. Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum. **Pharmaceutical research**, v. 30, n. 4, p. 1099-1109, 2013.
- BASPINAR, Y.; BORCHERT, H.-H. Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions—Is there a benefit of the positive charge? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1, p. 247-252, 2012.
- BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 9, n. 5, p. 497-508, 2012.
- BHATTACHARYA, S.; DARJATMOKO, S. R.; POLANS, A. S. Resveratrol Modulates the Malignant Properties of Cutaneous Melanoma via Changes in the Activation and Attenuation of the Anti-apoptotic Proto-oncogenic Protein Akt/PKB. **Melanoma research**, v. 21, n. 3, p. 180, 2011.
- BIKLE, D. D.; XIE, Z.; TU, C.-L. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. **Expert review of endocrinology & metabolism**, v. 7, n. 4, p. 461-472, 2012.
- BINKS, B. P.; WHITBY, C. P. Nanoparticle silica-stabilised oil-in-water emulsions: improving emulsion stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 253, n. 1, p. 105-115, 2005.
- BOEHM, H. Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. **Carbon**, v. 40, n. 2, p. 145-149, 2002.
- BOREHAM, A.; PFAFF, M.; FLEIGE, E.; HAAG, R.; ALEXIEV, U. Nanodynamics of dendritic core–multishell nanocarriers. **Langmuir**, v. 30, n. 6, p. 1686-1695, 2014.
- BORGIA, S. L.; SCHLUPP, P.; MEHNERT, W.; SCHÄFER-KORTING, M. In vitro skin absorption and drug release—a comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 2, p. 380-389, 2008.
- BRASIL. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. ANVISA. Diário Oficial da União, Brasília: 47 p. 2003.

BREITENBACH, J. S.; RINNERTHALER, M.; TROST, A.; WEBER, M.; KLAUSEGGER, A.; GRUBER, C.; BRUCKNER, D.; REITSAMER, H. A.; BAUER, J. W.; BREITENBACH, M. Transcriptome and ultrastructural changes in dystrophic Epidermolysis bullosa resemble skin aging. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 6, p. 389-411, 2015.

BRIGANTI, S.; CAMERA, E.; PICARDO, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 2, p. 101-110, 2003.

BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405-411, 2011.

BYRNE, J. D.; BETANCOURT, T.; BRANNON-PEPPAS, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1615-1626, 2008.

CADAU, S.; LEOTY-OKOMBI, S.; NAKAJIMA, S.; ANDRE-FREI, V. Endothelialized and innervated 3D skin glycosylated model. **Journal of Dermatological Science**, v. 84, n. 1, p. e147, 2016.

CADAU, S.; LEOTY-OKOMBI, S.; PAIN, S.; BECHETOILLE, N.; ANDRÉ-FREI, V.; BERTHOD, F. In vitro glycation of an endothelialized and innervated tissue-engineered skin to screen anti-AGE molecules. **Biomaterials**, v. 51, p. 216-225, 2015.

CALDERÓN, M.; QUADIR, M. A.; SHARMA, S. K.; HAAG, R. Dendritic polyglycerols for biomedical applications. **Advanced Materials**, v. 22, n. 2, p. 190-218, 2010.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer research**, v. 47, n. 4, p. 936-942, 1987.

CHANG, E.; THEKKEK, N.; YU, W. W.; COLVIN, V. L.; DREZEK, R. Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake. **Small**, v. 2, n. 12, p. 1412-1417, 2006.

CHANG, T.-S. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. **Materials**, v. 5, n. 9, p. 1661-1685, 2012.

CHAO, T.-Y.; LAVIS, L. D.; RAINES, R. T. Cellular uptake of ribonuclease A relies on anionic glycans. **Biochemistry**, v. 49, n. 50, p. 10666-10673, 2010.

CHEN, H.; CHANG, X.; DU, D.; LIU, W.; LIU, J.; WENG, T.; YANG, Y.; XU, H.; YANG, X. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 110, n. 2, p. 296-306, 2006.

CHEN, Y.; ZHOU, L.; YUAN, L.; ZHANG, Z.; LIU, X.; WU, Q. Formulation, characterization, and evaluation of in vitro skin permeation and in vivo pharmacodynamics of

surface-charged tripterine-loaded nanostructured lipid carriers. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 3023-3032, 2012.

CHOI, K. Y.; CHUNG, H.; MIN, K. H.; YOON, H. Y.; KIM, K.; PARK, J. H.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. **Biomaterials**, v. 31, n. 1, p. 106-114, 2010.

CHOI, K. Y.; MIN, K. H.; YOON, H. Y.; KIM, K.; PARK, J. H.; KWON, I. C.; CHOI, K.; JEONG, S. Y. PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1880-1889, 2011.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R. N.; POMBO-NASCIMENTO, E.; VENTURA, D. M. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev bras farm**, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

CHORILLI, M.; PRESTES, P.; RIGON, R.; LEONARDI, G.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V.; OLIVEIRA, A. G. D.; SCARPA, M. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 182-188, 2011.

CHUAH, Y. K.; BASIR, R.; TALIB, H.; TIE, T. H.; NORDIN, N. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. **International journal of inflammation**, v. 2013, 2013.

CIDES, L.; ARAUJO, A.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J. Thermal behaviour, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 84, n. 2, p. 441-445, 2006.

CLAFFEY, K. P.; BROWN, L. F.; DEL AGUILA, L. F.; TOGNAZZI, K.; YEO, K.-T.; MANSEAU, E. J.; DVORAK, H. F. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. **Cancer research**, v. 56, n. 1, p. 172-181, 1996.

COTTART, C. H.; NIVET-ANTOINE, V.; LAGUILLIER-MORIZOT, C.; BEAUDEUX, J. L. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 1, p. 7-16, 2010.

DALE, B.; RESING, K.; LONSDALE-ECCLES, J. Filaggrin: A Keratin Filament Associated Proteina. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 455, n. 1, p. 330-342, 1985.

DAMINK, L.; DIJKSTRA, P.; VAN LUYN, M.; VAN WACHEM, P.; NIEUWENHUIS, P.; FEIJEN, J. Changes in the mechanical properties of dermal sheep collagen during in vitro degradation. **Journal of biomedical materials research**, v. 29, n. 2, p. 139-147, 1995.

DAMINK, L. O.; DIJKSTRA, P.; VAN LUYN, M.; VAN WACHEM, P.; NIEUWENHUIS, P.; FEIJEN, J. In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water-soluble carbodiimide. **Biomaterials**, v. 17, n. 7, p. 679-684, 1996.

DANCIK, Y.; BIGLIARDI, P. L.; BIGLIARDI-QI, M. What happens in the skin? Integrating skin permeation kinetics into studies of developmental and reproductive toxicity following topical exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 252-281, 2015.

DAUSEND, J.; MUSYANOVYCH, A.; DASS, M.; WALTHER, P.; SCHREZENMEIER, H.; LANDFESTER, K.; MAILÄNDER, V. Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. **Macromolecular bioscience**, v. 8, n. 12, p. 1135-1143, 2008.

DE BRUM, T. L.; FIEL, L. A.; CONTRI, R. V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules have diverse skin penetration. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 773-780, 2015.

DECUZZI, P.; FERRARI, M. The Receptor-Mediated Endocytosis of Nonspherical Particles. **Biophysical journal**, v. 94, n. 10, p. 3790-3797, 2008.

DETONI, C. B.; SOUTO, G. D.; DA SILVA, A. L. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and Skin Penetration of Different E-Resveratrol-Loaded Supramolecular Structures. **Photochem. Photobiol.**, v. 88, n. 4, p. 913-921, 2012.

DHAWAN, A.; SHARMA, V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 398, n. 2, p. 589-605, 2010.

DÍAZ, B.; SÁNCHEZ-ESPINEL, C.; ARRUEBO, M.; FARO, J.; DE MIGUEL, E.; MAGADÁN, S.; YAGÜE, C.; FERNÁNDEZ-PACHECO, R.; IBARRA, M. R.; SANTAMARÍA, J. Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. **Small**, v. 4, n. 11, p. 2025-2034, 2008.

DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. Mechanisms of endocytosis. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 857-902, 2009.

DOWLING, A.; CLIFT, R.; GROBERT, N.; HUTTON, D.; OLIVER, R.; O'NEILL, O.; PETHICA, J.; PIDGEON, N.; PORRITT, J.; RYAN, J. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. **London: The Royal Society & The Royal Academy of Engineering Report**, p. 61-64, 2004.

DUBE, D. H.; BERTOZZI, C. R. Glycans in cancer and inflammation—potential for therapeutics and diagnostics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 6, p. 477-488, 2005.

ELLEDGE, S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1664, 1996.

ESTIMATIVA, I. **Incidência de câncer no Brasil [Internet]**: Estimativa 2016.

FALCONER, J.; ROSS, J.; FEARON, K.; HAWKINS, R.; O'RIORDAIN, M.; CARTER, D. Effect of eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth in vitro of human pancreatic cancer cell lines. **British journal of cancer**, v. 69, n. 5, p. 826, 1994.

FARAGE, M. A.; MILLER, K. W.; ELSNER, P.; MAIBACH, H. I. Characteristics of the aging skin. **Advances in wound care**, v. 2, n. 1, p. 5-10, 2013.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, 2009.

FAZIO, M.; OLSEN, D.; UITTO, J. Skin aging: lessons from cutis laxa and elastoderma. **Cutis**, v. 43, n. 5, p. 437-444, 1989.

FIELD, C. J.; SCHLEY, P. D. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 6, p. 1190S-1198S, 2004.

FLAMAND, N.; MARROT, L.; BELAIDI, J.-P.; BOUROUF, L.; DOURILLE, E.; FELTES, M.; MEUNIER, J.-R. Development of genotoxicity test procedures with Episkin®, a reconstructed human skin model: Towards new tools for in vitro risk assessment of dermally applied compounds? **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 606, n. 1, p. 39-51, 2006.

FREEDMAN, J. A.; TYLER, D. S.; NEVINS, J. R.; AUGUSTINE, C. K. Use of gene expression and pathway signatures to characterize the complexity of human melanoma. **Am J Pathol**, v. 178, n. 6, p. 2513-22, 2011.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 5577-91, 2012.

GABIZON, A.; MARTIN, F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. **Drugs**, v. 54, n. 4, p. 15-21, 1997.

GAL, D.; OHASHI, M.; MACDONALD, P. C.; BUCHSBAUM, H. J.; SIMPSON, E. R. Low-density lipoprotein as a potential vehicle for chemotherapeutic agents and radionucleotides in the management of gynecologic neoplasms. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 139, n. 8, p. 877-885, 1981.

GALICHET, A.; WEIBEL, M.; HEIZMANN, C. W. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 370, n. 1, p. 1-5, 2008.

GANDINI, S.; AUTIER, P.; BONIOL, M. Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 107, n. 3, p. 362-366, 2011.

GARBE, C.; EIGENTLER, T. K.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHILD, A.; KIRKWOOD, J. M. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. **Oncologist**, v. 16, n. 1, p. 5-24, 2011.

GARDOUH, A. R.; GAD, S.; GHONAIM, H. M.; GHORAB, M. M. Design and characterization of glyceryl monostearate solid lipid nanoparticles prepared by high shear homogenization. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 3, p. 326-346, 2013.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GEHM, B. D.; MCANDREWS, J. M.; CHIEN, P.-Y.; JAMESON, J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 25, p. 14138-14143, 1997.

GKOGKOLOU, P.; BÖHM, M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging? **Dermato-endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 259-270, 2012.

GLOMB, M. A.; MONNIER, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 17, p. 10017-10026, 1995.

GOH, J. Z.; TANG, S. N.; CHIONG, H. S.; YONG, Y. K.; ZURAINI, A.; HAKIM, M. N. evaluation of antinociceptive activity of nanoliposome-encapsulated and free-form diclofenac in rats and mice. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 297, 2015.

GONÇALEZ, M.; CORRÊA, M.; CHORILLI, M. Skin delivery of kojic Acid-loaded nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of skin aging. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

GOVINDARAJAN, B.; SLIGH, J. E.; VINCENT, B. J.; LI, M.; CANTER, J. A.; NICKOLOFF, B. J.; RODENBURG, R. J.; SMEITINK, J. A.; OBERLEY, L.; ZHANG, Y. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 3, p. 719-729, 2007.

GRILL, A. E.; JOHNSTON, N. W.; SADHUKHA, T.; PANYAM, J. A review of select recent patents on novel nanocarriers. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, n. 2, p. 137-142, 2009.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GUO, L.; PENG, Y.; YAO, J.; SUI, L.; GU, A.; WANG, J. Anticancer Activity and Molecular Mechanism of Resveratrol–Bovine Serum Albumin Nanoparticles on Subcutaneously Implanted Human Primary Ovarian Carcinoma Cells in Nude Mice. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v. 25, n. 4, p. 471-477, 2010.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147, 2007.

HAMBLIN, M. R.; AVCI, P.; PROW, T. **Nanoscience in Dermatology**. Elsevier Science, 2016. ISBN 9780128029459.

HAMMES, H.-P.; HOERAUF, H.; ALT, A.; SCHLEICHER, E.; CLAUSEN, J. T.; BRETZEL, R. G.; LAQUA, H. Ne (carboxymethyl) lysin and the AGE receptor RAGE colocalize in age-related macular degeneration. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 40, n. 8, p. 1855-1859, 1999.

HANAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HELGASON, T.; AWAD, T.; KRISTBERGSSON, K.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of colloid and interface science**, v. 334, n. 1, p. 75-81, 2009.

HENRIQUES, M.; SILVA, P.; MARTINS, M.; FLORES, C.; CUNHA, F.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...**[et al.], v. 20, n. 2, p. 243-249, 1986.

HILLIAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2873-2896, 2009.

HILLEGASS, J. M.; SHUKLA, A.; LATHROP, S. A.; MACPHERSON, M. B.; FUKAGAWA, N. K.; MOSSMAN, B. T. Assessing nanotoxicity in cells in vitro. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 3, p. 219-231, 2010.

HONG, R.-L.; HUANG, C.-J.; TSENG, Y.-L.; PANG, V. F.; CHEN, S.-T.; LIU, J.-J.; CHANG, F.-H. Direct Comparison of Liposomal Doxorubicin with or without Polyethylene Glycol Coating in C-26 Tumor-bearing Mice Is Surface Coating with Polyethylene Glycol Beneficial? **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 11, p. 3645-3652, 1999.

HOO, C. M.; STAROSTIN, N.; WEST, P.; MECARTNEY, M. L. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 1, p. 89-96, 2008.

HORI, M.; YAGI, M.; NOMOTO, K.; ICHIJO, R.; SHIMODE, A.; KITANO, T.; YONEI, Y. Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. **Anti-Aging Medicine**, v. 9, n. 6, p. 125-134, 2012.

HOWARD, K. A.; RAHBK, U. L.; LIU, X.; DAMGAARD, C. K.; GLUD, S. Z.; ANDERSEN, M. Ø.; HOVGAARD, M. B.; SCHMITZ, A.; NYENGAARD, J. R.; BESENBACHER, F. RNA interference in vitro and in vivo using a chitosan/siRNA nanoparticle system. **Molecular Therapy**, v. 14, n. 4, p. 476-484, 2006.

HU, F.-Q.; JIANG, S.-P.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; YE, Y.-Q.; ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 3-4, p. 167-173, 2005.

ICH. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). p. 17, 2005.

INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M.; VENIR, E.; SPAZIANI, M.; MARCHESINI, G. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distribution and rheological properties of ice cream mixes. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1864-1875, 2009.

IVERSEN, T.-G.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. **Nano Today**, v. 6, n. 2, p. 176-185, 2011.

IWASAKI, T.; ISHIBASHI, J.; TANAKA, H.; SATO, M.; ASAOKA, A.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface. **Peptides**, v. 30, n. 4, p. 660-668, 2009.

IYER, A. K.; KHALED, G.; FANG, J.; MAEDA, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug discovery today**, v. 11, n. 17, p. 812-818, 2006.

JAIN, A.; JAIN, K.; KESHARWANI, P.; JAIN, N. K. Low density lipoproteins mediated nanoplatfoms for cancer targeting. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, n. 9, p. 1-38, 2013.

JAIN, P. K.; LEE, K. S.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYED, M. A. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 14, p. 7238-7248, 2006.

JARACZ, S.; CHEN, J.; KUZNETSOVA, L. V.; OJIMA, I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 17, p. 5043-5054, 2005.

JENNING, V.; GOHLA, S. H. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of microencapsulation**, v. 18, n. 2, p. 149-158, 2001.

JENNING, V.; THÜNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, n. 2, p. 167-177, 2000.

JIN, H.; LOVELL, J. F.; CHEN, J.; NG, K.; CAO, W.; DING, L.; ZHANG, Z.; ZHENG, G. Cytosolic delivery of LDL nanoparticle cargo using photochemical internalization. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 810-816, 2011.

JIN, S. G.; YOUSAF, A. M.; SON, M. W.; JANG, S. W.; KIM, D. W.; KIM, J. O.; YONG, C. S.; KIM, J. H.; CHOI, H.-G. Mechanical properties, skin permeation and in vivo evaluations of dexibuprofen-loaded emulsion gel for topical delivery. **Archives of pharmacal research**, v. 38, n. 2, p. 216-222, 2015.

JOHNSON, S.; NGUYEN, V.; CODER, D. Assessment of cell viability. **Current protocols in cytometry**, p. 9.2. 1-9.2. 26, 2013.

JONES, C. F.; GRAINGER, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 438-456, 2009.

JORES, K.; MEHNERT, W.; DRECHSLER, M.; BUNJES, H.; JOHANN, C.; MÄDER, K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 217-227, 2004.

JUHLIN, L.; MAGNOLDO, T.; DARMON, M. Expression of loricrin in skin disorders. **Acta dermato-venereologica**, v. 72, n. 6, p. 407-409, 1992.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European journal of dermatology: EJD**, v. 12, n. 4, p. 390-9; quiz 400-1, 2001.

KARAIPEKLI, A.; SARı, A.; KAYGUSUZ, K. Thermal conductivity improvement of stearic acid using expanded graphite and carbon fiber for energy storage applications. **Renewable Energy**, v. 32, n. 13, p. 2201-2210, 2007.

KHALIL, M.; MARCELLETTI, J. F.; KATZ, L. R.; KATZ, D. H.; POPE, L. E. Topical application of docosanol-or stearic acid-containing creams reduces severity of phenol burn wounds in mice. **Contact dermatitis**, v. 43, n. 2, p. 79-81, 2000.

KHIAO IN, M.; WALLMEYER, L.; HEDTRICH, S.; RICHARDSON, K.; PLENDL, J.; KAESSMEYER, S. The effect of endothelialization on the epidermal differentiation in human three-dimensional skin constructs—A morphological study. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 61, n. 2, p. 157-174, 2015.

KIM, A.; YANG, Y.; LEE, M. S.; YOO, Y. D.; LEE, H. G.; LIM, J. S. NDRG2 gene expression in B16F10 melanoma cells restrains melanogenesis via inhibition of Mitf expression. **Pigment cell & melanoma research**, v. 21, n. 6, p. 653-664, 2008.

KIM, J.; WAN, C. K.; J O'CARROLL, S.; SHAIKH, S. B.; NICHOLSON, L. F. The role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in neuronal differentiation. **Journal of neuroscience research**, v. 90, n. 6, p. 1136-1147, 2012a.

KIM, M. Y. Nitric oxide triggers apoptosis in A375 human melanoma cells treated with capsaicin and resveratrol. **Molecular medicine reports**, v. 5, n. 2, p. 585-591, 2012.

KIM, S.; NG, W. K.; DONG, Y.; DAS, S.; TAN, R. B. Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 1, p. 37-42, 2012b.

KITTLER, S.; GREULICH, C.; GEBAUER, J.; DIENDORF, J.; TREUEL, L.; RUIZ, L.; GONZALEZ-CALBET, J.; VALLET-REGI, M.; ZELLNER, R.; KÖLLER, M. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 512-518, 2010.

KONG, B.; SEOG, J. H.; GRAHAM, L. M.; LEE, S. B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 929-941, 2011.

KRASNICI, S.; WERNER, A.; EICHHORN, M. E.; SCHMITT-SODY, M.; PAHERNIK, S. A.; SAUER, B.; SCHULZE, B.; TEIFEL, M.; MICHAELIS, U.; NAUJOKS, K. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. **International journal of cancer**, v. 105, n. 4, p. 561-567, 2003.

KRISTL, J.; TESKAČ, K.; CADDEO, C.; ABRAMOVIĆ, Z.; ŠENTJURC, M. Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 2, p. 253-259, 2009.

KÜCHLER, S.; RADOWSKI, M. R.; BLASCHKE, T.; DATHE, M.; PLENDL, J.; HAAG, R.; SCHÄFER-KORTING, M.; KRAMER, K. D. Nanoparticles for skin penetration enhancement—a comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 243-250, 2009.

KUKOWSKA-LATALLO, J. F.; CANDIDO, K. A.; CAO, Z.; NIGAVEKAR, S. S.; MAJOROS, I. J.; THOMAS, T. P.; BALOGH, L. P.; KHAN, M. K.; BAKER, J. R. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 12, p. 5317-5324, 2005.

KULKARNI, V. S. **Handbook of non-invasive drug delivery systems: science and technology**. Elsevier, 2009. ISBN 0815520263.

KUMAR, R.; PHILIP, A. Modified transdermal technologies: Breaking the barriers of drug permeation via the skin. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 1, p. 633-644, 2007.

KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K. Preparation and characterization of Paliperidone loaded solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 562-568, 2013.

KUNSTFELD, R.; WICKENHAUSER, G.; MICHAELIS, U.; TEIFEL, M.; UMEK, W.; NAUJOKS, K.; WOLFF, K.; PETZELBAUER, P. Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes diminishes tumor angiogenesis and melanoma growth in a “humanized” SCID mouse model. **Journal of investigative dermatology**, v. 120, n. 3, p. 476-482, 2003.

KUO, Y.-C.; CHEN, H.-H. Effect of electromagnetic field on endocytosis of cationic solid lipid nanoparticles by human brain-microvascular endothelial cells. **Journal of drug targeting**, v. 18, n. 6, p. 447-456, 2010.

KUO, Y.-C.; LIANG, C.-T. Cationic solid lipid nanoparticles carrying doxorubicin for inhibiting the growth of U87MG cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 131-137, 2011.

KUO, Y.-C.; WANG, C.-C. Cationic solid lipid nanoparticles with primary and quaternary amines for release of saquinavir and biocompatibility with endothelia. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 101-105, 2013.

LABARRE, D.; VAUTHIER, C.; CHAUVIERRE, C.; PETRI, B.; MÜLLER, R.; CHEHIMI, M. M. Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush. **Biomaterials**, v. 26, n. 24, p. 5075-5084, 2005.

LEAMON, C. P.; REDDY, J. A. Folate-targeted chemotherapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 8, p. 1127-1141, 2004.

LEE, J. K.; KIM, D. B.; KIM, J. I.; KIM, P. Y. In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. **Toxicology in vitro**, v. 14, n. 4, p. 345-349, 2000.

LIN, J.; ALEXANDER-KATZ, A. Cell membranes open “doors” for cationic nanoparticles/biomolecules: insights into uptake kinetics. **ACS Nano**, v. 7, n. 12, p. 10799-10808, 2013.

LIU, J.; HU, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 2, p. 191-195, 2007.

LOWE, J. S. **Stevens & Lowe Histologia Humana**. Elsevier Brasil, 2015. ISBN 8535236899.

LUNDBERG, B. Preparation of drug low density lipoprotein complexes for delivery of antitumoral drugs via the low density lipoprotein pathway. **Cancer research**, v. 47, n. 15, p. 4105-4108, 1987.

MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 1, p. 271-284, 2000.

MAHOR, S.; RAWAT, A.; DUBEY, P. K.; GUPTA, P. N.; KHATRI, K.; GOYAL, A. K.; VYAS, S. Cationic transfersomes based topical genetic vaccine against hepatitis B. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, n. 1, p. 13-19, 2007.

MAILÄNDER, V.; LORENZ, M. R.; HOLZAPFEL, V.; MUSYANOVYCH, A.; FUCHS, K.; WIESNETH, M.; WALTHER, P.; LANDFESTER, K.; SCHREZENMEIER, H. Carboxylated superparamagnetic iron oxide particles label cells intracellularly without transfection agents. **Molecular imaging and biology**, v. 10, n. 3, p. 138-146, 2008.

MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 11, p. 592-599, 2009.

MANUAL, P. OxiSelect™ Nε-(carboxymethyl) lysine (CML) Competitive ELISA Kit.

MARA MAINARDES, R.; CRISTINA COCENZA URBAN, M.; OLIVEIRA CINTO, P.; VINICIUS CHAUD, M.; CESAR EVANGELISTA, R.; PALMIRA DAFLON GREMIAO, M. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 3, p. 275-285, 2006.

MARCATO, P.; CAVERZAN, J.; ROSSI-BERGMANN, B.; PINTO, E.; MACHADO, D.; SILVA, R.; JUSTO, G.; FERREIRA, C.; DURÁN, N. Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreen. Biological effects and skin permeation. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 1880-1886, 2011.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 6, n. 2, 2009.

MASQUELIER, M.; VITOLS, S.; PETERSON, C. Low-density lipoprotein as a carrier of antitumoral drugs: In vivo fate of drug-human-low-density lipoprotein complexes in mice. **Cancer research**, v. 46, n. 8, p. 3842-3847, 1986.

MASTERS, J. R.; STACEY, G. N. Changing medium and passaging cell lines. **Nature protocols**, v. 2, n. 9, p. 2276-2284, 2007.

MCCARBERG, B.; D'ARCY, Y. Options in topical therapies in the management of patients with acute pain. **Postgraduate medicine**, v. 125, n. sup1, p. 19-24, 2013.

MCMAHON, H. T.; BOUCROT, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 8, p. 517-533, 2011.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 2, p. 165-196, 2001a.

_____. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, 2001b.

MEHREL, T.; HOHL, D.; ROTHNAGEL, J. A.; LONGLEY, M. A.; BUNDMAN, D.; CHENG, C.; LICHTI, U.; BISHER, M. E.; STEVEN, A. C.; STEINERT, P. M. Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. **Cell**, v. 61, n. 6, p. 1103-1112, 1990.

MEI, Z.; CHEN, H.; WENG, T.; YANG, Y.; YANG, X. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 2, p. 189-196, 2003.

MELNIKOVA, V.; BAR-ELI, M. Inflammation and melanoma growth and metastasis: the role of platelet-activating factor (PAF) and its receptor. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 26, n. 3-4, p. 359-371, 2007.

MERTSCHING, H.; WEIMER, M.; KERSEN, S.; BRUNNER, H. Human skin equivalent as an alternative to animal testing. **GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär**, v. 3, n. 1, 2008.

MINAYO, M. C. D. S. Aging of the Brazilian population and challenges for the health sector. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 2, p. 208-210, 2012.

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y. Nanoparticles-a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2007.

MONNIER, V. M.; MUSTATA, G. T.; BIEMEL, K. L.; REIHL, O.; LEDERER, M. O.; ZHENYU, D.; SELL, D. R. Cross-linking of the extracellular matrix by the maillard reaction in aging and diabetes: an update on “a puzzle nearing resolution”. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, n. 1, p. 533-544, 2005.

MOSBY, I. **Mosby's dictionary of medicine, nursing & health professions**. Elsevier Health Sciences, 2013. ISBN 0323074030.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, S.; EDMUNDS, M.; LEI, X.; OTTAVIANI, M. F.; ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; TURRO, N. J. Original Contribution: Stearic acid delivery to corneum from a mild and moisturizing cleanser. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 9, n. 3, p. 202-210, 2010.

MULLA, J.; KHAZI, I. Influence of process variables on particle size of solid lipid nanoparticles **Indian Journal of Novel Drug Delivery**, v. 1, n. 1, p. 47-49, 2009.

MÜLLER, R.; LUCKS, J. Arzneistoffträger aus festen lipidteilchen, feste lipidnanosphären (sln). **European patent**, v. 605497, 1996.

MÜLLER, R.; PETERSEN, R.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

MÜLLER, R.; RADTKE, M.; WISSING, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131-S155, 2002.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000a.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000b.

MULLER, R. H.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S. Production of solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. **Proceedings of the Controlled Release Society**, n. 20, p. 480-481, 1993.

NA, K.; SEONG LEE, E.; BAE, Y. H. Adriamycin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH-dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 87, n. 1, p. 3-13, 2003.

NDIAYE, M.; PHILIPPE, C.; MUKHTAR, H.; AHMAD, N. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 508, n. 2, p. 164-170, 2011.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Quim. Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

NEPAL, P. R.; HAN, H.-K.; CHOI, H.-K. Enhancement of solubility and dissolution of Coenzyme Q 10 using solid dispersion formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1, p. 147-153, 2010.

NEWA, M.; BHANDARI, K. H.; LI, D. X.; KWON, T.-H.; KIM, J. A.; YOO, B. K.; WOO, J. S.; LYOO, W. S.; YONG, C. S.; CHOI, H. G. Preparation, characterization and in vivo evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with poloxamer 188. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, n. 1, p. 228-237, 2007.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of immunological methods**, v. 139, n. 2, p. 271-279, 1991.

NIKOLAKIS, G.; ZOSCHKE, C.; MAKRANTONAKI, E.; HAUSMANN, C.; SCHÄFER-KORTING, M.; ZOUBOULIS, C. [Experimental models of human skin aging]. **Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, 2016.

NILES, R. M.; COOK, C. P.; MEADOWS, G. G.; FU, Y.-M.; MCLAUGHLIN, J. L.; RANKIN, G. O. Resveratrol is rapidly metabolized in athymic (nu/nu) mice and does not inhibit human melanoma xenograft tumor growth. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 10, p. 2542-2546, 2006.

NILES, R. M.; MCFARLAND, M.; WEIMER, M. B.; REDKAR, A.; FU, Y.-M.; MEADOWS, G. G. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 190, n. 2, p. 157-163, 2003.

NITHYA, S.; RADHIKA, T.; JEDDY, N. Loricrin-an overview. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 19, n. 1, p. 64, 2015.

NOGUCHI, Y.; WU, J.; DUNCAN, R.; STROHALM, J.; ULBRICH, K.; AKAIKE, T.; MAEDA, H. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. **Cancer Science**, v. 89, n. 3, p. 307-314, 1998.

NOMOTO, K.; YAGI, M.; ARITA, S.; OGURA, M.; YONEI, Y. Skin accumulation of advanced glycation end products and lifestyle behaviors in Japanese. **Anti-Aging Medicine**, v. 9, n. 6, p. 165-173, 2012.

NUTRITION, U. S. D. O. H. A. H. S. F. A. D. A. C. F. F. S. A. A. Guidance for Industry: Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that are Color Additives 2012.

OLAMI, H.; ZILBERMAN, M. Microstructure and in vitro cellular response to novel soy protein-based porous structures for tissue regeneration applications. **Journal of biomaterials applications**, p. 0885328215614713, 2015.

OLESEN, K. R.; BASSETT, D. R.; WILKERSON, C. L. Surfactant co-thickening in model associative polymers. **Progress in Organic Coatings**, v. 35, n. 1-4, p. 161-170, 1999.

OLIVEIRA, M. B.; PRADO, A. H. D.; BERNEGOSI, J.; SATO, C. S.; LOURENÇO BRUNETTI, I.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.; FRIBERG, S. E.; CHORILLI, M. Topical Application of Retinyl Palmitate-Loaded Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Skin Aging. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

OSMAN, M. A.; ATALLAH, A. Effect of the particle size on the viscoelastic properties of filled polyethylene. **Polymer**, v. 47, n. 7, p. 2357-2368, 2006.

OTT, C.; JACOBS, K.; HAUCKE, E.; SANTOS, A. N.; GRUNE, T.; SIMM, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox biology**, v. 2, p. 411-429, 2014.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.

OWENS III, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.

PAGEON, H. Reaction of glycation and human skin: the effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model. **Pathologie Biologie**, v. 58, n. 3, p. 226-231, 2010.

PAGEON, H.; TÉCHER, M.-P.; ASSELINEAU, D. Reconstructed skin modified by glycation of the dermal equivalent as a model for skin aging and its potential use to evaluate anti-glycation molecules. **Experimental gerontology**, v. 43, n. 6, p. 584-588, 2008.

PAGEON, H.; ZUCCHI, H.; DAI, Z.; SELL, D. R.; STRAUCH, C. M.; MONNIER, V. M.; ASSELINEAU, D. Biological effects induced by specific advanced glycation end products in the reconstructed skin model of aging. **BioResearch open access**, v. 4, n. 1, p. 54-64, 2015a.

PAGEON, H.; ZUCCHI, H.; PENNACCHI, P. C.; ASSELINEAU, D. Glycation and Skin Aging. 2015b.

PARK, M. V.; ANNEMA, W.; SALVATI, A.; LESNIAK, A.; ELSAESSER, A.; BARNES, C.; MCKERR, G.; HOWARD, C. V.; LYNCH, I.; DAWSON, K. A. In vitro developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 240, n. 1, p. 108-116, 2009a.

PARK, M. V.; LANKVELD, D. P.; VAN LOVEREN, H.; DE JONG, W. H. The status of in vitro toxicity studies in the risk assessment of nanomaterials. **Nanomedicine**, v. 4, n. 6, p. 669-685, 2009b.

PARLO, R., AND; COLEMAN, P. Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of

mitochondrial membrane cholesterol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 16, p. 9997-10003, 1984.

PATHAK, Y.; THASSU, D. **Drug delivery nanoparticles formulation and characterization**. CRC Press, 2009. ISBN 1420078046.

PENDARIES, V.; LE LAMER, M.; CAU, L.; HANSMANN, B.; MALAISSE, J.; KEZIC, S.; SERRE, G.; SIMON, M. In a three-dimensional reconstructed human epidermis filaggrin-2 is essential for proper cornification. **Cell death & disease**, v. 6, n. 2, p. e1656, 2015.

PENNACCHI, P. C.; DE ALMEIDA, M. E. S.; GOMES, O. L. A.; FAIAO-FLORES, F.; DE ARAÚJO CREPALDI, M. C.; DOS SANTOS, M. F.; DE MORAES BARROS, S. B.; MARIA-ENGLER, S. S. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. **Tissue Engineering Part A**, v. 21, n. 17-18, p. 2417-2425, 2015.

PIRAS, S.; FURFARO, A.; DOMENICOTTI, C.; TRAVERSO, N.; MARINARI, U.; PRONZATO, M.; NITTI, M. RAGE expression and ROS generation in neurons: Differentiation versus damage. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

POHLMANN, A. R.; DETONI, C. B.; PAESE, K.; CORADINI, K.; BECK, R. C.; GUTERRES, S. S. Polymeric Nanocapsules for Topical Delivery. In: (Ed.). **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement**: Springer, 2016. p.201-221. ISBN 3662478617.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

POUMAY, Y.; DUPONT, F.; MARCOUX, S.; LECLERCQ-SMEKENS, M.; HERIN, M.; COQUETTE, A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. **Archives of dermatological research**, v. 296, n. 5, p. 203-211, 2004.

PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan®/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 340-347, 2008.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.

PUZIY, A.; PODDUBNAYA, O.; MARTÍNEZ-ALONSO, A.; SUÁREZ-GARCÍA, F.; TASCÓN, J. Synthetic carbons activated with phosphoric acid: I. Surface chemistry and ion binding properties. **Carbon**, v. 40, n. 9, p. 1493-1505, 2002.

QUADIR, M. A.; HAAG, R. Biofunctional nanosystems based on dendritic polymers. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 484-495, 2012.

QUAN, T. **Molecular Mechanisms of Skin Aging and Age-Related Diseases**. CRC Press, 2016. ISBN 1498704646.

RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. **Trends in cell biology**, v. 5, n. 3, p. 85-87, 1995.

RADOWSKI, M. R.; SHUKLA, A.; VON BERLEPSCH, H.; BÖTTCHER, C.; PICKAERT, G.; REHAGE, H.; HAAG, R. Supramolecular aggregates of dendritic multishell architectures as universal nanocarriers. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1265-1269, 2007.

RAJADHYAKSHA, M.; ANDERSON, R. R.; WEBB, R. H. Video-rate confocal scanning laser microscope for imaging human tissues in vivo. **Applied optics**, v. 38, n. 10, p. 2105-2115, 1999.

RAJADHYAKSHA, M.; GROSSMAN, M.; ESTEROWITZ, D.; WEBB, R. H.; ANDERSON, R. R. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 6, p. 946-952, 1995.

RAN, S.; DOWNES, A.; THORPE, P. E. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. **Cancer research**, v. 62, n. 21, p. 6132-6140, 2002.

RANDALL, L. O. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn**, v. 111, p. 409-419, 1957.

REIBETANZ, U.; HALOŽAN, D.; BRUMEN, M.; DONATH, E. Flow cytometry of HEK 293T cells interacting with polyelectrolyte multilayer capsules containing fluorescein-labeled poly (acrylic acid) as a pH sensor. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1927-1933, 2007.

REIHL, O.; BIEMEL, K. M.; LEDERER, M. O.; SCHWACK, W. Pyridinium-carbaldehyde: active Maillard reaction product from the reaction of hexoses with lysine residues. **Carbohydrate research**, v. 339, n. 3, p. 705-714, 2004.

REJMAN, J.; OBERLE, V.; ZUHORN, I. S.; HOEKSTRA, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. **Biochemical Journal**, v. 377, n. 1, p. 159-169, 2004.

REQUENA, J. R.; FU, M. X.; AHMED, M. U.; JENKINS, A. J.; LYONS, T. J.; BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. **Biochemical Journal**, v. 322, n. 1, p. 317-325, 1997.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.

RIGON. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas para administração cutânea de trans-resveratrol. 2013.

RIGON; FACHINETTI, N.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H.; CHORILLI, M. Skin Delivery and in Vitro Biological Evaluation of Trans-Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Skin Disorder Therapies. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 116, 2016.

RISTORCELLI, E.; BERAUD, E.; VERRANDO, P.; VILLARD, C.; LAFITTE, D.; SBARRA, V.; LOMBARDO, D.; VERINE, A. Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells. **The FASEB journal**, v. 22, n. 9, p. 3358-3369, 2008.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROHIT, B.; PAL, K. I. A method to prepare solid lipid nanoparticles with improved entrapment efficiency of hydrophilic drugs. **Current Nanoscience**, v. 9, n. 2, p. 211-220, 2013.

RUDLING, M. J.; COLLINS, V. P.; PETERSON, C. O. Delivery of aclacinomycin A to human glioma cells in vitro by the low-density lipoprotein pathway. **Cancer research**, v. 43, n. 10, p. 4600-4605, 1983.

SAHA, R. N.; VASANTHAKUMAR, S.; BENDE, G.; SNEHALATHA, M. Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. **Molecular Membrane Biology**, v. 27, n. 7, p. 215-231, 2010.

SAKAMOTO, J. H.; VAN DE VEN, A. L.; GODIN, B.; BLANCO, E.; SERDA, R. E.; GRATTONI, A.; ZIEMYS, A.; BOUAMRANI, A.; HU, T.; RANGANATHAN, S. I. Enabling individualized therapy through nanotechnology. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 57-89, 2010a.

SAKAMOTO, J. H.; VAN DE VEN, A. L.; GODIN, B.; BLANCO, E.; SERDA, R. E.; GRATTONI, A.; ZIEMYS, A.; BOUAMRANI, A.; HU, T.; RANGANATHAN, S. I.; DE ROSA, E.; MARTINEZ, J. O.; SMID, C. A.; BUCHANAN, R. M.; LEE, S.-Y.; SRINIVASAN, S.; LANDRY, M.; MEYN, A.; TASCIOTTI, E.; LIU, X.; DECUZZI, P.; FERRARI, M. Enabling individualized therapy through nanotechnology. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 57-89, 2010b.

SANDILANDS, A.; SUTHERLAND, C.; IRVINE, A. D.; MCLEAN, W. I. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. **J Cell Sci**, v. 122, n. 9, p. 1285-1294, 2009.

SANTELLI, M. M. **Interação da crisotila com células de carcinoma de pulmão humano em cultura: interferência com a mitose utilizando genes repórteres e microscopia em tempo real e estudo do potencial genotóxico**. 2009. Universidade de São Paulo

SANTOS-NOGUEIRA, E.; REDONDO CASTRO, E.; MANCUSO, R.; NAVARRO, X. Randall-Selitto test: a new approach for the detection of neuropathic pain after spinal cord injury. **Journal of neurotrauma**, v. 29, n. 5, p. 898-904, 2012.

SCHÄFER-KORTING, M.; ROMERO, E. L. Core-Shell Nanotransporters for the Skin. In: (Ed.). **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement**: Springer, 2016. p.241-251.

SCHAFER, K. The cell cycle: a review. **Veterinary pathology**, v. 35, n. 6, p. 461-478, 1998.

SCHÄFER, V.; VON BRIESEN, H.; ANDREESEN, R.; STEFFAN, A.-M.; ROYER, C.; TRÖSTER, S.; KREUTER, J.; RÜBSAMEN-WAIGMANN, H. Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting. **Pharmaceutical research**, v. 9, n. 4, p. 541-546, 1992.

SCHERER, D.; KUMAR, R. Genetics of pigmentation in skin cancer—a review. **Mutation research**, v. 705, n. 2, p. 141, 2010.

SCHMADER, K. E.; BARON, R.; HAANPÄÄ, M. L.; MAYER, J.; O'CONNOR, A. B.; RICE, A. S.; STACEY, B. Treatment considerations for elderly and frail patients with neuropathic pain. *Mayo Clinic Proceedings*, 2010. Elsevier. p.S26-S32.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, n. 2, p. 171-179, 1997.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 1, p. 83-96, 1994.

SEETAPAN, N.; BEJRAPHA, P.; SRINUANCHAI, W.; RUKTANONCHAI, U. R. Rheological and morphological characterizations on physical stability of gamma-oryzanol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs). **Micron**, v. 41, n. 1, p. 51-58, 2010.

SELL, D. R.; BIEMEL, K. M.; REIHL, O.; LEDERER, M. O.; STRAUCH, C. M.; MONNIER, V. M. Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix relationship with diabetes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12310-12315, 2005.

SEMBA, R. D.; NICKLETT, E. J.; FERRUCCI, L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 65, n. 9, p. 963-975, 2010.

SEMMLING, M.; KREFT, O.; MUÑOZ JAVIER, A.; SUKHORUKOV, G. B.; KÄS, J.; PARAK, W. J. A Novel Flow-Cytometry-Based Assay for Cellular Uptake Studies of Polyelectrolyte Microcapsules. **Small**, v. 4, n. 10, p. 1763-1768, 2008.

SEVERINO, P.; PINHO, S. C.; SOUTO, E. B.; SANTANA, M. H. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic–lipophilic balance of stearic acid and stearic acid–capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 125-130, 2011.

SHAH, S. M.; ASHTIKAR, M.; JAIN, A. S.; MAKHIJA, D. T.; NIKAM, Y.; GUDE, R. P.; STEINIGER, F.; JAGTAP, A. A.; NAGARSENKER, M. S.; FAHR, A. LeciPlex, invasomes, and liposomes: a skin penetration study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1, p. 391-403, 2015.

SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry**. John Wiley & Sons, 2005. ISBN 0471434035.

SHENG, Y.; LIU, C.; YUAN, Y.; TAO, X.; YANG, F.; SHAN, X.; ZHOU, H.; XU, F. Long-circulating polymeric nanoparticles bearing a combinatorial coating of PEG and water-soluble chitosan. **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2340-2348, 2009.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHUBAR, H. M.; MAYER, J. P.; HOPFENMÜLLER, W.; LIESENFELD, O. A new combined flow-cytometry-based assay reveals excellent activity against *Toxoplasma gondii* and low toxicity of new bisphosphonates in vitro and in vivo. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1110-1119, 2008.

SHUKLA, Y.; SINGH, R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p. 1-8, 2011.

SLIVINSKY, G. G.; HYMER, W. C.; BAUER, J.; MORRISON, D. R. Cellular electrophoretic mobility data: A first approach to a database. **Electrophoresis**, v. 18, n. 7, p. 1109-1119, 1997.

SOARES, S.; FONTE, P.; COSTA, A.; ANDRADE, J.; SEABRA, V.; FERREIRA, D.; REIS, S.; SARMENTO, B. Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 2, p. 370-381, 2013.

SONVICO, F.; MORNET, S.; VASSEUR, S.; DUBERNET, C.; JAILLARD, D.; DEGROUARD, J.; HOEBEKE, J.; DUGUET, E.; COLOMBO, P.; COUVREUR, P. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. **Bioconjugate chemistry**, v. 16, n. 5, p. 1181-1188, 2005.

SOUTO, E.; ALMEIDA, A.; MULLER, R. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin Effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, n. 4, p. 317-331, 2007.

SOUTO, E.; WISSING, S.; BARBOSA, C.; MÜLLER, R. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 71-77, 2004.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C. Nanopartículas de lípidios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Quim. Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762-1769, 2011.

STERN, D.; DU YAN, S.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 12, p. 1615-1625, 2002.

STEVEN, A.; BISHER, M.; ROOP, D.; STEINERT, P. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin—two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. **Journal of structural biology**, v. 104, n. 1-3, p. 150-162, 1990.

STURM, R. GSTP1 and MC1R in melanoma susceptibility. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 6, p. 1155-1156, 2012.

SUN, J.; SIMON, S. The melting behavior of aluminum nanoparticles. **Thermochimica acta**, v. 463, n. 1, p. 32-40, 2007.

TESKAČ, K.; KRISTL, J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 61-69, 2010.

TREUEL, L.; JIANG, X.; NIENHAUS, G. U. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 10, n. 82, p. 20120939, 2013.

ULRICH, M.; KRUEGER-CORCORAN, D.; ROEWERT-HUBER, J.; STERRY, W.; STOCKFLETH, E.; ASTNER, S. Reflectance confocal microscopy for noninvasive monitoring of therapy and detection of subclinical actinic keratoses. **Dermatology**, v. 220, n. 1, p. 15-24, 2009.

ÜNER, M.; YENER, G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. **International journal of nanomedicine**, v. 2, n. 3, p. 289, 2007.

VAGHASIYA, H.; KUMAR, A.; SAWANT, K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 49, n. 2, p. 311-322, 2013.

VALENTE, V.; SERAFIM, R. B.; DE OLIVEIRA, L. C.; ADORNI, F. S.; TORRIERI, R.; DA CUNHA TIRAPELLI, D. P.; ESPREAFICO, E. M.; OBA-SHINJO, S. M.; MARIE, S. K. N.; PACO-LARSON, M. L. Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) levels is correlated with glioblastoma cells survival. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62200, 2013.

VAN LUYN, M.; VAN WACHEM, P.; DAMINK, L. O.; DIJKSTRA, P.; FEIJEN, J.; NIEUWENHUIS, P. Secondary cytotoxicity of cross-linked dermal sheep collagens during repeated exposure to human fibroblasts. **Biomaterials**, v. 13, n. 14, p. 1017-1024, 1992a.

VAN LUYN, M.; VAN WACHEM, P.; OLDE DAMINK, L.; DIJKSTRA, P.; FEIJEN, J.; NIEUWENHUIS, P. Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens. **Journal of biomedical materials research**, v. 26, n. 8, p. 1091-1110, 1992b.

VAZ, C. M.; DE GRAAF, L. A.; REIS, R. L.; CUNHA, A. M. In vitro degradation behaviour of biodegradable soy plastics: effects of crosslinking with glyoxal and thermal treatment. **Polymer Degradation and Stability**, v. 81, n. 1, p. 65-74, 2003.

VENUGOPAL, J.; PRABHAKARAN, M. P.; LOW, S.; CHOON, A. T.; DEEPIKA, G.; GIRI DEV, V.; RAMAKRISHNA, S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. **Curr Pharm Des.**, v. 15, n. 15, p. 1799-1808, 2009.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

VINA, J.; BORRAS, C.; MIQUEL, J. Theories of ageing. **IUBMB life**, v. 59, n. 4, p. 249, 2007.

VINOGRADOV, S.; WEI, X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. **Nanomedicine**, v. 7, n. 4, p. 597-615, 2012.

VOLKOVOVA, K.; BILANICOVA, D.; BARTONOVA, A.; LETASIOVA, S.; DUSINSKA, M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. **Environ Health**, v. 28, n. 11, p. S1-S12, 2012.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug metabolism and disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

WANG, Y.; SU, D.-M.; WANG, R.-H.; LIU, Y.; WANG, H. Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. **Neuroscience**, v. 132, n. 1, p. 49-56, 2005.

WESTESEN, K.; BUNJES, H.; KOCH, M. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. **Journal of Controlled Release**, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1997.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A. M.; LI, Y.; WU, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 491-504, 2007.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A. M.; XUE, H. Y.; BABAKHANIAN, K.; WU, X. Y. A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 317, n. 3, p. 1372-1381, 2006.

XIA, T.; KOVOCHICH, M.; LIONG, M.; ZINK, J. I.; NEL, A. E. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. **ACS nano**, v. 2, n. 1, p. 85-96, 2007.

XU, Z.; CHEN, L.; GU, W.; GAO, Y.; LIN, L.; ZHANG, Z.; XI, Y.; LI, Y. The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. **Biomaterials**, v. 30, n. 2, p. 226-32, 2009.

YANG, X.-Y.; LI, Y.-X.; LI, M.; ZHANG, L.; FENG, L.-X.; ZHANG, N. Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. **Cancer Letters**, v. 334, n. 2, p. 338-345, 2013.

YANG, Z.; XIONG, H.-R. **Culture conditions and types of growth media for mammalian cells**. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 9535107887.

YANG, Z.; YANG, S.; MISNER, B. J.; CHIU, R.; LIU, F.; MEYSKENS, F. L. Nitric oxide initiates progression of human melanoma via a feedback loop mediated by apurinic/apurimidinic endonuclease-1/redox factor-1, which is inhibited by resveratrol. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 12, p. 3751-3760, 2008.

YINGCHONCHAROEN, P.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: what is available and what is yet to come. **Pharmacological reviews**, v. 68, n. 3, p. 701-787, 2016.

YOKOTA, M.; TOKUDOME, Y. The Effect of Glycation on Epidermal Lipid Content, Its Metabolism and Change in Barrier Function. **Skin pharmacology and physiology**, v. 29, n. 5, p. 231-242, 2016.

YONEDA, K.; STEINERT, P. M. Overexpression of human loricrin in transgenic mice produces a normal phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 22, p. 10754-10758, 1993.

YOO, J.-W.; CHAMBERS, E.; MITRAGOTRI, S. Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 21, p. 2298-2307, 2010.

ZAMBAUX, M.; BONNEAUX, F.; GREF, R.; MAINCENT, P.; DELLACHERIE, E.; ALONSO, M.; LABRUDE, P.; VIGNERON, C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. **Journal of Controlled Release**, v. 50, n. 1, p. 31-40, 1998.

ZAUNER, W.; FARROW, N. A.; HAINES, A. M. In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. **Journal of Controlled Release**, v. 71, n. 1, p. 39-51, 2001.

ZHANG, L. W.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. **Toxicological Sciences**, v. 110, n. 1, p. 138-155, 2009.

ZHANG, N.; SAID, A.; WISCHKE, C.; KRAL, V.; BRODWOLF, R.; VOLZ, P.; BOREHAM, A.; GERECKE, C.; LI, W.; NEFFE, A. T. Poly [acrylonitrile-co-(N-vinyl pyrrolidone)] nanoparticles—Composition-dependent skin penetration enhancement of a dye probe and biocompatibility. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 116, p. 66-75, 2017.

ZHANG, Z.; MICHNIAK-KOHN, B. B. Tissue engineered human skin equivalents. **Pharmaceutics**, v. 4, n. 1, p. 26-41, 2012.

ZHOU, S.; CUI, Z.; URBAN, J. Dead cell counts during serum cultivation are underestimated by the fluorescent live/dead assay. **Biotechnology journal**, v. 6, n. 5, p. 513-518, 2011.

ZIMMERMANN, E.; MÜLLER, R. H. Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions in artificial gastrointestinal media. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 203-210, 2001.

ZOSCHKE, C.; SCHILRREFF, P.; L ROMERO, E.; M BRANDNER, J.; SCHAFER-KORTING, M. Dendritic nanoparticles for cutaneous drug delivery-testing in human skin and reconstructed human skin. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 20, p. 2784-2800, 2015.

ZUR MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 149-155, 1998.

Anexos

Anexo A

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 68/2015

Interessada: ROBERTA BALANSIN RIGON

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Projeto: Nanopartículas lipídicas sólidas para incorporação do trasresveratrol no tratamento tópico do melanoma: avaliação in vitro e in vivo e elucidação dos mecanismos de internalização celular.

Parecer nº 112/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa "Nanopartículas lipídicas sólidas para incorporação do trasresveratrol no tratamento tópico do melanoma: avaliação in vitro e in vivo e elucidação dos mecanismos de internalização celular", apresentado pela pós-graduanda ROBERTA BALANSIN RIGON, sob orientação do Professor Doutor Marlus Chorilli, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MARÇO de 2016, em formulário para este fim.

Araraquara, 18 de DEZEMBRO de 2015.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA