



NANOPARTÍCULAS DE α -BISABOLOL EM MATRIZ DE ALGINATO-
QUITOSANA FUNCIONALIZADAS COM HIALURONIDASE PARA APLICAÇÃO
NO TRATAMENTO DE HIPERCROMIA PERIORBITAL

Nathália Viegas Busato

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Priscilla Vanessa Finotelli

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2019

NANOPARTÍCULAS DE α -BISABOOL EM MATRIZ DE ALGINATO-
QUITOSANA FUNCIONALIZADAS COM HIALURONIDASE PARA APLICAÇÃO
NO TRATAMENTO DE HIPERCROMIA PERIORBITAL

Nathália Viegas Busato

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D. Sc.

Prof^a. Priscilla Vanessa Finotelli, D. Sc.

Prof^a. Ariane de Jesus Sousa Batista, D. Sc.

Prof^a. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

FEVEREIRO DE 2019

Busato, Nathália Viegas

Nanopartículas de α -bisabolol em matriz de alginato-
quitosana funcionalizadas com hialuronidase para
aplicação no tratamento de hiperchromia periorbital/
Nathália Viegas Busato – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE,
2019.

XVI, 115 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Priscilla Vanessa Finotelli

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de
Engenharia Química, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 89 - 115.

1. Nanopartículas biopoliméricas. 2. Funcionalização
em biopolímeros 3. Adsorção em biopolímeros. 4.
Aplicação cosmética. I. Ferraz, Helen Conceição *et al.* II.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa
de Engenharia Química. III. Título.

“O futuro não é um lugar pra onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando. O caminho para ele não é encontrado, mas construído, e o ato de fazê-lo muda tanto o realizador quanto o destino.”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio e amor incondicional. Em especial aos meus pais, Josane e Valdir, à minha avó querida, dona Antônia, ao meu irmão Gabriel, aos meus pais de coração, Agnaldo e Luciene e Baltazar e Adeir e, com carinho especial, à minha irmã de coração Lívia, minha confidente de longas datas. Vocês sempre estiveram presentes nessa jornada, desde o meu primeiro dia de aula, e estarão para sempre no meu coração.

Ao Lucchesi, pelo amor, pelo companheirismo, pelos conselhos e por sempre transformar meu dia no melhor que ele possa ser. *Du bist mein sicherer Hafen.*

Aos meus amigos queridos, Henrique, Maria Rita, Carol, Guilherme, Giro, Bonita, Marina, Nai, Tinho, Dani, Luíza e vários outros, com quem pude compartilhar meus melhores momentos de graduação e mestrado. Bonita, sou muito grata por todas as vezes que pude contar com você para entregar e retirar as amostras no IMA.

Aos meus amigos da Piraquê, pelas risadas durante e ao fim do expediente, que se tornaram minha fonte de energia para os dias de trabalho e as noites de pesquisa.

Agradeço aos professores que tive durante minha vida acadêmica, cada um teve um papel importantíssimo na minha formação. Em especial às minhas orientadoras Helen e Priscilla e ao meu “consultor de nanopartículas” Marcel, por acreditarem, junto comigo, que toda essa jornada poderia ser trilhada, mesmo nas adversidades. Agradeço por cada minuto dedicado e pelos conhecimentos transmitidos.

À minha querida ex-orientadora, Patrícia, pela doação da substância ativa utilizada neste trabalho.

À equipe de técnicos e servidores que me ajudaram com análises, equipamentos e reagentes. Em especial à Luiza, pelo treinamento com o DLS e por todas as análises que pude realizar no laboratório IbqM/CCS/UFRJ. À Mariana, pelas análises de FTIR no IMA/UFRJ. À professora Mariana Monteiro, do Instituto de Nutrição da UFRJ, que gentilmente cedeu o reagente DPPH.

À CAPES pelo apoio financeiro durante a primeira etapa do mestrado.

Por fim, agradeço também a você que está lendo e prestigiando meu trabalho e a todos que, mesmo que não tenham sido citados aqui, estiveram presentes de alguma forma nesta jornada.

Muito obrigada!

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

NANOPARTÍCULAS DE α -BISABOLOL EM MATRIZ DE ALGINATO-QUITOSANA FUNCIONALIZADAS COM HIALURONIDASE PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE HIPERCROMIA PERIORBITAL

Nathália Viegas Busato

Fevereiro/2019

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Priscilla Vanessa Finotelli

Programa: Engenharia Química

As desordens pigmentárias são a terceira razão mais comum para a procura por consultas dermatológicas. Para minimizar os efeitos de algumas destas desordens, uma das estratégias adotadas é o uso de agentes despigmentantes tópicos. Portanto, dado que o objetivo deste trabalho é a obtenção de nanomateriais com aplicação no tratamento de hiperpigmentação periorbital, selecionou-se o ativo α -Bisabolol, que é um composto natural detentor de atividade antioxidante, sendo adequado para esta aplicação. Para garantir a liberação controlada do ativo e sua proteção, realizou-se o nanoencapsulamento do ativo em matriz de alginato-quitosana, que são dois biopolímeros biocompatíveis. Além disso, para facilitar a penetração do ativo na pele, optou-se ainda pela funcionalização das nanocápsulas (NCs) com a enzima hialuronidase, que é capaz de tornar a matriz extracelular da pele menos densa por meio da degradação do ácido hialurônico, o que hoje é um dos grandes desafios da indústria cosmética. Como resultado desta pesquisa, foram obtidas NCs com tamanho ideal para aplicação tópica e 98,5% de eficiência de encapsulamento. Elas permaneceram estáveis durante os 75 dias de ensaio e sua atividade antioxidante foi comprovada pelo método do DPPH. Por fim, foram funcionalizadas com a hialuronidase extraída de testículos bovinos, apresentando 30,3% de eficiência de funcionalização, $202,9 \pm 6,7$ nm de tamanho e $-15,93 \pm 1,49$ mV de potencial zeta, além da comprovada atividade antioxidante do ativo, o que as tornam interessantes para a utilização em cosmecêuticos para tratamento de hiperpigmentação periorbital.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

α -BISABOLOL-LOADED ALGINATE-CHITOSAN NANOPARTICLES
FUNCTIONALIZED WITH HYALURONIDASE FOR PERIORBITAL
HYPERCHROMY TREATMENT

Nathália Viegas Busato

February/2019

Advisors: Helen Conceição Ferraz

Priscilla Vanessa Finotelli

Department: Chemical Engineering

Pigmentary disorders are the third most common reason for looking for dermatological consultations. To minimize the effects of some of these disorders, one of the strategies adopted is the use of topical depigmenting agents. Therefore, since the objective of this work is to obtain nanomaterials with application in the treatment of periorbital hyperchromia, the active α -Bisabolol, which is a natural compound possessing antioxidant activity, was selected and suitable for this application. To guarantee the controlled release of the active and its protection, the nanoencapsulation of the active in matrix of alginato-chitosan, which are two biocompatible biopolymers, was carried out. In addition, to facilitate the penetration of the active in the skin, we also opted for the functionalization of the nanocapsules (NCs) with the enzyme hyaluronidase, which is able to make the extracellular matrix of the skin less dense through the degradation of hyaluronic acid, which today is one of the great challenges of the cosmetic industry. As a result of this research, NCs with ideal size for topical application and 98.5% of encapsulation efficiency were obtained. They remained stable during the 75 day trial and their antioxidant activity was confirmed by the DPPH method. Finally, they were functionalized with hyaluronidase extracted from bovine testicles, presenting 30.3% functionalization efficiency, 202.9 ± 6.7 nm in size and -15.93 ± 1.49 mV of zeta potential, in addition to the proven antioxidant activity, which makes them interesting for use in cosmeceuticals for the treatment of periorbital hyperchromia.

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I - Introdução	1
1.1 Considerações iniciais	1
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivos específicos.....	2
2. CAPÍTULO II - Revisão Bibliográfica	4
2.1 Hiperchromia periorbital	4
2.1.1 Prevenção e tratamento da hiperchromia periorbital	8
2.2 Nanotecnologia na indústria cosmética.....	17
2.2.1 Permeação cutânea e liberação controlada	22
2.2.2 Funcionalização com hialuronidase	28
2.3 Nanoencapsulamento	35
2.3.1 Princípios e vantagens	35
2.3.2 Gelificação Ionotrópica.....	37
2.3.3 α -bisabolol – Ativo encapsulado	38
2.3.4 Agentes encapsulantes	42
2.4 Caracterização de nanomateriais	45
2.5 Considerações gerais.....	47
3. CAPÍTULO III - Metodologia	48
3.1 Materiais	48
3.1.1 Reagentes e soluções	48
3.1.2 Equipamentos	50
3.2 Métodos.....	50
3.2.1 Síntese de nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana ..	50
3.2.2 Extração e purificação de hialuronidase proveniente de testículos bovinos	52

3.2.3	<i>Síntese de nanocápsulas de α-Bisabolol em matriz de alginato-quitosana funcionalizadas com hialuronidase</i>	57
3.3	Caracterizações	58
3.3.1	<i>Distribuição de tamanho de partículas e potencial zeta</i>	58
3.3.2	<i>Estudo de estabilidade físico-química</i>	59
3.3.3	<i>Análise de eficiência de encapsulamento</i>	59
3.3.4	<i>Ensaio de liberação in vitro de α-Bisabolol</i>	59
4.	CAPÍTULO IV - Resultados e Discussão	63
4.1	Caracterização do ativo - α-Bisabolol	63
4.2	Caracterização das nanocápsulas não-funcionalizadas	64
4.2.1	<i>Tamanho de partícula, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta</i>	64
4.2.2	<i>Estudo de estabilidade físico-química</i>	69
4.3	Avaliação da eficiência de encapsulamento (%EE)	71
4.4	Avaliação das interações casca-núcleo	72
4.5	Ensaio de liberação in vitro do ativo encapsulado	73
4.6	Avaliação in vitro da atividade antioxidante do ativo puro e do ativo encapsulado	76
4.7	Caracterização da hialuronidase extraída de testículos bovinos	79
4.7.1	<i>Avaliação de dosagem de proteína</i>	79
4.7.2	<i>Avaliação de atividade enzimática</i>	81
4.8	Caracterização das nanocápsulas funcionalizadas	83
4.8.1	<i>Estratégia 1 – Adição de hialuronidase após etapa de emulsificação</i>	83
4.8.2	<i>Estratégia 2 – Adição de hialuronidase e quitosana simultaneamente</i>	84
4.8.3	<i>Estratégia 3 – Adsorção de hialuronidase na superfície das NCs</i>	85
5.	CAPÍTULO V - Conclusões e Sugestões	87
5.1	Conclusões	87
5.2	Sugestões para trabalhos futuros	88

6. CAPÍTULO VI - Referências Bibliográficas 89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aplicações da nantecnologia. Fonte: MOTTA (2009).....	17
Figura 2: Modelagem 3D de sistemas nanoestruturados: (a) lipossoma; (b) nanoemulsão; (c) nanopartícula lipídica sólida; (d) carreador lipídico nanoestruturado (niossoma); (e) nanocápsula e; (f) nanoesfera). Fonte: Adaptado de OLIVEIRA <i>et al.</i> , (2015).....	21
Figura 3: Representação esquemática da estrutura da pele. Fonte: Adaptada por STOCCO (2016).	22
Figura 4: Vias de permeação de formulação tópica na pele. Adaptado de: BOLZIGER <i>et al.</i> (2012).	24
Figura 5: Estrutura de uma nanocápsula funcionalizada. Fonte: Adaptado de FRANCISQUINE <i>et al.</i> (2014).	28
Figura 6: Estrutura do ácido hialurônico antes de clivagem (a) e do produto após a clivagem (b) através da ação da hialuronidase do tipo testicular. Fonte: Adaptado de GONÇALVES (2007).	33
Figura 7: Representação esquemática da estrutura “caixa de ovos” do alginato reticulado. Adaptado de DESTRUDEL <i>et al.</i> (2017).	37
Figura 8: Estrutura terpênica do α -(-)-Bisabolol	40
Figura 9: Estrutura química do alginato de sódio (SOUZA <i>et al.</i> , 2008).....	43
Figura 10: Estrutura química da quitosana (LARANJEIRA e DE FÁVERE, 2009).....	43
Figura 11: Aparato experimental para síntese das nanopartículas	51
Figura 12: Fluxograma do procedimento de extração e purificação da enzima hialuronidase de testículos bovinos	52
Figura 13: (a) Testículo bovino; (b) Testículo bovino sem o epidídimo; (c) Epidídimo	53
Figura 14: Estratégias adotadas para a funcionalização das nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana com hialuronidase	57
Figura 15: Espectro de massas do (-)- α -Bisabolol	63
Figura 16: Espectro no infravermelho do α -Bisabolol	64
Figura 17: Produto obtido a partir da técnica de encapsulamento por gelificação ionotrópica (a) controle (sem ativo) e (b) com ativo.	65
Figura 18: Distribuição de tamanho das nanopartículas sem o ativo (controle)	66
Figura 19: Distribuição de tamanho das nanocápsulas com o ativo.....	66
Figura 20: Observação do diâmetro médio de partícula das amostras sem ativo e com ativo durante 75 dias e a 4 e 25 °C.	69

Figura 21: Observação do potencial zeta das amostras sem ativo e com ativo durante 75 dias e a 4 e 25 °C em pH 6,0.	70
Figura 22: Curva de calibração para análise de eficiência de encapsulamento de α -Bisabolol.....	71
Figura 23: Espectros de ATR/FTIR de (a) α -Bisabolol, (b) nanopartículas sem o ativo e (c) nanocápsulas com o ativo	72
Figura 24: Ensaio de liberação do ativo encapsulado em agitador do tipo “shaker”. (a) Teste 1 – pH 7,2; (b) Teste 2 – pH 5,5.	74
Figura 25: Curva de Inibição <i>versus</i> Concentração de α -Bisabolol antes do encapsulamento para avaliação de atividade antioxidante	77
Figura 26: Curva de Inibição <i>versus</i> Concentração de α -Bisabolol após o encapsulamento para avaliação de atividade antioxidante	77
Figura 27: Curva de calibração para avaliação de dosagem de proteína.....	79
Figura 28: Cinética de adsorção das proteínas contaminantes em hidroxiapatita	80
Figura 29: Curva de calibração para avaliação de atividade enzimática da hialuronidase	81
Figura 30: Distribuição de tamanho de partículas obtida para a Estratégia 1.	83
Figura 31: Distribuição de tamanho de partículas obtida para a Estratégia 2.	84
Figura 32: Distribuição de tamanho de partículas obtida para a Estratégia 3.	85
Figura 33: Cinética de adsorção de hialuronidase em nanocápsulas de bisabolol em matriz de alginato-quitosana.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Encapsulamento de óleos essenciais para fins medicinais e cosméticos.....	39
Tabela 2: Curva de calibração para teste enzimático	56
Tabela 3: Condições de ensaio de liberação <i>in vitro</i> de α -Bisabolol.....	60
Tabela 4: Diâmetro médio de partícula, IP e potencial zeta das nanoformulações	67
Tabela 5: Concentração de α -Bisabolol necessária para reduzir em 50% de DPPH.....	78
Tabela 6: Atividade enzimática da hialuronidase antes e após purificação	82

NOMENCLATURA

ABTS•+	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> - Reflexão Total Atenuada
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> - Albumina do Soro Bovino
CCS	Centro de Ciências da Saúde da UFRJ
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> – Espalhamento de luz dinâmico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> - Calorimetria Diferencial de Varredura
EtOH	Etanol
FRAP	<i>Ferric-Reducing Ability of Plasma</i>
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i> - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GRIFIT	Grupo Interdisciplinar de Fenômenos Interfaciais
HA	Ácido Hialurônico
HPO	Hiperpigmentação Periorbital
IMA	Instituto de Macromoléculas
IV	Infravermelho
LABNANO	Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional
LAPIN	Laboratório de Apoio Instrumental
LbL	<i>Layer by Layer</i> – Camada por Camada
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
NC	Nanocápsula
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Tampão Fosfato-Salino
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
RESS	<i>Rapid Expansion of Supercritical Solution</i> - Rápida Expansão de Solução Supercrítica
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TRAP	Total Radical - Trapping Antioxidant Parameter
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UV-visível	Espectroscopia de absorção no UV-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

ζ	Potencial zeta (mV)
Abs	Absorbância
Dp	Diâmetro médio de partícula (nm)
EE	Eficiência de Encapsulamento (%)
IC ₅₀	Concentração capaz de reduzir 50% das moléculas de DPPH
IP	Índice de Polidispersão
T	Transmitância (%)
U	Atividade enzimática
λ	Comprimento de onda (nm)

CAPÍTULO I

Introdução

1.1 Considerações iniciais

Atualmente, em um mercado extremamente competitivo, vários setores industriais como o alimentício, o farmacêutico e o cosmético estão investindo em produtos e processos diferenciados e inovadores, aliados a um crescente avanço científico, principalmente na área de nanotecnologia. Segundo o relatório "*World Cosmetics Market - Opportunities and Forecasts, 2014-2022*" da *Research and Markets*, o mercado de produtos cosméticos vai movimentar 430 bilhões de dólares entre os anos de 2016 e 2022 (BUSINESS WIRE, 2017), sendo a maior parte (36%) referente a produtos para a pele (*skincare*) (L'ORÉAL, 2016). Especificamente sobre o mercado de produtos para a pele, o relatório "*Cosmetic Skin Care Market: Global Industry Analysis, Trends, Market Size e Forecasts to 2023*" da empresa *Research and Markets* prevê um crescimento entre 4,7 % e 5,3 % entre 2017 e 2023, impulsionado principalmente por fatores como o aumento na demanda de cosméticos a base de ativos naturais e de investimentos em produtos de cuidado pessoal (BUSINESS WIRE, 2017).

As desordens pigmentárias são a terceira razão mais comum para a procura por consultas dermatológicas (SBD, 2018). Para minimizar os efeitos de algumas destas desordens, uma das estratégias adotadas é o uso de agentes despigmentantes tópicos (PILKINGTON *et al.*, 2015). Um exemplo de produtos naturais de grande interesse industrial são os óleos essenciais, extraídos de plantas aromáticas e detentores de atividades biológicas diversas, como a atividade antioxidante, por exemplo (MAYAUD *et al.*, 2008), o que o torna sua aplicação interessante para o tratamento da hiperpigmentação periorbital, como será discutido no decorrer deste trabalho. O encapsulamento dessas substâncias em biopolímeros traz diversas vantagens, como sua proteção ao ambiente externo (temperatura, pH, luz e oxidação), o aumento de sua eficácia e biodisponibilidade, sua liberação de forma controlada, a potencialização de suas atividades biológicas e uma maior penetração cutânea até a epiderme (AMMALA, 2013), sendo esse um dos maiores

desafios da indústria cosmética atualmente, visto que a camada mais externa da pele, o estrato córneo, é formada por uma matriz lipídica altamente impermeável.

Neste contexto, a funcionalização, ou seja, o ancoramento de substâncias à superfície das partículas por meio de seus grupos funcionais, pode ser um meio de aumentar a penetração cutânea. Um exemplo disso é a funcionalização com a enzima hialuronidase, que é capaz de tornar a matriz extracelular menos densa e facilitar a penetração das nanocápsulas, visto que esta enzima age por despolimerização do ácido hialurônico, componente essencial da matriz extracelular (LAUGIER *et al.*, 2000).

Sendo assim, este trabalho consistiu em sintetizar e caracterizar nanocápsulas de alginato-quitosana funcionalizadas com hialuronidase contendo α -Bisabolol, a fim de analisar sua atividade antioxidante, de forma a aplicá-las em formulações para tratamento de hiperpigmentação periorbital (olheiras). Para tal, buscou-se sintetizá-las e caracterizá-las quanto sua morfologia, estrutura química e liberação do ativo. Em vista disso, contou-se com o suporte dos seguintes laboratórios: GRIFIT (PEQ/COPPE/UFRJ), Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional (FF/CCS/UFRJ), Laboratório de Agregação de Proteínas e Amilóidoses (IBqM/CCS/UFRJ) e LAPIN 1 (IMA/CCS/UFRJ).

1.2 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização de nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana funcionalizadas com hialuronidase, bem como avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do ativo associado ao sistema nanocarreador.

1.2.1 Objetivos específicos

- Seleção de biopolímeros e estratégias de encapsulamento adequadas ao α -Bisabolol;
- Preparo e caracterização das nanocápsulas formadas;
- Avaliação da eficiência de encapsulamento e da liberação do ativo;
- Extração da hialuronidase bovina e funcionalização das nanocápsulas com esta enzima;

- Avaliação da atividade antioxidante, para futura aplicação no tratamento de hiperchromia periorbital (olheiras).

Capítulo II

Revisão Bibliográfica

2.1 Hiperchromia periorbital

A pigmentação da pele consiste na combinação de alguns fatores, como a condição da epiderme e a quantidade de pigmentos existentes nela. A melanina e a hemoglobina são os principais cromóforos presentes na pele humana e seu acúmulo promove alterações em sua coloração (YOUNG, 1997). A melanina é um pigmento endógeno, originado a partir da oxidação da tirosina pela enzima tirosinase, responsável pela reação de oxidação de fenóis em animais e plantas. Neste processo, a tirosina se transforma em diidroxifenilalanina (DOPA) dentro dos melanócitos presentes na camada basal da epiderme. Os melanócitos, juntamente com os queratinócitos e as células de Langerhans, formam uma unidade melanocitária, onde ocorre a melanogênese. A tirosina polimerizada deposita-se em melanosomas (vesículas), que se deslocam através dos prolongamentos citoplasmáticos dos melanócitos, sendo transferidos para os queratinócitos através de um processo de secreção. Os principais fatores que interferem na síntese da melanina são os de origem genética e hormonal e a ação dos raios ultravioleta. Durante este processo são formados dois tipos de melanina, a eumelanina e a feomelanina. A proporção entre as duas determina a cor natural da pele e o bronzeado produzido pela exposição solar. Desta forma, a pigmentação da pele depende da natureza química da melanina, da atividade da tirosinase nos melanócitos e da transferência da melanina aos queratinócitos vizinhos (GONCHOROSKI e CORRÊA, 2005).

Considerando a importância que a imagem pessoal exerce sobre o bem-estar das pessoas, tem se tornado cada vez mais comum a aplicação de fármacos com o objetivo de obter uma ação curativa ou atender a apelos estéticos. Por produzirem um resultado estético desagradável, as discromias são alvos de grande preocupação. Elas são responsáveis por manchas hipopigmentadas (mais claras) ou hiperpigmentadas (mais escuras) (NAGARAJ *et al.*, 2008).

Hiperpigmentação

As hiperpigmentações são um grupo de doenças que, em sua maioria, são decorrentes da produção exagerada de melanina, geralmente causada pelo estímulo dos melanócitos por fatores internos ou externos. A formação de manchas ocorre quando há acúmulo de melanina em excesso em locais específicos (NAGARAJ *et al.*, 2008). As desordens pigmentárias são amplamente estudadas, visto que são a terceira razão mais comum para a procura por consultas dermatológicas, principalmente para pessoas entre 40 e 54 anos (SBD, 2018). A seguir são apresentados alguns tipos de desordens hiperpigmentárias mais comuns.

i) Melasma

Também conhecido como “máscara da gravidez”, apresenta-se como uma mancha lisa, simétrica, uniformemente pigmentada, de coloração castanha, e aparece mais comumente em regiões onde há maior exposição ao sol, principalmente na região do rosto. Cerca de 90% das pessoas afetadas são mulheres e o melasma ocorre frequentemente quando os níveis hormonais femininos estão altos (SANCHEZ *et al.*, 1981; VASHI e KUNDU, 2013), como nos casos de gravidez, uso de anticoncepcionais, desordens endócrinas e tratamentos hormonais (PÉREZ *et al.*, 1983; JANG *et al.*, 2010). Durante a exposição ao sol, diversas reações físicas ocorrem, iniciadas por interações celulares entre queratinócitos, mastócitos e fibroblastos, levando ao aparecimento de melasmas (KANG e ORTONNE, 2010; SHIN *et al.*, 2012).

A estratégia principal para tratar o melasma é diminuir a proliferação de melanócitos, inibir a formação de melanossomas e promover sua degradação (CESTARI *et al.*, 2009). Para isso, algumas substâncias de uso tópico são comumente utilizadas, como a hidroquinona, o ácido retinóico e o ácido glicólico, por exemplo (RAJARATNAM *et al.*, 2010).

ii) Efélides

Popularmente conhecidas como “sardas”, as efélides são pequenas máculas, de coloração castanho-amarelado, que se encontram distribuídas irregularmente pela pele,

principalmente nas áreas mais expostas à radiação solar. São o resultado do aumento da melanogênese foto-induzida e transporte de um maior número de melanossomas completamente melanizados a partir dos melanócitos em direção aos queratinócitos. Podem perder sua coloração ou até mesmo desaparecer ao longo do tempo, com o envelhecimento ou com a descontinuação da exposição solar (VASHI e KUNDU, 2013).

iii. Lentigos

Os lentigos são desordens hiperpigmentárias encontradas em cerca de 90% da população branca, principalmente em pessoas com idade superior a 60 anos, aumentando com o avançar da idade. São máculas com formatos redondos, ovais ou irregulares, de 2 a 3 mm, e aparecem geralmente em áreas de maior exposição ao sol (VASHI e KUNDU, 2013).

iv. Hiperpigmentação pós-inflamatória

São manchas escuras, causadas por respostas normais do organismo após a regressão de algum tipo de doença de pele, como acne, dermatite atópica, dermatite alérgica de contato, psoríase, dentre outras (CHAN *et al.*, 2007; GRIMES, 2009). Elas podem ocorrer tanto ao nível da epiderme, onde há um aumento da produção e transferência da melanina para os queratinócitos, quanto ao nível da derme, onde a membrana basal é danificada e a melanina entra na derme e, posteriormente, é fagocitada por melanófagos (GONCHOROSKI e CORRÊA, 2005; VASHI e KUNDU, 2013).

v. Hiperchromia periorbital

A hiperchromia periorbital, conhecida popularmente como “olheira”, também é denominada como hiperpigmentação palpebral, melanose periorbital, melanose infraorbital, hiperchromia cutânea idiopática da região orbital (HCIR) e hiperpigmentação periorbital (HPO). É frequentemente relacionada a diversas causas, primárias ou secundárias, e ocorre em ambos os sexos, porém com maior frequência no sexo feminino (TAYLOR, 2003; FREITAG e CESTARI, 2007; ROBERTS, 2014).

A hiperpigmentação periorbital pode ser associada a diversos fatores etiológicos, como deposição de melanina dérmica, hiperpigmentação pós-inflamatória, vasculatura superficial, edema periorbital, dentre outros (TAYLOR, 2003; FREITAG e CESTARI, 2007). Pode ser causada por diversos fatores, envolvendo fatores intrínsecos, determinados pela genética do indivíduo, e fatores extrínsecos, como a exposição solar, o tabagismo, o alcoolismo, a privação do sono, o uso de contraceptivos orais, o uso de lentes de contato ou ingestão excessiva de refrigerantes ou bebidas com cafeína (GENDLER, 2005; VASHI e KUNDU, 2013). A tendência genética, a exposição ao sol e a idade avançada são as principais causas (GENDLER, 2005). Indivíduos com alergia a substâncias transportadas pelo ar também tendem a desenvolver esse tipo de desordem, devido ao hábito de coçar excessivamente a região ao redor dos olhos, o que promove a pigmentação pós-inflamatória. As lesões variam de intensidade de acordo com a espessura da pele, o depósito de gordura infraorbital e a perda de tecido subcutâneo (TAYLOR, 2003; GENDLER, 2005; ROH e CHUNG, 2009).

Embora não exista epidemiologia abrangente, as mulheres podem ser afetadas com mais frequência do que os homens, devido a fatores hormonais. A observação clínica é geralmente suficiente para determinar a causa primária da hiperpigmentação periorbital. Algumas das doenças que podem contribuir para olheiras escuras são distúrbios do coração, tireóide, rins ou fígado; distúrbios sanguíneos hereditários; deficiência de vitamina K; Doença de Addison ou condições circulatórias que causam retenção excessiva de líquidos (GENDLER, 2005).

A hiperpigmentação periorbital pode apresentar as seguintes características:

- Depósitos difusos e concentrados de melanina;
- Vasculatura subcutânea excessiva ou superficial;
- Sombras causadas por gordura orbital pseudo-referenciada.

Esta desordem pigmentar geralmente aparece como uma faixa curva de pele de coloração acastanhada ou azulada, aproximando-se da forma da borda orbital inferior subjacente do olho. A melanina epidérmica tem coloração marrom e a melanina dérmica é azul ou acinzentada. Para distinguir entre a deposição de melanina dérmica e epidérmica, pode-se utilizar o exame da lâmpada de madeira (GENDLER, 2005).

A estrutura facial também pode afetar a aparência das olheiras. Gestos expressivos, como franzir a testa, reposicionam os músculos e a pele na região periorbitária, alterando o padrão de luz no rosto e, muitas vezes, enfatizando as sombras escuras. Da mesma forma, a estrutura óssea facial pode influenciar a maneira como a luz é dispersada pela face (GENDLER, 2005). A pele da região ao redor dos olhos é a mais fina de todo o corpo humano, com 0,2 mm de espessura, em média (PILKINGTON *et al.*, 2015). Devido a esta característica, essa região tende a ser mais vulnerável ao ambiente externo.

2.1.1 Prevenção e tratamento da hiperpigmentação periorbital

De modo a combater a hiperpigmentação, alguns dos cuidados que devem ser tomados são a utilização regular de protetor solar UVA e UVB e evitar exposições solares prolongadas. A radiação ultravioleta oxida os lipídios da pele e desencadeia a produção de radicais livres, sendo responsável por grande parte dos danos que ocorrem ao nível do DNA. Estes danos surgem devido ao aparecimento de inflamações, interrompendo a comunicação celular e levando à modificação da expressão dos genes em resposta ao estresse oxidativo, enfraquecendo assim a resposta imune da pele (FLOR *et al.*, 2007).

Dentre os tipos de tratamento existentes para a hiperpigmentação periorbital, podem-se citar os agentes tópicos, peelings químicos, botox, terapia a laser, cirurgia, curas alternativas, dentre outros. No Quadro 1 são comparados alguns destes tipos de tratamento.

Quadro 1: Tipos de tratamento para hiperpigmentação periorbital

Tratamento	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Agentes despigmentantes tópicos	Substâncias ativas utilizadas topicamente	Baixo risco; pode ser combinado com cirurgia e tratamento a laser	Podem desencadear dermatite de contato alérgica ou irritante
Formulações cosméticas sem prescrição	Vitaminas e compostos botânicos	Baixo risco e capazes de conferir à pele uma textura macia	Risco de irritação; baixa eficiência e poucos estudos clínicos
Peeling químico	Procedimento onde são usados diversos ácidos (tricloroacético, glicólico e salicílico)	A melanina epidérmica responde bem a este tratamento; melhora a textura da pele; despigmenta manchas e atenua rugas finas	Peelings químicos profundos não são recomendáveis, devido ao alto risco de alterações pigmentares profundas
Dermoabrasão	Consiste em “desgastar” mecanicamente a camada superior da epideme	Remoção de cicatrizes, rugas de média profundidade e manchas de pigmentação	É um método mais invasivo que o peeling químico
Laser ablativo	Promove obstrução superficial cutânea da pele	Pode estimular a produção de colágeno, clarear e esticar a pele, com resultados duradouros	Dor, recuperação prolongada, risco de causar cicatrizes e alterações pigmentares
Laser não-ablativo	Utiliza luz pulsada intensa	Pode estimular a produção de colágeno, clarear e esticar a pele, produzindo resultados duradouros.	Contusões e, ocasionalmente, hiperpigmentação
Cirurgia	Remoção ou reposicionamento de gordura periorbital e/ou excesso de pele	Suavização dos contornos da pálpebra inferior	Recuperação prolongada, risco de cicatrizes e deformação do contorno

Fontes: (GENDLER, 2005; DERMATOLOGYINC, 2009; VASHI e KUNDU, 2013; BUCAY e DAY, 2013).

Agentes despigmentantes tópicos

Os agentes despigmentantes tópicos são produtos que atuam em regiões específicas do corpo, por meio de diversos mecanismos, sendo apresentados sob diferentes formas farmacêuticas. Apesar de atuarem por diferentes mecanismos, todos eles estão ligados à transferência ou produção de pigmentos, dentre eles podem-se citar a destruição seletiva dos melanócitos, a inibição da síntese de tirosina, da formação de melanossomas e de melanina, a degradação de queratinócitos e a interferência no transporte dos grânulos de melanina (GONCHOROSKI e CORRÊA, 2005).

Apesar de atenuarem ou até serem capazes de fazer com que determinados tipos de manchas desapareçam, muitos compostos com ação despigmentante apresentam-se como substâncias irritantes e podem promover a descamação da pele, além de apresentarem resultados nem sempre imediatos (FINKEL *et al.*, 2007; VASHI e KUNDU, 2013).

Segundo PERETTI *et al.* (2015), os agentes despigmentantes tópicos podem agir na pele por diferentes mecanismos de ação:

- Inibidores competitivos da tirosinase: Estas substâncias se ligam à tirosinase, cuja enzima contém cobre e é responsável por catalisar a oxidação de fenóis, produzindo melanina, impedindo a ligação com a tirosina (substrato). Além disso, para ser classificada desta forma, esta substância precisa ser sequestrante de cobre e não metabolizável, interferindo na síntese da melanina por inativação;
- Inibidores não competitivos da tirosinase: Esta classe de substâncias se liga ao conjunto enzima-substrato (tirosinase-tirosina);
- Seletivos: São substâncias que descaracterizam ou destroem os melanócitos. Os agentes oxidantes, por serem capazes de diminuir a quantidade de oxigênio disponível nestas células, são capazes de alterar reações de fosforilação oxidativa, causando sua degradação;
- Interferência no transporte da melanina por meio da inibição da fagocitose;
- Alterações da melanina na forma oxidada para a forma reduzida, de cor mais clara.

A seguir são apresentados alguns dos agentes despigmentantes tópicos mais utilizados e estudados na literatura.

i) Ácido kójico

O ácido kójico (5-hidroxi-2-hidroximetil-4-pirona) é um composto obtido a partir da fermentação do arroz por fungos da espécie *Aspergillus orizae* e *Flavus tamarii* e por bactérias da espécie *Aspergillus sporulantes*. Sua ação despigmentante se dá a partir da inibição da tirosinase através da quelação do íon cobre nos sítios ativos da enzima, inibindo assim a formação da melanina (GONCHOROSKI e CORRÊA, 2005; VASHI e KUNDU, 2013). Uma das desvantagens da utilização do ácido kójico é por ser um composto instável (BUCAY e DAY, 2013).

ii) Ácido glicólico

O ácido glicólico, encontrado na uva, no abacaxi, na beterraba, na alcachofra e na cana-de-açúcar, atua reduzindo a hiperpigmentação, sem afetar diretamente a melanina. Além disso, apresenta efeitos de plasticidade e hidratação quando administrado em baixas concentrações e, em altas concentrações, possui efeito esfoliante (GONCHOROSKI e CORRÊA, 2005; VASHI e KUNDU, 2013). Porém, aplicações tópicas com alta concentração de ácido glicólico (50 a 80%) podem causar epidermólise (ROH e CHUNG, 2009).

iii) Hidroquinona

A hidroquinona (1-4-dihidroxibenzeno) é um dos agentes despigmentantes mais difundidos atualmente. Sua atuação se dá a partir da diminuição da atividade proliferativa dos melanócitos, pois inibe a síntese de DNA e RNA no seu interior. Além disso, interfere na formação e degradação de melanossomas e na destruição de melanócitos e atua na inibição da tirosinase, impedindo que a tirosina seja convertida em DOPA (diidrofenilalanina) e que a DOPA seja convertida em dopaquinona (GONCHOROSKI e CORRÊA, 2005; VASHI e KUNDU, 2013). Apesar de ser uma das opções de agente despigmentante mais utilizado, terapias utilizando hidroquinona são muito lentas e com resultados pouco perceptíveis (GENDLER, 2005).

iv) Retinóides (ácido retinóico)

O ácido retinóico (vitamina A ou tretinóina) é uma substância lipossolúvel, transportada por uma proteína específica, a CRABP, cuja concentração é maior na epiderme. Ele atua reduzindo a hiperpigmentação através da diminuição do tempo de

contato entre os queratinócitos e os melanócitos, o que promove uma perda rápida do pigmento disperso. Isto acontece pois o ácido retinóico tem efeito esfoliante e é capaz de dispersar a melanina dentro dos queratinócitos, o que facilita sua eliminação a partir do aumento do *turnover* das células epidérmicas (GONCHOROSKI e CORRÊA, 2005; VASHI e KUNDU, 2013). Alguns efeitos colaterais da utilização de ácido retinóico geralmente incluem o aparecimento de eritemas, irritações, descamações, ardor e queimação (KANG e ORTONNE, 2010).

v) Ácido azeláico

O ácido azeláico, ou ainda ácido nonadióico, é uma substância natural produzida pelo fungo *Pityrosporum ovale*, naturalmente encontrada no trigo. Trata-se de um ácido dicarboxílico com ação citotóxica e anti-proliferativa de melanócitos, atuando como inibidor competitivo da tirosinase. Este ácido é eficaz no tratamento do melasma e da hiperpigmentação pós-inflamatória (VASHI e KUNDU, 2013).

vi) Ácido ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico é um antioxidante solúvel em água, que atua na inibição da melanogênese, por meio da quelação dos íons cobre no sítio ativo da tirosinase, inibindo-a e reduzindo assim a formação da dopaquinona (VASHI e KUNDU, 2013). Além disso, o ácido ascórbico é muito importante na produção de colágeno (GEESIN *et al.*, 1988), visto que é um cofator essencial para a hidroxilação da prolina e da lisina, restaura a capacidade antioxidante da vitamina E, e é um potente inibidor de peroxidação lipídica (MCCAY, 1985; CHAN, 1993).

A vitamina C é capaz de neutralizar os radicais livres tanto intracelulares como extracelulares (COLVEN e PINNELL, 1996). Embora os seres humanos não sejam capazes de sintetizar vitamina C como a maioria dos animais e plantas, é o antioxidante mais abundante na pele humana. A vitamina C não apenas neutraliza os radicais livres, mas também doa elétrons e protege as estruturas intracelulares do estresse oxidativo (FARRIS, 1996). O maior desafio com a administração de vitamina C é a estabilidade do produto e a penetração adequada. Como o ácido ascórbico é solúvel em água, é propenso a oxidação em solução, resultando no subproduto ácido desidroascórbico (PINNELL *et al.*, 2001).

vii) Resveratrol

O resveratrol é uma substância com ação antioxidante forte (ZHENG *et al.*, 2012), com poder de inibição da tirosinase pela forma não competitiva (KIM *et al.*, 2002). Este composto pode ser obtido de forma sintética ou de forma natural, sendo extraído de parreiras de uvas tintas da região de Bordeaux (França) (NDIAYE *et al.*, 2011). Alguns exemplos de formulações cosméticas que contém resveratrol são: Regu®-Fade (DSM) e Vitisin® (ACTIchem) (IZARD, 2010).

Segundo a ACTIchem, em estudo *in vitro* realizado pela própria empresa, a formulação Vitisin® se mostrou mais eficiente na inibição da tirosinase do que o ácido kójico, na mesma concentração. Além disso, foi desenvolvido um creme para uso tópico contendo 3% de Vitisin® e foi testado por painelistas, que realizaram medidas colorimétricas durante os 56 dias de uso. Destes, 76% notaram clareamento na pele.

Porém, segundo estudos de FRANCO *et al.* (2012), apesar de inibir a tirosinase, o resveratrol não é capaz de inibir a síntese de melanina de uma forma que permita seu uso por si só como agente clareador em produtos cosméticos, somente em conjunto com outros ativos.

viii) Tocoferóis e tocotrienóis (Vitamina E)

A vitamina E é lipossolúvel e é capaz de reduzir o número de células advindas de queimaduras solares. O α -tocoferol, um dos componentes da vitamina E, é um antioxidante que protege as membranas celulares dos danos causados pela fosfolipase A, lisofosfolípídios e ácidos graxos (TREVITHICK *et al.*, 1992). Além disso, a vitamina E tem demonstrado ser capaz de inibir a metaloelastase de macrófagos humanos, uma metaloproteinase de matriz (MMP) que degrada a elastina (GENSLER e MAGDALENO, 1991).

No Quadro 2 são apresentados resumidamente alguns dos agentes despigmentantes tópicos e seus mecanismos de ação.

Quadro 2: Mecanismos de ação dos principais agentes despigmentantes tópicos

Mecanismo de ação	Agentes despigmentantes tópicos
Esfoliação do estrato córneo	Retinóides e alfa-hidroxiácidos
Degradação/diminuição da transferência de melanossomos	Hidroquinona, niacinamida e extratos de soja
Inibição da síntese de DOPA e dopaquinona	Ácido kójico e glabridina
Promoção da conversão de melanina em leucomelanina	Vitaminas C e E
Inibição não-seletiva de melanogênese	Corticosteróides e glabridina
Inibição de tirosinase	Hidroquinona, ácido azelaico, flavonoides, isoflavonas e resveratrol

Fonte: CESTARI *et al.* (2014).

Alguns exemplos de formulações para hiperpigmentação periorbital compostas por uma ou mais substâncias citadas anteriormente são: HydroPeptide Eye (Azure), Gloss Dual-Treatment Eye Area (Young Pharmaceuticals), CELFIX DNA iQuad Infusion Total Eye Complex (Precision MD), NeoStrata Skin Active Intensive Eye Therapy (Neostrata), Lumière Riche Bio-restorative Eye Balm (NEOCUTIS), ELASTIderm™ EYE Complete Complex™ Serum (Obagi Medical Products), Replenix® Eye Repair Cream (Topix Pharmaceuticals), dentre outros (BUCAY e DAY, 2013).

Pode-se notar que uma grande parte dos agentes despigmentantes tópicos possuem propriedades antioxidantes, sendo esta uma das razões para a seleção do α -bisabolol como ativo neste trabalho.

Os antioxidantes são substâncias que tem o papel de retardarem ou até mesmo evitarem o dano oxidativo causado pela presença das espécies reativas do oxigênio (EROs). As espécies reativas do oxigênio (ERO) são moléculas altamente instáveis e reativas, geradas a partir do oxigênio encontrado na pele após exposição à luz ultravioleta (BALIN e PRATT, 1989). Estas moléculas têm uma série de efeitos prejudiciais no

envelhecimento da pele, visto que são capazes de danificar o DNA, membranas celulares, proteínas e o colágeno (FARRIS, 2005). Os radicais livres também levam à inflamação, que é outro fator crucial no processo de envelhecimento (JOHNSON, 1986). O sistema de defesa antioxidante do nosso corpo inclui antioxidantes endógenos (enzimáticos e não enzimáticos) e antioxidantes exógenos. Existem muitas fontes exógenas que foram estudadas e demonstraram ter efeitos tópicos. No entanto, há uma escassez de estudos para agentes antioxidantes que foram utilizados em torno da pele periorbital especificamente.

A pele usa naturalmente uma variedade de antioxidantes que interagem em diferentes níveis de processos oxidativos para eliminar os radicais livres e as moléculas danificadas por oxidação. No entanto, a exposição excessiva aos raios UV, a fumaça do cigarro e outros poluentes atmosféricos causam um estresse oxidativo que ultrapassa esta defesa antioxidante natural da pele. A aplicação antioxidantes naturais e tópicos pode corrigir esse dano. Além disso, uma vez absorvidos, os antioxidantes não podem ser lavados, transpirados ou esfregados, dando proteção por vários dias. O desafio é saber quais produtos antioxidantes, em quais concentrações e em quais combinações aplicar (BURKE, 2009).

Existem atualmente diversas preparações comerciais de antioxidantes; no entanto, poucos são verdadeiramente eficazes. Os antioxidantes são, por natureza, moléculas bastante instáveis quando expostos ao oxigênio no ar. Também muitos produtos contêm derivados ésteres dos antioxidantes ou formas isoméricas não naturais que não podem ser absorvidas e metabolizadas pela pele. Além disso, a maioria das preparações contém concentrações tão baixas do antioxidante que, mesmo se a molécula correta fosse usada, não há proteção suficiente ou tratamento dos danos causados pelos radicais livres (BURKE, 2009).

Alguns dos desafios encontrados no desenvolvimento de formulações contendo antioxidantes são sua compatibilidade, sua estabilidade e seu grau de penetração cutânea. Deve-se garantir que os antioxidantes contidos na formulação não se neutralizem mutuamente. Em geral, os antioxidantes costumam ser mais estáveis em pHs ácidos (PINNELL, 2001; ZIELINSKI e PINNELL, 2007). Por serem muito instáveis, eles podem oxidar e se tornarem inativos antes de atingir o alvo. Além disso, para cumprirem os efeitos desejados, devem ser absorvidos pela pele, atingir o tecido alvo na forma ativa

e permanecer lá por tempo suficiente. Existem várias estratégias utilizadas pelos formuladores para aumentar a penetração de ativos tópicos. Por exemplo, as soluções de vitamina C devem ser formuladas a um pH de 3,5 ou inferior para que a vitamina C seja absorvida na pele; a este pH, a vitamina C é protonada e a molécula não carregada (PINNELL, 2001). Neste trabalho, a estratégia adotada foi a de nanoencapsulamento do ativo, que será detalhada no decorrer do capítulo.

Segurança no uso de cosméticos

Apesar de não estarem associados a sérios danos à saúde, é extremamente importante garantir a segurança e eficácia dos produtos cosméticos. Segundo ROMANOWSKI e SCHUELLER (1996), partindo do pressuposto que podem ser utilizados extensivamente durante longos períodos, é necessário realizar o controle de toxicidade dos produtos cosméticos e de suas matérias-primas, estando de acordo com a legislação para registro de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes.

Alguns dos principais ensaios biológicos realizados para avaliar a segurança de produtos cosméticos são os de sensibilidade de pele, irritação ocular, fototoxicidade, teste adjuvante de Freund e citotoxicidade (YAMAZAKI e SILVEIRA, 2010). O meio científico tem demonstrado uma forte tendência em aplicar a política dos 3 Rs, do inglês *Replace, Reduce e Refine* (Substituir, Reduzir, Refinar) para a realização destes testes, de forma a priorizar as metodologias *in vitro* e garantir a utilização dos modelos animais de forma adequada e humanitária, sem comprometer a qualidade do trabalho científico que está sendo executado (MARONA e LUCCHESI, 2003).

Dentre os animais empregadas nos ensaios de segurança de cosméticos, o macaco e o porco são as que apresentam maior semelhança fisiológica à espécie humana. Porém, por serem de difícil manuseio e de alto custo, não são tão utilizados como os clássicos animais de laboratório (ratos, camundongos, hamsters e coelhos) (AUBIN, 1994). O porco tem sido empregado em alguns ensaios que visam observar a eficácia de princípios ativos lipolíticos na pele, como o tiratricol, a cafeína e a hialuronidase (CHORILLI *et al.*, 2005), por ser um dos raros animais que possui um sebo de natureza glicerídica como o homem (AUBIN, 1994).

Em testes de irritação cutânea, os parâmetros estudados são a formação de eritemas, escaras e edemas após a aplicação do produto (PINTO *et al.*, 2003). Já os testes de citotoxicidade definem o potencial de degeneração ou morte celular provocado pelo ativo cosmético (DEMARCO *et al.*, 1998).

2.2 Nanotecnologia na indústria cosmética

A nanotecnologia é a ciência que trata a caracterização e o controle de matérias com dimensões nanométricas (ETHERIDGE *et al.*, 2013). Nanotecnologia refere-se ao uso de partículas em escala nanométrica, tipicamente variando de menos de 100 a 1000 nm (BAROLI 2010; MISHRA *et al.*, 2010). Seu princípio é que estes materiais em escala nanométrica apresentam propriedades físico-químicas características, diferentes dos materiais de escalas maiores (ROSSI-BERGMANN, 2008). Desta forma, a nanotecnologia se mostra como uma promissora ferramenta interdisciplinar, abrangendo diferentes campos do conhecimento (ALVES *et al.*, 2014), como pode ser observado na Figura 1.



Figura 1: Aplicações da nanotecnologia. Fonte: MOTTA (2009)

A aplicação desta tecnologia em cosméticos visa aumentar a eficácia dos produtos comercializados no mercado e o desenvolvimento de novos materiais. Por meio da nanotecnologia é possível, por exemplo, produzir partículas de tamanho nanométrico com a finalidade de melhorar o transporte de substâncias ativas dentro da derme (DAUDT *et al.*, 2013).

A primeira empresa a aplicar a nanotecnologia em seus cosméticos foi a L'Oréal, com a Lancôme, em 1955, desenvolvendo um creme antienvhecimento para a face, produzido com nanocápsulas de vitamina E. Já no Brasil, a pioneira foi O Boticário, em 2005, desenvolvendo um creme anti-sinais (BARIL *et al.*, 2012)

Segundo GOMES e DAMAZIO (2009), as nanoestruturas mais utilizadas em formulações cosméticas são:

- Lipossomas: são vesículas com formato esférico, formadas por bicamadas fosfolipídicas concêntricas e núcleo aquoso. Este tipo de vesícula é capaz de transportar ativos lipossolúveis em suas bicamadas e, simultaneamente, ativos hidrossolúveis em seu núcleo (CHEN e LANGER, 1998). Os lipossomas podem encapsular componentes ativos solúveis em água e lipídios (NIEMIEC *et al.*, 1995), ajudam a fixar os ingredientes ativos nas camadas mais externas da pele. Os lipossomas são incapazes de atravessar as estreitas vias intercelulares (menos de 30 nm) nas camadas externas da pele (TOUITOU, 2002). Alguns exemplos de cosméticos produzidos com lipossomas são: Advanced Night Repair Protective® (Estée Lauder), Capture® (Dior), Eryfotona® (ISDIN) e Revitalift® (L'oréal) (BECK *et al.*, 2011).

- Niossomas: são vesículas de lipídios sintéticas, de natureza não-iônica, formados por auto-montagem de agentes tensoativos não-iônicas em dispersão aquosa. Este tipo de partícula é mais estável e flexível que as lipossomas. Exemplo de cosmético produzido com niossomas: Niosome® (Lancôme) (SOUZA *et al.*, 2012).

- Microemulsões: são sistemas termodinamicamente estáveis, compostos por duas fases imiscíveis (oleosa e aquosa), que contêm um tensoativo e também pode conter um co-tensoativo, resultando em uma tensão interfacial extremamente baixa ($< 10^{-2}$ mN/m) (NASTITI *et al.*, 2017). Porém, as microemulsões podem causar irritação da pele ao romper a estrutura cristalina líquida do estrato córneo. A irritação da pele pode ser evitada se forem utilizados lipossomas, que são à prova d'água, não aderentes e facilmente difundíveis (CARLOTTI *et al.*, 2003).

- Nanoemulsões: ao contrário das microemulsões, as nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis. São compostas por duas fases imiscíveis (oleosa e aquosa), que contêm um tensoativo e também pode conter um co-tensoativo, com gotículas de tamanho entre 20 e 200 nanômetros (JAISWAL *et al.*, 2015).

- Nanopartículas lipídicas sólidas: são partículas tipicamente esféricas, com tamanhos entre 10 e 1000 nm e possuem uma matriz do núcleo sólido lipídico que pode solubilizar moléculas lipofílicas (BASAVARAJ, 2012). Alguns exemplos de cosméticos que contêm nanopartículas lipídicas sólidas são: Allure[®] (Chanel) e Creme Regenerador Intensivo[®] (Dr. Scholl) (MARÇALO, 2013).

- Nanopartículas poliméricas:

- Nanocápsulas: são sistemas nanovesiculares do tipo reservatório, com o ativo localizado no núcleo, rodeado por uma membrana polimérica (LETCHFORD e BURT, 2007; ANTON *et al.*, 2008; HAFNER *et al.*, 2014). O núcleo pode ser hidrofílico ou lipofílico, contendo um ativo sólido, líquido ou uma dispersão molecular. Além disso, dependendo de como foram sintetizadas, podem carregar um ativo em sua superfície mais externa ou reticulada em meio à matriz polimérica (RADTCHENKO *et al.*, 2002; KHOEE e YAGHOUBIAN, 2008). Uma de suas características fundamentais é o tamanho, que pode ir de 5 nm a 1000 nm, apesar de serem obtidas mais frequentemente numa faixa de 250 a 500 nm (QUINTANAR *et al.*, 1998), podendo ser afetado por diversas variáveis, como por exemplo a natureza e a concentração do ativo, a natureza, a concentração e o peso molecular do polímero, o pH, o surfactante utilizado, a velocidade de agitação, dentre outros (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). Alguns exemplos de cosméticos que contêm nanocápsulas são: Promordiale Intensive[®] e Hydrazen[®] (Lancôme) (DANA, 2011).

- Nanoesferas: são sistemas formados por matrizes poliméricas que, ao contrário das nanocápsulas, não possuem um núcleo diferenciado. Nesse tipo de nanopartícula, as substâncias ativas são encontradas, geralmente, distribuídas de forma homogênea no interior da matriz polimérica, sendo libertadas por difusão, podendo ainda encontrar-se adsorvidas à superfície da nanoesfera (GUTERRES, 2007, STEICHEN *et al.*, 2013). Um exemplo de produto cosmético contendo nanoesferas em sua formulação é o Sérum Vitamina C[®] (Dermare).

O Quadro 3 apresenta um resumo das vantagens e desvantagens de cada um dos sistemas descritos acima.

Quadro 3: Comparação entre os sistemas micro e nanoestruturados

Sistema	Vantagens	Desvantagens
Lipossomas e niossomas	Baixa toxicidade, biocompatíveis, capazes de encapsular ativos hidrofílicos e hidrofóbicos e são não-imunogênicos (TORRECILLA <i>et al.</i> , 2013)	Baixa estabilidade (TORRECILLA <i>et al.</i> , 2013)
Microemulsões e nanoemulsões	Aumentam a liberação e penetração de ativos hidrofílicos e lipofílicos (HUANG <i>et al.</i> , 2008). Melhoram a hidratação da pele e sua elasticidade. Também podem aumentar a permeabilidade de um ativo pouco solúvel (YILMAZ e BORCHERT, 2006).	Estabilidade influenciada por parâmetros ambientais (temperatura e pH), sendo necessário adicionar conservantes, antioxidantes e/ou sais tampão. Possuem elevada concentração de tensoativo e co-tensoativo (YILMAZ e BORCHERT, 2006).
Nanopartículas lipídicas sólidas	Atrativas para uso em protetores solares, visto que a matriz lipídica formada sobre a pele pode retardar a penetração do ativo, reduzindo o potencial tóxico de um produto convencional (XU e GUY, 2009).	Menor capacidade de manter o ativo encapsulado, podendo haver a formação de estruturas coloidais alternativas e instabilidade física durante o armazenamento ou administração, devido à complexidade do estado físico do lipídio (GUTERRES <i>et al.</i> , 2007).
Nanocápsulas e nanoesferas	Capazes de encapsular diferentes tipos de substâncias e promovem a proteção do ativo (TORRECILLA <i>et al.</i> , 2013)	Dependendo do polímero utilizado, podem ter certo grau de citotoxicidade (TORRECILLA <i>et al.</i> , 2013)

As nanopartículas proporcionam maior estabilidade a ingredientes ativos quimicamente instáveis, liberação controlada de ingredientes ativos, efeito de pigmento e melhor hidratação e proteção da pele através da formação de película na pele. Em comparação com lipossomas, a carga útil de substâncias lipofílicas por nanopartículas é muito maior. Devido à sua boa estabilidade física e compatibilidade com outros

ingredientes, nanopartículas podem ser adicionadas a formulações cosméticas existentes sem qualquer problema. (SIHMID e ZUELLI, 2005).

Os efeitos sobre a hidratação da pele e viscoelasticidade são critérios importantes durante o desenvolvimento de novas formulações cosméticas. O aumento da umidade da pele é devido à alta capacidade dos fosfolipídios que formam as nanopartículas se ligarem à água. Ao penetrarem nas camadas superiores do estrato córneo, as nanopartículas se fundem com os lipídios da pele e os ativos são liberados. Estas partículas formam um filme adesivo que leva a um efeito oclusivo na pele, o que promove a penetração de constituintes ativos (WISSING e MÜLLER, 2003).

Na Figura 2 é apresentada a modelagem virtual de alguns dos sistemas nanoestruturados existentes.

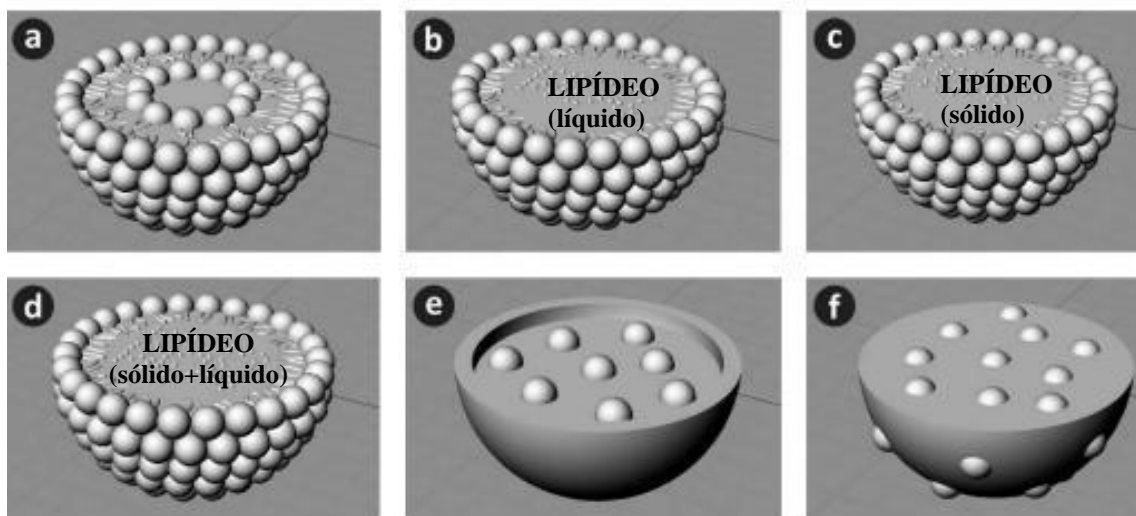


Figura 2: Modelagem 3D de sistemas nanoestruturados: (a) lipossoma; (b) nanoemulsão; (c) nanopartícula lipídica sólida; (d) carreador lipídico nanoestruturado (niossoma); (e) nanocápsula e; (f) nanoesfera). Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, (2015).

2.2.1 Permeação cutânea e liberação controlada

A pele, além de ser o maior órgão do corpo humano, é também o de maior importância estética. Ela representa aproximadamente 16% em massa do corpo humano e é composta por diversas camadas, distintas entre si, como pode ser observado na Figura 3. A camada mais externa é a epiderme, que atua na proteção contra influências do ambiente e é dividida em: estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal (STOCCO, 2016).

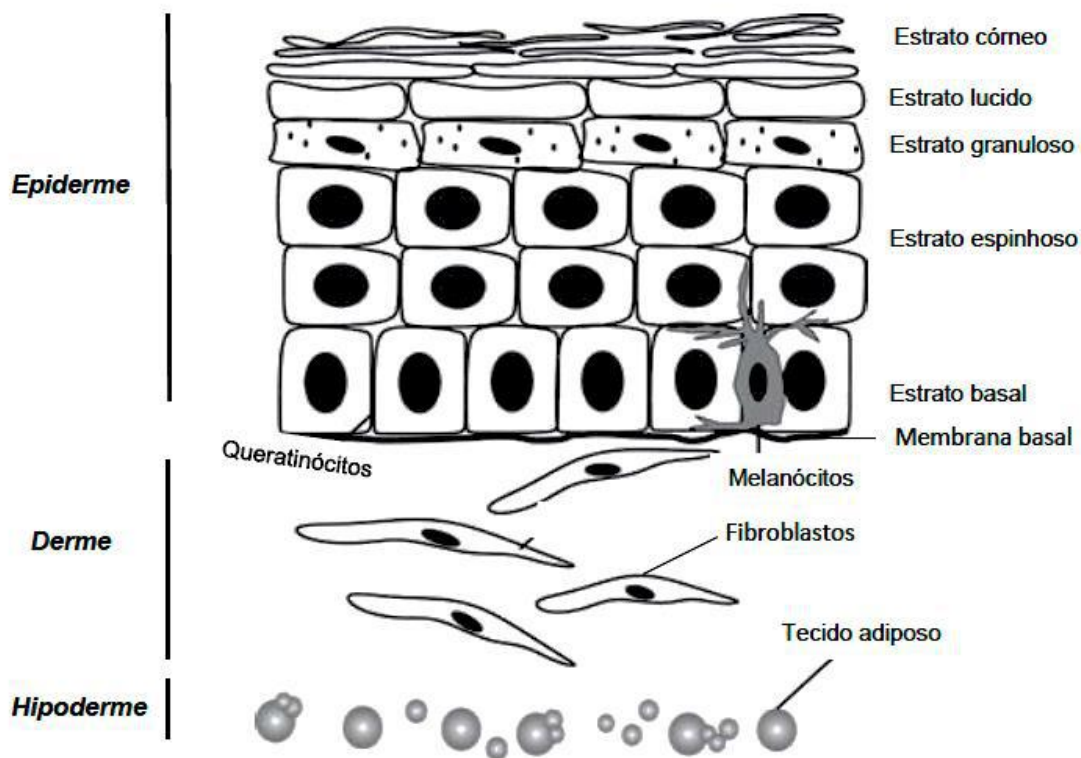


Figura 3: Representação esquemática da estrutura da pele. Fonte: Adaptada por STOCCO (2016).

O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme, formada por uma matriz lipídica, com espessura entre 10 a 20 μm , e composta principalmente por colesterol, ceramidas e ácidos graxos (ELIAS, 1983).

De acordo com BLANK e SCHEUPLEIN (1971), o estrato córneo tem uma natureza altamente impermeável, comparável a uma “embalagem plástica”, segundo os autores. Sendo assim, a permeabilidade através dessa camada, em particular para materiais hidrofílicos, continua sendo um grande desafio no transporte transdérmico de fármacos (AMMALA, 2013).

A distribuição de um ativo através da pele pode ser classificada em tópica e transdérmica. Um fármaco topicamente ativo destina-se a atuar localmente, enquanto a via transdérmica tem como objetivo a distribuição sistêmica. A robustez da barreira do estrato córneo impede a entrada de agentes terapêuticos grandes e hidrofílicos. Diversas pesquisas foram conduzidas para solucionar a dificuldade de distribuição de ativos através da pele, surgindo assim diferentes técnicas, como a iontoforese, a eletroporação, a fonoforese e a microporação (BANGA, 2009; DENET *et al.*, 2004). Uma das alternativas estudadas é a utilização da nanotecnologia para formular ativos que sejam capazes de potencializar a penetração cutânea.

O tratamento tópico, por meio da utilização de dermocosméticos, pode ser dividido em três tipos, levando em consideração a rota que as micro e macropartículas de sua composição penetram na pele, Figura 4 (DESAI *et al.*, 2010).

- Via intercelular: passando através da matriz lipídica que rodeia os queratinócitos e ocupando os espaços intercelulares entre eles.
- Via intracelular: passando através dos queratinócitos, sendo uma passagem muito dificultada. Este tipo permite o transporte de solutos hidrofílicos os polares.
- Via folicular: passando através dos folículos capilares, das glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas.

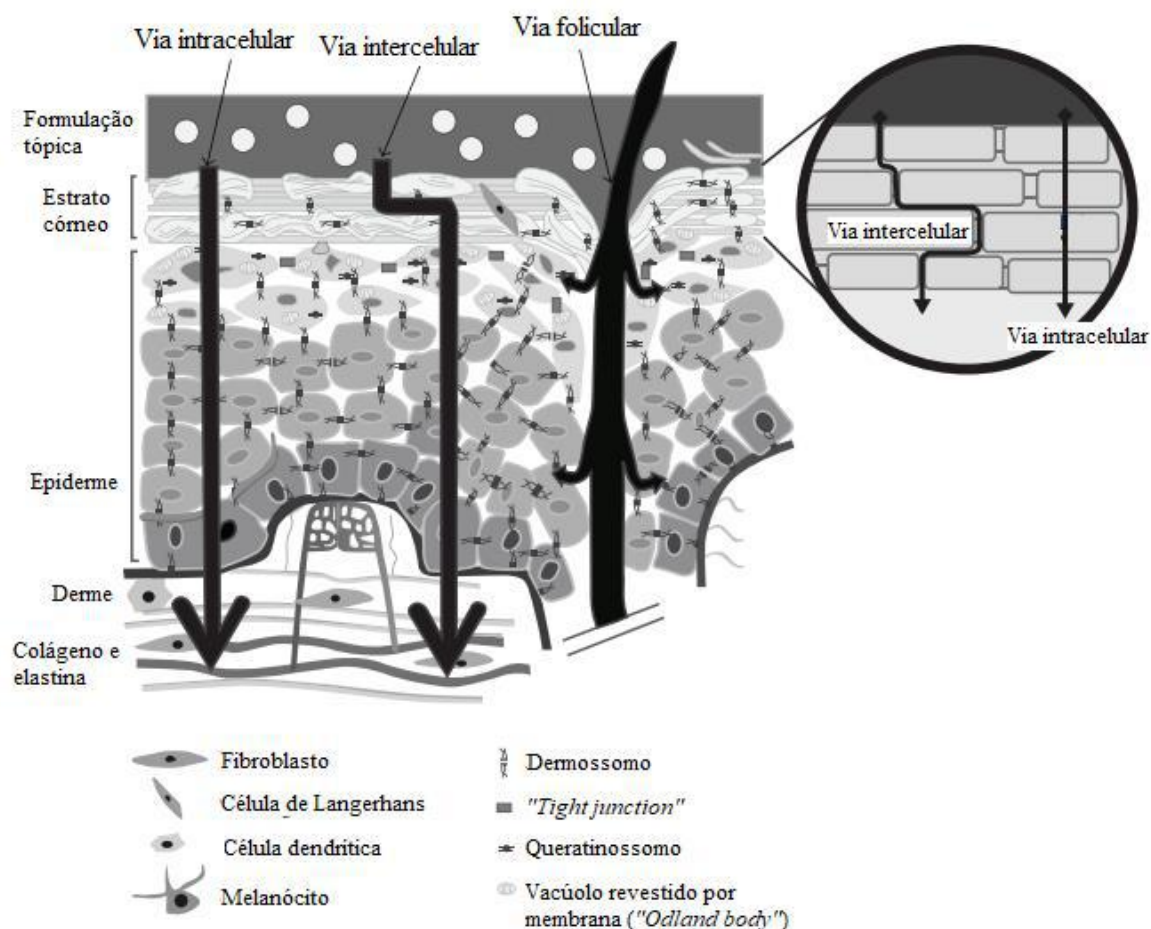


Figura 4: Vias de permeação de formulação tópica na pele. Adaptado de: BOLZIGER *et al.* (2012).

A permeação passiva de nanopartículas maiores que 20 nm por via transcelular é altamente improvável devido à natureza densamente compactada dos queratinócitos. No entanto, pequenos nano-portadores menores que 5 nm podem penetrar no estrato córneo. A via transappendageal tem sido amplamente investigada, visto que, nanopartículas entre 20 nm e 300 nm podem penetrar profundamente no folículo piloso através da abertura dos pelos (MIHRANYAN *et al.*, 2012).

Ao considerar que as características da epiderme alteram-se no caminho entre o estrato basal e o estrato córneo, pode-se concluir que, em cada movimento infinitesimal, as propriedades físico-químicas da partícula que está penetrando devem adequar-se ao ambiente em constante mudança, de forma a permitir seu movimento interno. Além disso, sua absorção também depende da localização e condições da pele (por exemplo, sexo,

idade, patologias, fluxo sanguíneo, barreira comprometida, densidade e dimensões do folículo piloso) (SUHONEN *et al.*, 1999).

Segundo BAROLI (2010), para analisar o grau de penetração de nanopartículas, é importante levar em consideração os seguintes pontos:

- As nanopartículas estudadas devem ser totalmente caracterizadas (tamanho, diâmetro hidrodinâmico, cargas superficiais ou potencial zeta, ponto isoelétrico, coeficiente de partição O/W, formato, composição do revestimento, estabilidade físico-química, metabolismo, agregação e ruptura). Os parâmetros devem ser avaliados usando meios de dispersão de nanopartículas e misturas que imitam as condições da pele humana.

- É necessário conhecer a composição do revestimento das nanopartículas, visto que ele é responsável por mantê-las dispersas em seu meio de dispersão, e é também o que irá interagir diretamente com células e tecidos. O revestimento também é responsável pelo aumento das dimensões e, portanto, os diâmetros obtidos por microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento de luz dinâmico devem ser relatados. Ressalta-se também que as hipóteses sobre a capacidade de penetração são baseadas nas propriedades físico-químicas das nanopartículas, como a carga superficial, que geralmente é dada pelo potencial zeta, que é um parâmetro dependente da concentração iônica e do pH do meio dispersante, temperatura, presença de surfactantes e/ou polímeros polieletrólitos (MALVERN, 2012). Desta forma, assume-se esses valores mudarão durante o transporte das nanocápsulas na pele, visto que o ambiente da pele também estará mudando.

- Na maioria dos casos, utiliza-se pele animal para a realização dos ensaios *in vitro* e, embora seja muito mais fácil obter a pele de animais do que realizar os testes em pele humana, não se deve esquecer que a estrutura, a porosidade, a composição e o potencial do metabolismo da pele animal diferem de animal para animal e de animais para humanos (CARRER *et al.*, 2008). Além disso, mesmo que a pele de porco seja similar o suficiente para imitar a pele humana, as diferenças permanecem, principalmente em escalas nanométricas. Da mesma forma, deve-se levar em consideração as diversas diferenças entre a pele humana doente e saudável (BOUWSTRA e PONEC, 2006).

De acordo com ROGER *et al* (2010), nanopartículas com tamanhos entre 50 e 300 nm, com potencial zeta positivo e superfície hidrofóbica possuem maior poder de

penetração. Segundo CASANOVA e SANTOS (2015), o transporte através da epiderme é facilitado para partículas com baixa massa molecular e lipofilicidade moderada, com valores de coeficiente de partição (log Kow) entre 1 e 3, possuindo assim solubilidade suficiente no domínio lipídico do estrato córneo e, ainda, com certa natureza hidrofílica, de forma que permita seu particionamento nas camadas internas da pele.

Geralmente, substâncias ativas presentes em cosméticos são hidrofílicas, sendo incapazes de penetrar no estrato córneo, ou muito lipofílicas, o que prejudica o particionamento na epiderme. A técnica de encapsulamento com materiais de parede apropriados é capaz de solucionar problema, pois confere à partícula um nível de lipofilicidade adequado para a aplicação desejada (AMMALA, 2013; CASANOVA e SANTOS, 2015).

O estado da pele influencia fortemente na perspectiva psicológica dos indivíduos, fazendo-os se sentirem mais confiantes e felizes quando tem aparência saudável e jovem (BURKE, 2009). Grande parte dos pacientes que procuram clínicas dermatológicas estão geralmente preocupados com o aparecimento de olheiras, “pés de galinha”, pele seca e por estarem “com aparência cansada”. Embora o envelhecimento seja inevitável, existem muitas opções de tratamento eficazes para minimizar estes efeitos, incluindo medidas cirúrgicas e modalidades não cirúrgicas, como preenchimentos, lasers e tecnologia de luz, mas são caras e têm maior potencial de desencadear efeitos colaterais. Portanto, um tratamento minimamente invasivo, como um cosmecêutico tópico, é frequentemente a primeira estratégia adotada (PILKINGTON *et al.*, 2015).

Os cosméticos são definidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como “artigos destinados a serem esfregados, derramados, aspergidos ou borrifados, introduzidos, ou de outra maneira aplicados ao corpo humano ou qualquer parte dele para a limpeza, embelezamento, promoção da atratividade ou alteração da aparência”.

Os cosmecêuticos, definidos como substâncias que têm propriedades tanto de cosméticos quanto de medicamentos, são produtos cosméticos que contêm ingredientes bioativos, com propriedades terapêuticas. Os cosmecêuticos não são classificados pelo FDA, mas este termo é usado por cientistas, médicos e profissionais de cuidados da pele, para incentivar os consumidores a continuar comprando produtos cosméticos, principalmente de antienvelhecimento e protetores solares (AGHEYISI, 2013). As formulações cosmecêuticas agora se expandiram da pele para o corpo e para os cabelos,

e diversos tratamentos cosmeceuticos tópicos para condições como fotoenvelhecimento, hiperpigmentação, rugas e danos aos cabelos foram amplamente difundidos (BRANDT, 2011). Entre as tecnologias usadas para desenvolver cosmeceuticos eficazes, a nanotecnologia encontra um lugar especial. Na área cosmética, acredita-se que as partículas menores são prontamente absorvidas pela pele e reparam os danos com mais eficiência (SINGH *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de um sistema de transporte eficaz, seguro e confiável, que apresente boa biodisponibilidade e efeitos colaterais reduzidos ou inexistentes, é uma meta para muitos pesquisadores.

Segurança no uso de nanopartículas em formulações cosméticas

As atividades biológicas das nanopartículas no corpo humano dependem de diferentes parâmetros como tamanho, forma, estrutura química, cristalinidade, propriedades de superfície (área, porosidade, carga, etc), estado de aglomeração, e dose. Esses parâmetros podem modificar as respostas biológicas de diversas maneiras. Um exemplo são as nanopartículas de ouro, que em muitos trabalhos da literatura foram relatadas como atóxicas, porém, os estudos realizados por TSOLI *et al.* (2005) mostraram que nanopartículas de ouro muito pequenas, com aproximadamente 1 nm de diâmetro, podem penetrar as membranas celulares e nucleares e se ligarem ao DNA. Portanto, isso indica que a toxicidade pode simplesmente resultar da diminuição das dimensões de um material na faixa nanométrica, por exemplo.

Desta forma, o uso de nanopartículas em cosméticos deve ser avaliado caso a caso, levando em conta fatores como tamanho, forma, concentração, dispersão e distribuição, grau de hidrofiliabilidade-lipofiliabilidade, presença de cargas superficiais, características físicas e químicas dos nanomateriais utilizados e interação com os mesmos (GUIX *et al.*, 2008, MOSS *et al.*, 2002).

O transporte de nanopartículas através da pele está relacionado com a natureza e propriedades físico-químicas das nanopartículas e as condições da pele (CEVC e VIERL, 2010). As nanopartículas podem ser divididas em dois grupos: nanopartículas solúveis e/ou biodegradáveis e nanopartículas insolúveis e/ou não biodegradáveis.

Embora os produtos cosméticos devam ser usados em pele normal, sabe-se que eles também são aplicados em pele não saudável e, nestas condições, as propriedades de barreira da pele podem estar prejudicadas. A maior parte dos estudos relata que as nanopartículas aplicadas na pele apenas penetram através das aberturas foliculares dos pelos e dos poros da pele, com uma quantidade mínima encontrada abaixo do estrato córneo (TOLL *et al.*, 2004). CAMPBELL *et al.* (2012) mostraram em suas pesquisas que partículas de 20 a 200 nm, marcadas com fluorescência, em contato com a pele intacta ou parcialmente danificada, são absorvidas pela pele, mas não atingem as células viáveis da epiderme, ou seja, não atingindo os vasos capilares presentes na derme e, portanto, provaram que os sistemas de distribuição nanotópica são úteis e seguros para os cosmeceuticos.

2.2.2 Funcionalização com hialuronidase

A funcionalização de superfícies de nanopartículas é uma forma de “ancorar” compostos por meio de seus grupos funcionais, atribuindo novas funcionalidades à partícula e modificando suas propriedades (MATHIAS, 2010). A Figura 5 representa o esquema de uma nanocápsula funcionalizada.

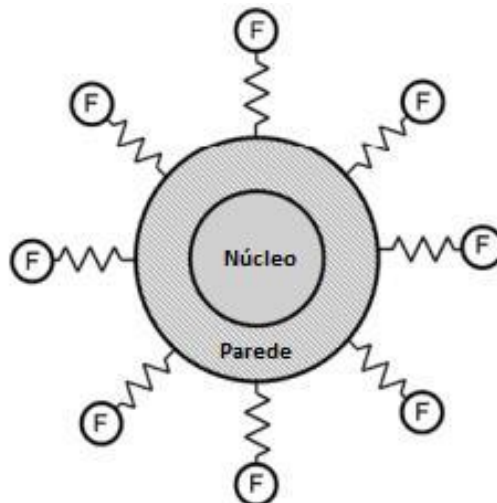


Figura 5: Estrutura de uma nanocápsula funcionalizada. Fonte: Adaptado de FRANCISQUINE *et al.* (2014).

Podem ser utilizadas duas estratégias diferentes para funcionalizar nanopartículas, a funcionalização direta e a pós-funcionalização. No primeiro método, o agente ligante é adicionado durante a síntese das nanopartículas, conjugando-se diretamente em sua superfície (ZHOU *et al.*, 2009). Já no segundo método, os ligantes secundários são fixados na superfície de nanopartículas previamente sintetizadas (SUBBIAH *et al.*, 2010).

Há um interesse muito grande no estudo da adsorção de proteínas em partículas poliméricas, devido a importância desses materiais em aplicações biomédicas. De acordo com HENCH (2006), por possuírem flexibilidade química elevada, os polímeros podem ser modificados com macromoléculas biológicas, permitindo a aplicação desses materiais para produção de biossensores, bioreatores, sistemas de liberação controlada de ativos, órgãos artificiais, dentre outros. No Quadro 4 são apresentados alguns trabalhos que realizaram a funcionalização de nanopartículas poliméricas e suas aplicações, principalmente voltadas para o direcionamento do ativo para o local desejado de tratamento e sua liberação controlada.

Quadro 4: Revisão de trabalhos que realizaram a funcionalização de nanopartículas

Agente funcionalizante	Aplicação	Referência
Peptídeo NGR	Desenvolvimento de nanopartículas vetorizadas para tratamento de tumores	PASTORINO <i>et al.</i> (2003)
Ácido siálico	Direcionamento das nanopartículas para células tumorais e propriedade de anti-reconhecimento pelas células do organismo	BONDIOLI <i>et al.</i> (2010)
Poloxamer 188	Síntese de nanopartículas de PLGA furtivas	JAIN <i>et al.</i> (2013)
Ácido fólico	Direcionamento do fármaco idarrubicina para células tumorais	GUNDUZ <i>et al.</i> (2014)
Sílica mesoporosa	Síntese de partículas magnéticas estabilizadas com sílica para detecção de patógenos	CHICO (2016)
Alcoxissilano 3-mercaptopropil – trimetoxissilano (MPTS)	Liberação controlada do fármaco quimioterápico metotrexato	TOGNOLO (2017)

Os tipos de materiais mais utilizados na funcionalização de nanopartículas são proteínas, segmentos peptídicos, hormônios, lectinas e anticorpos. Neste trabalho optou-se por utilizar a enzima hialuronidase na funcionalização das nanocápsulas.

Hialuronidase

Hialuronidase é um termo utilizado para enzimas capazes de romper o ácido hialurônico presente na matriz extracelular da pele e clivar sulfetos de condroitina, gerando assim um aumento da permeabilidade dos tecidos conectivos (DE AZEREDO *et al.*, 2001; BRODY, 2005; DUNN *et al.*, 2010).

Estas enzimas são amplamente encontradas na natureza e estão envolvidas em diversas condições fisiopatológicas, como difusão de toxinas, fertilização, metástases, infecções microbianas e cicatrização (LEE *et al.*, 2010; WOHLRAB *et al.*, 2012). Sua meia-vida sérica é de aproximadamente 2 minutos, sendo inativadas no fígado e nos rins (DUNN *et al.*, 2010) e sua administração cutânea tem ação imediata, dependendo de onde são administradas, com duração entre 24 e 48 horas. Quando aplicadas na região dos olhos, tem duração de até 112 horas. A reconstituição da barreira dérmica alterada pela hialuronidase ocorre completamente após 48 horas (BRODY, 2005; LEE *et al.*, 2010).

Estas enzimas foram descobertas em 1928 por Duran Reynals (FISZER-SZAFARZ, 1984) e são amplamente encontradas na natureza, podendo ser divididas em três grupos. O primeiro grupo é composto por hialuronidases extraídas principalmente de testículos de mamíferos, lisossomas e venenos de abelha, escorpião, cobra, dentre outros (TAN e PONNUDURAI, 1992). Já as hialuronidases do segundo grupo são encontradas nas glândulas salivares de sanguessugas e ancilostomídeos, que são vermes parasitas de mamíferos. No terceiro grupo estão as hialuronidases microbianas, principalmente as bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Streptomyces* (MEYER, 1971; JEDRZEJAS *et al.*, 2002). No Quadro 5 são mostrados os tipos de hialuronidase, classificadas de acordo com o tipo de clivagem de substrato, e seu modo de atuação.

Quadro 5: Classificação, obtenção e atuação de hialuronidasas (GONÇALVES, 2007)

Classificação da hialuronidase	Obtenção	Modo de atuação
Hialuronato-4-glicanohidrolases (PH20)	Espermatozoides de mamíferos, lisossomais e no veneno de alguns insetos e cobras.	Atua principalmente sobre o ácido hialurônico, sendo que algumas podem também clivar sulfatos de condroitina.
Hialuronato-3-glicanohidrolase	Sanguessugas e algumas minhocas	Apresenta ação catalítica somente sobre a cadeia de ácido hialurônico.
Hialuronato liases	Microorganismos patogênicos (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium septicum</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , etc)	Degradam o ácido hialurônico através da reação de β -eliminação. Não recomendada para uso terapêutico, visto que é de difícil purificação, devido a presença de grandes quantidades de endotoxinas no caldo fermentado.

Em mamíferos, a hialuronidase pode ser encontrada nos espermatozoides, tendo como principal função a degradação da parede do óvulo, proporcionando a fecundação (LI *et al.*, 2002). Devido a similaridade com a hialuronidase encontrada em humanos, a hialuronidase extraída dos testículos bovinos é muito utilizada em aplicações médicas.

As hialuronidasas de mamíferos pertencem à família de hidrolases glicosídicas. Elas clivam a ligação glicosídica β -1,4 do ácido hialurônico por hidrólise (STERN e JEDRZEJAS, 2006). O processo de degradação das hialuronidasas de mamíferos é diferente das hialuronidasas bacterianas. As liases bacterianas degradam o ácido hialurônico após uma etapa inicial de clivagem endolítica, de maneira processual, separando assim apenas uma unidade dissacarídica da extremidade da cadeia do ácido hialurônico de cada vez (LI *et al.*, 2000). Já a degradação por hialuronidasas de mamíferos, ocorre de maneira aleatória, com cada etapa de clivagem endolítica sendo acompanhada por um novo evento de ligação em uma posição aleatória dentro da cadeia de ácido hialurônico (STERN e JEDRZEJAS, 2006).

Hialuronidase testicular bovina

A hialuronidase testicular bovina é uma endo-glicosidrolase que cliva a ligação glicosídica 1,4- β do ácido hialurônico. Além disso, esta hialuronidase degrada os sulfatos

de condroitina e condroitina, que são estruturalmente relacionados ao ácido hialurônico. Dependendo da preparação da hialuronidase e do substrato utilizado, foram encontrados na literatura diferentes valores de pH ótimo: pH 3,7 (MUCKENSCHNABEL *et al.*, 1998), pH 5,2 (GORHAM *et al.*, 1975) e pH 7,5 (MEYER, 1971). Além da atividade de hidrolase, a hialuronidase testicular bovina também possui atividade transglicosilase. As reações de transglicosilação dependem do valor do pH e do teor de sal do tampão de incubação. O valor de pH ótimo para a atividade de hidrolase é de cerca de 4 ou 5, enquanto o pH 7 é ótimo para a reação de transglicosilação (SAITOH *et al.*, 1995).

Aplicações médicas

Segundo FROST *et al.* (1996), ao clivar o ácido hialurônico da pele, as hialuronidases aumentam a permeabilidade da membrana, reduzem a viscosidade e tornam os tecidos mais facilmente permeáveis (efeito de espalhamento). Assim, essas enzimas podem ser utilizadas terapêuticamente para aumentar a velocidade de absorção, promover a reabsorção do excesso de fluidos, aumentar a eficácia da anestesia local e diminuir a destruição tecidual por injeção subcutânea e intramuscular de fluidos.

As hialuronidases são amplamente utilizadas na medicina, em várias especialidades, como ortopedia, cirurgia, oftalmologia, oncologia, dermatologia, dentre outras (FARR *et al.*, 1997).

A hialuronidase presente no esperma dos mamíferos desempenha um papel importante no sucesso da fertilização, incluindo em humanos (LIN *et al.*, 1994). Além disso, há evidências de que a hialuronidase pode ter efeitos anticancerígenos intrínsecos e pode suprimir o desenvolvimento de tumores. ZAHALKA *et al.* (1995) relataram que o tratamento com hialuronidase foi capaz de bloquear a invasão do linfonodo pelas células tumorais em um modelo animal de linfoma de células T.

Um exemplo de trabalho que utilizou a hialuronidase para aumentar a penetração cutânea é o de CHORILLI *et al.* (2005), que estudaram a hialuronidase para compor um tratamento mesoterápico, ou seja, com aplicação de medicamentos sob a pele, de forma a promover o aumento da permeabilidade cutânea, a mobilização de edemas e a atenuação da lipodistrofia ginóide (celulite) em suínos.

DE FREITAS *et al.* (2006) pesquisaram os efeitos da hialuronidase no tratamento de fimose. Após oito semanas de tratamento, o creme contendo 0,2% de hialuronidase mais o princípio ativo mostrou-se eficiente.

FELDMAN *et al.* (2007) estudaram a contribuição da hialuronidase pneumocócica para o dano e disfunção mediados pela pneumolisina no epitélio respiratório, favorecendo a colonização e, posteriormente, a disseminação extrapulmonar do pneumococo. Segundo os autores, isto ocorre devido à degradação da matriz intercelular e/ou hidrólise do ácido hialurônico presente no fluido de revestimento epitelial causados por esta enzima.

Na Figura 6 é possível observar o modo de atuação da hialuronidase do tipo PH20 (testicular) sobre o ácido hialurônico, ou seja, esta enzima promove a quebra da ligação β -1-4.

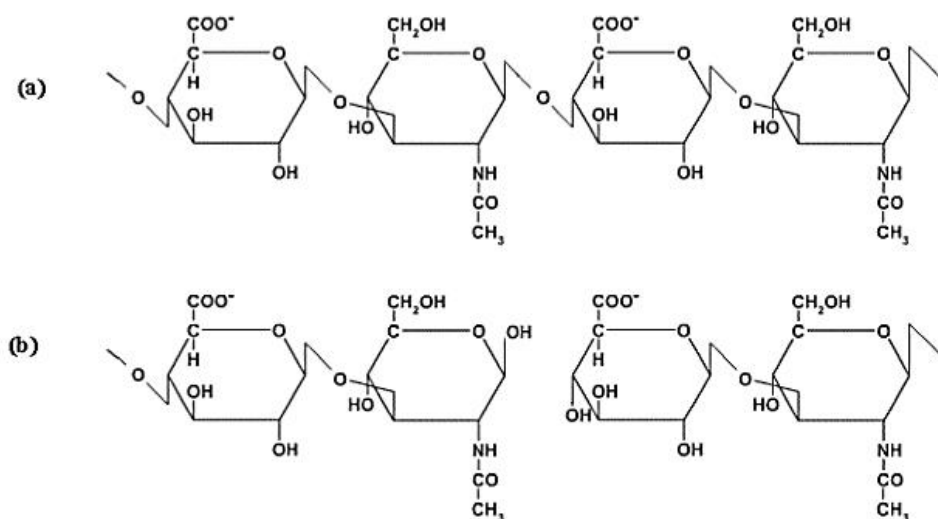


Figura 6: Estrutura do ácido hialurônico antes de clivagem (a) e do produto após a clivagem (b) através da ação da hialuronidase do tipo testicular. Fonte: Adaptado de GONÇALVES (2007).

Cada tipo de hialuronidase possui características próprias, variando de acordo com a espécie e sua origem. Dentre estas características, as principais são o ponto isoelétrico, o tamanho e o pH ótimo de atividade, que também podem sofrer alterações dependendo da forma como a extração e a purificação da enzima são realizadas (GONÇALVES,

2007). Para hialuronidasas extraídas de testículos e espermatozóides de mamíferos, o pH ideal encontra-se entre 4,0 e 7,0, seu tamanho pode variar entre 53 kDa (pH 4) e 64 kDa (pH 7) e sua atividade pode ser inibida por apigenina (CSOKA *et al.*, 2001), que é um flavonóide encontrado em algumas frutas e verduras, como cebola, laranja, salsa, etc.

Segundo ZANEVELD *et al.* (1973), o tamanho da hialuronidase extraída de testículos bovinos é de 61 kDa e seu pH ótimo é 6,75. Além disso, esta enzima sofre desnaturação em pH abaixo de 3,0. Pode-se armazená-la sob refrigeração, em freezer ou geladeira, sem que ocorram alterações em suas propriedades.

ZHOU *et al.* (2016) estudaram em seu trabalho a hipótese de que a hialuronidase conjugada nas superfícies das nanopartículas aumenta sua penetração em tumores sólidos, permite uma utilização eficiente da enzima e evita a degradação desnecessária de uma grande quantidade de ácido hialurônico, evitando potenciais efeitos colaterais, pois as nanopartículas degradam apenas a matriz no caminho de difusão enquanto liberam o ativo. Como resultado, os autores observaram que as nanopartículas conjugadas com hialuronidase exibiram maior atividade antitumoral do que as nanopartículas sem hialuronidase.

Efeitos colaterais, interações medicamentosas e contraindicações

Os efeitos colaterais da hialuronidase não são frequentes, sendo representados principalmente por reações no local da aplicação, como relatado por SOPARKAR *et al.* (2007), em 3% de seus pacientes tratados, mostrando que houve prurido temporário após a injeção da enzima. Já os efeitos colaterais de angioedema e urticária foram relatados em menos de 0,1% dos pacientes.

Algumas medicações podem tornar os tecidos parcialmente resistentes à ação enzimática da hialuronidase, como cortisona, estrógenos, hormônio adrenocorticotrófico, salicilatos e anti-histamínicos (HIRSCH *et al.*, 2007). Além disso, a hialuronidase não deve ser utilizada em pacientes alérgicos a picadas de abelha, visto que é um dos componentes de seu veneno (LEE *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011).

2.3 Nanoencapsulamento

O nanoencapsulamento é um processo de encapsulamento realizado em escala nanométrica, onde ocorre a incorporação, absorção ou dispersão de compostos dentro de vesículas, formando nanopartículas (ASSIS *et al.*, 2012; EZHILARASI *et al.*, 2013)

2.3.1 Princípios e vantagens

O modelo mais bem-sucedido de microencapsulamento, e também o conceito primário utilizado no desenvolvimento das técnicas de micro e nanoencapsulamento, é o das células de seres vivos, onde uma membrana natural é responsável por proteger todos os componentes presentes em seu interior e controlar seletivamente a passagem de substâncias entre o interior e o exterior das células (FANGER, 1974).

Algumas das principais vantagens do encapsulamento de substâncias são:

- Proteção de substâncias ativas muito voláteis, com baixa estabilidade ou com alta sensibilidade a fatores como temperatura, pH, luz e oxidação (HONG e PARK, 1999; AMMALA, 2013);
- Capacidade de incorporar tanto substâncias lipofílicas como hidrofílicas, de forma a aumentar a biodisponibilidade (RAWAT, 2006);
- Liberação controlada do ativo encapsulado, dependendo principalmente do agente encapsulante utilizado (DIVKOVIC *et al.*, 2005);
- Potencialização em suas atividades biológicas, reduzindo sua toxicidade (DIVKOVIC *et al.*, 2005);
- Penetração cutânea mais profunda, devido às dimensões nanométricas da nanopartícula, que conseguem superar algumas das barreiras biológicas do corpo (DIVKOVIC *et al.*, 2005);
- Possibilidade de direcionamento à locais mais específicos (RAWAT, 2006).

Embora haja diversas vantagens, deve-se levar em consideração também algumas desvantagens, como o alto custo de produção de alguns materiais nanoestruturados, dependendo do processo e dos reagentes utilizados, e a instabilidade destas nanopartículas dependendo do meio onde estão dispersas (RAWAT, 2006).

A liberação de ativos presentes em nanocápsulas pode ocorrer a partir de diferentes processos, como: dissolução, ocorrendo a solubilização/degradação da matriz polimérica; difusão através da matriz cutânea; e erosão da matriz por meio da degradação ocasionada por enzimas. Pode até mesmo ocorrer como uma combinação dos processos listados acima (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Existem diversas técnicas de encapsulamento de substâncias ativas; na escolha de qual técnica utilizar deve-se levar em consideração as características desejadas para o produto final e quais as características físico-químicas do ativo e do agente encapsulante. As técnicas mais difundidas no meio científico são as de nanoprecipitação, coacervação simples ou complexa, *spray drying*, expansão rápida de soluções supercríticas (RESS), gelificação ionotrópica, emulsificação, dentre outras (EL ASBAHANI *et al.*, 2015). No Quadro 6 são apresentadas algumas destas técnicas.

Quadro 6: Técnicas de encapsulamento

Processo	Método
Químico	Polimerização em emulsão, polimerização em suspensão, polimerização interfacial, gelificação ionotrópica e inclusão molecular
Físico-químico	Coacervação ou separação de fases, emulsificação com posterior evaporação com solvente, envolvimento lipossômico, pulverização em agente formador de reticulação, encapsulamento sol-gel, montagem <i>Layer-by-layer</i> (LbL) e microencapsulamento assistido por fluido supercrítico
Físico	<i>Spray drying</i> (secagem por atomização), <i>spray chilling</i> (nebulização em corrente de ar frio), <i>spray cooling</i> , revestimento em leito fluidizado, encapsulamento a vácuo, encapsulamento eletrostático pulverização em banho térmico, co-cristalização, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios e liofilização

Fonte: SUAVE *et al.* (2006)

2.3.2 Gelificação Ionotrópica

O método de gelificação ionotrópica, utilizado neste trabalho, tem como base a associação de um polímero ionizado com contra íons provenientes da dissociação de um sal. Observa-se primeiramente a formação de gotículas da solução de um polímero hidrofílico dispersas na emulsão. Em seguida, a rede de gel primária é estabilizada pela ação de um agente reticulante (REIS *et al.*, 2006).

Dentre os polímeros que têm sido mais utilizados para a realização desta técnica, destacam-se o alginato e a quitosana, pois além de possuírem propriedades que os habilitam como bons agentes de encapsulação e liberação, sua disponibilidade comercial é elevada (REIS *et al.*, 2006).

Alguns exemplos de íons que são utilizados como agentes reticulantes são o Ca^{+2} , o Ba^{+2} e o Al^{+3} . Com a reticulação, a estrutura molecular das nanopartículas formadas é similar a uma “caixa de ovos” (em inglês, “*egg-box*”), onde cátions divalentes são ligados coordenadamente aos carboxilatos dos ácidos gulurônicos (ISKAKOV *et al.*, 2002), conforme ilustrado pela Figura 7. Para possibilitar a formação de nanopartículas por este método, é necessário controlar algumas condições do processo, como a concentração de íons, a concentração de alginato, a velocidade de agitação, o pH, a temperatura e a velocidade de adição de reagentes (HUDSON e MARGARITIS, 2014).

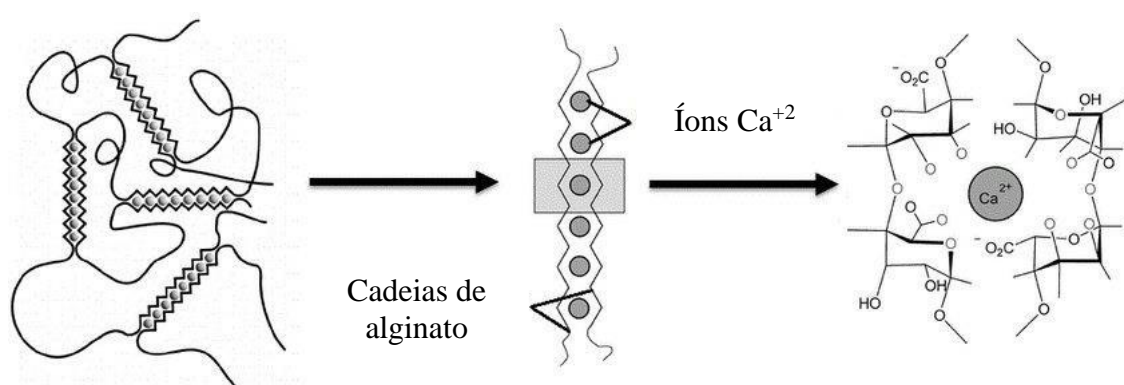


Figura 7: Representação esquemática da estrutura “caixa de ovos” do alginato reticulado. Adaptado de DESTRUDEL *et al.* (2017).

Para uma gelificação bem-sucedida, ou seja, com a formação de um gel homogêneo, é necessário controlar a formação do cátion divalente por dissociação do sal utilizado. A seleção do cátion deve levar em consideração a faixa de pH inicial e final do processo. Dentre os sais que poderiam ser usados na reticulação, destacam-se o citrato, carbonato, cloreto, fosfato, oxalato e tartarato de cálcio. Porém, segundo PONCELET *et al.* (1995), o oxalato e o tartarato não são capazes de reticular as partículas, pois o cálcio não é dissociado destes complexos sem que se faça um ajuste adequado do seu pH. Já o fosfato, por apresentar-se na forma de grânulos maiores, é de difícil solubilização, o que poderia comprometer a formação das partículas. O citrato também é considerado um sal problemático, visto que com sua utilização são formadas partículas grandes e com alta variabilidade na distribuição de tamanho.

De acordo com PONCELET *et al.* (1995), o carbonato de cálcio resulta em partículas com formato esférico e distribuição de tamanho adequada, assim como o cloreto de cálcio, conforme demonstrado por RODRIGUES *et al.* (2006).

2.3.3 α -bisabolol – Ativo encapsulado

Diversos materiais podem ser encapsulados em nano e microcápsulas, podendo existir nas fases gasosa, líquida ou sólida, dependendo de sua aplicação (MISHRA, 2015).

O mercado mundial de produtos para cuidados faciais tem se voltado à utilização de formulações naturais em seus cosméticos, visto que estes estão associadas ao interesse de um mercado consumidor cada vez mais adepto das campanhas do chamado “consumo verde” (MIGUEL, 2011). Dentre estes produtos, podem-se citar os óleos essenciais, que funcionam como princípios ativos, visto que, em sua grande maioria, apresentam importantes atividades biológicas, como antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, dentre outras (BASER e BUCHBAUER, 2015). Devido a estas características, óleos essenciais costumam ser utilizados como ativos em nanocápsulas para a aplicação em cosméticos. Na Tabela 1 são mostrados trabalhos que realizaram o encapsulamento de óleos essenciais para fins medicinais e cosméticos.

Tabela 1: Encapsulamento de óleos essenciais para fins medicinais e cosméticos.

Óleo essencial	Agente encapsulante	Técnica de encapsulamento	Objetivo	Referência
Citronela	Quitosana	Emulsificação óleo em água	Potencializar efeito repelente de insetos do ativo	(HSIEH <i>et al.</i> , 2006)
Alecrim	Etilcelulose	Separação de fases	Tornar mais duráveis as fragrâncias em tecidos	(VONCINA <i>et al.</i> , 2009)
Cravo, tomilho e canela	Alginato	Extrusão-emulsão	Reduzir volatilização dos ativos	(SOLIMAN <i>et al.</i> , 2013)
Manjeriçã -santo	Gelatina	Coacervação simples	Reduzir volatilização e oxidação do ativo	(SUTAPHANIT e CHITPRASERT, 2014)
Sucupira	Goma arábica e maltodextrina	<i>Spray drying</i>	Desenvolver ativo fitoterápico para tratamento de bronquite	(ALVES <i>et al.</i> , 2014)

Óleos essenciais são produtos naturais aromáticos, geralmente voláteis, extraídos a partir de diferentes partes das plantas como, por exemplo, de flores (rosa, jasmim, lavanda, etc), folhas (eucalipto, sálvia, tomilho, orégano, hortelã, cânfora, etc.), ervas, casca, frutas (romã, frutas cítricas, etc.), galhos, sementes (cardamomo, café, pitaya, cominho, etc.), rizomas e raízes, dentre outras (SVOBODA e GREENAWAY, 2003; FENNER *et al.*, 2006; BAKRY *et al.*, 2016). As técnicas de extração existentes podem ser classificadas em convencionais ou avançadas. Dentre as convencionais tem-se a de hidrodestilação, destilação por arraste a vapor, extração com solvente orgânico e prensagem a frio. Dentre as técnicas avançadas pode-se citar as de extração por fluido supercrítico, extração líquida subcrítica, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração por micro-ondas livre de solvente, dentre outras (EL ASBAHANI *et al.*, 2015).

Os óleos essenciais possuem atividades biológicas diversas (anti-inflamatórias, antioxidantes, antifúngicas, antibacterianas, antivirais, repelentes de insetos, dentre outras). Estas propriedades têm relação direta com sua complexa composição química, visto que alguns óleos são compostos por mais de 100 terpenos (MAYAUD *et al.*, 2008), que são hidrocarbonetos que ocorrem em plantas e animais como múltiplos de uma unidade estrutural básica, o isopreno, e são responsáveis por grande parte dos cheiros exalados pelos campos e florestas.

O α -(-)-Bisabolol, Figura 8, cuja nomenclatura oficial é (-)-6-metil-2-(4-metil-3-ciclohexen-1-il)-5-hepten-2-ol (LOPES, 2010), é um álcool sesquiterpênico extraído de óleos essenciais de várias plantas e árvores, tais como a candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*) e a camomila (*Matricaria chamomilla*) (ALEIXO, 1999). Este composto é largamente utilizado na indústria cosmética, como em cremes pós-barba, loções para o corpo, desodorantes, batons, produtos para bebês e cremes esportivos (GOMES-CARNEIRO *et al.*, 2005), por promover o aumento da permeabilidade cutânea (DIAS, 2009) e por sua fragrância e atividades biológicas (antiinflamatória, antioxidante, antiespasmótica, anti-séptica, calmante e até antibiótica) (VILJOEN *et al.*, 2006; HARDY, 2007; BHATIA *et al.*, 2008).

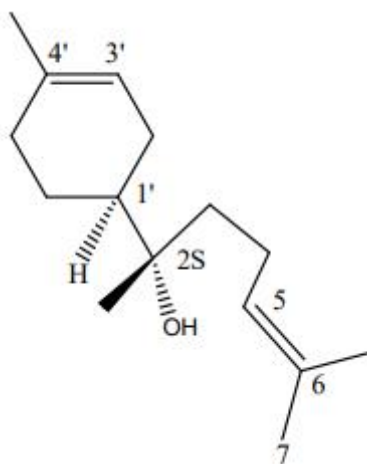


Figura 8: Estrutura terpênica do α -(-)-Bisabolol

O α -bisabolol é um líquido incolor, com aroma floral fraco, densidade relativamente baixa (0,93) e um ponto de ebulição de 153° C a 1,6 kPa (PERBELLINI, 2004). É uma substância muito lipofílica e solúvel em etanol.

Nos últimos anos, vários antioxidantes naturais surgiram no mercado e são geralmente considerados seguros. KIM *et al.* (2008) estudaram o efeito do α -bisabolol na expressão de genes MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Fator*) e da tirosinase induzida por α -MSH (α -Melanocyte-stimulating hormone) e os resultados indicaram que o α -bisabolol inibiu a expressão gênica de MITF e tirosinase, o que implica que o α -bisabolol inibe a melanogênese, ou seja, apresentando ação despigmentante (LEE *et al.*, 2010).

ANDERSEN (1999) relatou em seus estudos que o α -bisabolol é bem absorvido topicamente, não causando danos ou irritação na pele. Além disso, este composto natural pode aumentar a absorção de outros compostos, como descrito por CORNWELL e BARRY (1994) para o 5-fluorouracil.

A seguir são descritos alguns estudos onde o α -Bisabolol foi encapsulado visando potencializar suas atividades biológicas.

TERROSO *et al.* (2016) realizaram o encapsulamento do α -Bisabolol em nanocápsulas de núcleo lipídico e em teosferas de cacau, visando sua administração por via oral para proteção gastrointestinal, proporcionada pelas atividades biológicas encontradas no α -Bisabolol (atividade antiinflamatória e atividade antioxidante) frente às lesões gástricas induzidas or etanol absoluto. As nanocápsulas formadas se mostraram estáveis, de tamanho nanométrico, distribuição unimodal e efeito adesivo na mucosa do estômago de ratos, o que não foi identificado nas nanopartículas sem ativo. Desta forma, os autores concluíram que ambas nanocápsulas formadas são promissoras no desenvolvimento de formulações profiláticas.

TEIXEIRA *et al.* (2017) estudaram o efeito antinociceptivo do α -Bisabolol encapsulado, ou seja, seu efeito na redução da capacidade de perceber a dor. As nanocápsulas foram preparadas utilizando o polissacarídeo galactomanana. A nocicepção corneana foi induzida pela aplicação tópica de uma solução de NaCl 5M nos olhos de camundongos e o comportamento nociceptivo foi caracterizado pela medida de tempo que o animal passou “limpando” os olhos. Animais pré-tratados com estas nanocápsulas tiveram uma redução significativa no número de comportamentos nociceptivos,

indicando que as mesmas podem ser úteis na formulação de colírios para tratamento da dor ocular.

SATHYA *et al.* (2018) encapsularam o α -Bisabolol em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) utilizando a técnica de homogeneização a quente e avaliaram seu efeito neuroprotetor em células Neuro-2a. Os autores concluíram, por meio de técnicas de caracterização (DLS, PXRD e FTIR), que as partículas produzidas possuíam tamanho e estabilidade adequados para a distribuição do ativo nos locais desejados. Além disso, por meio do método de complexação do fosfomolibidênio, evidenciaram o potencial antioxidante do produto formado e, pelo método da tioflavina T, mostraram o efeito atenuante do ativo sobre a agregação do peptídeo A β e seu efeito neuroprotetor sobre a neurotoxicidade induzida por esses peptídeos, o que comprova sua eficiência terapêutica e biodisponibilidade no combate de Alzheimer.

2.3.4 Agentes encapsulantes

A escolha do material de parede a ser utilizado deve levar em consideração as propriedades físicas do material que será encapsulado (ativo ou núcleo). Por exemplo, para um núcleo aquoso é recomendável que se utilize um material polimérico insolúvel em água. Já um núcleo lipofílico necessita de um polímero de parede hidrofílico (GHAYEMPOUR e MORTAZAI, 2015).

Segundo PISKIN (1995), a utilização de agentes encapsulantes de origem natural no encapsulamento de ativos tende a aumentar sua eficácia e biodisponibilidade. As principais vantagens de sua utilização em aplicações cosméticas são:

- São, em sua grande maioria, biodegradáveis e biocompatíveis;
- Auxiliam na liberação controlada do óleo essencial;
- Em contato com a pele humana, biopolímeros são geralmente não reativos e podem ser facilmente removidos do corpo por vias metabólicas naturais;

Alguns exemplos de agentes encapsulantes naturais são os polissacarídeos (caragena, goma arábica, alginato, quitosana, etc), as proteínas/peptídeos (colágeno, gelatina, etc) e os lipídeos (lecitina) (CARVALHO *et al.*, 2016).

Alginato

O alginato de sódio, Figura 9, é um polímero natural, com característica aniônica, extraído de algas marinhas, composto por várias unidades de sais dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico, unidas por ligações glicosídicas. É um material relativamente inerte e biocompatível, frequentemente utilizado nas indústrias farmacêutica e alimentícia (MOFIDI *et al.*, 2000).

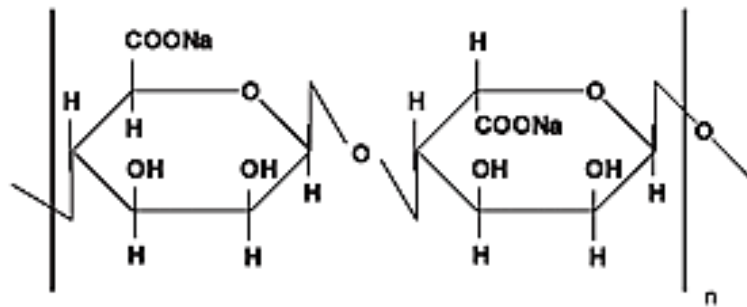


Figura 9: Estrutura química do alginato de sódio (SOUZA *et al.*, 2008).

Quitosana

A quitosana, Figura 10, é um polímero natural, com característica catiônica, derivado da quitina via reação de desacetilação, contendo em sua estrutura uma alta quantidade de glusosamina. É muito utilizada em aplicações tópicas e sistemas de transporte transdérmicos, devido as suas características atóxicas e biodegradáveis. Além disso, é capaz ainda de alterar a estrutura da queratina presente na pele, facilitando assim a penetração cutânea (PAWAR e BABU, 2010).

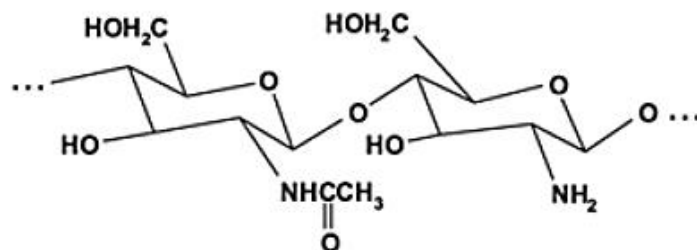


Figura 10: Estrutura química da quitosana (LARANJEIRA e DE FÁVERE, 2009).

Matriz alginato-quitosana

A utilização do complexo alginato-quitosana no encapsulamento de substâncias para aplicação tópica aparenta ser uma boa estratégia, visto que ambos os polímeros são biocompatíveis e juntos possuem elevadas propriedades mecânicas, advindas principalmente da quitosana (BARUCH e MACHLUF, 2006).

A degradação dos polímeros naturais depende de processos enzimáticos e também do tipo de biopolímero utilizado, assim, a taxa de degradação pode variar de paciente para paciente (CHEUNG *et al.*, 2007). Quitosana e goma de guar, polímeros de origem natural e policaprolactona, um polímero de origem sintética, são exemplos de materiais amplamente utilizados na área médica. A degradação da quitosana ocorre no corpo através da ação de enzimas, em particular, a lisozima presente nos fluidos corporais humanos, levando à formação de oligossacarídeos não tóxicos que são incorporados nas rotas metabólicas e naturalmente eliminados do organismo (CROISIER e JÉRÔME, 2013).

Micropartículas de alginato-quitosana são especialmente utilizadas na indústria farmacêutica, para liberação prolongada de compostos antimicrobianos. As micropartículas fornecem estabilidade, mascaram um sabor e odor desagradáveis e reduzem os efeitos colaterais tóxicos de substâncias bioativas encapsuladas. As micropartículas podem ser obtidas usando um dos métodos: pela gelificação ionotrópica de alginato com íons cálcio na presença de quitosana ou pelo método de reticulação de tripolifosfato (CROISIER e JÉRÔME, 2013).

Alguns exemplos de estudos que utilizaram o método de gelificação ionotrópica para a produção de nano e micropartículas de alginato-quitosana foram os de SAHASATHIAN *et al.* (2010), HARI *et al.* (1996), MURATA *et al.* (2000), COPPI *et al.* (2004), ABDUL e FAHMY (2013), SABITHA *et al.* (2010), PANDEY e KHULLER (2004), MOTWANI *et al.* (2008), BALAJI *et al.* (2015), COSTA *et al.* (2015), ZOHRI *et al.* (2010) e RAJENDRAN *et al.* (2013). Nestes trabalhos foram encapsulados diversos ativos, como amoxicilina, nitrofurantoína, metronidazol, polimixina B, rifampicina, isoniazida, pirazinamida, peróxido de benzoíla, gatifloxacina, levofloxacina, daptomicina, nisina e extrato metanólico de *Ocimum sanctum*. O encapsulamento de amoxicilina em microcápsulas mucoadesivas de alginato-quitosana como sistema de liberação gastrorreceptor, resultou em estabilidade aumentada e liberação controlada de

droga antimicrobiana no fluido gástrico simulado, em comparação com a droga simples com amoxicilina (ARORA e BUDHIRAJA, 2012; SAHASATHIAN *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* realizados por PANDEY e KHULLER (2004) demonstraram que a encapsulação de rifampicina, isoniazida e pirazinamida em microcápsulas de alginato-quitosana resultou em um aumento de cerca de 13 a 15 vezes em sua meia-vida biológica em comparação com substâncias não encapsuladas, levando a um aumento da duração de ação dos ativos.

Na maioria dos casos, as nanopartículas obtidas pelo método de gelificação ionotrópica são estáveis (MOTWANI *et al.*, 2008; ZOHRI *et al.*, 2010; RAJENDRAN *et al.*, 2013), possuem uma forma quase esférica, com tamanhos variando de 50 a 900 nm (FRIEDMAN *et al.*, 2013; MOTWANI *et al.*, 2008; BALAJI *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2015; ZOHRI *et al.*, 2010; RAJENDRAN *et al.*, 2013).

2.4 Caracterização de nanomateriais

As principais técnicas de caracterização utilizada para nanocápsulas são as de tamanho de partícula, formato, eficiência de encapsulamento, potencial zeta e estabilidade térmica (GHOSH e PARIA, 2011; ESTEVINHO *et al.*, 2013).

Para a obtenção de informações como distribuição do tamanho de partícula e formato, pode-se utilizar por exemplo as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) ou de transmissão (MET), ou a técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS). Ressaltando ainda que as análises de MET também possibilitam a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, além da determinação da espessura da parede formada, no caso de nanocápsulas (GHOSH e PARIA, 2011). De forma geral, é de grande interesse a obtenção de nanopartículas com distribuição unimodal e com baixo índice de polidispersão, ou seja, que seja observada homogeneidade de tamanhos de partícula (CHO *et al.*, 2013).

Dois fatores que influenciam no diâmetro médio das partículas e na polidispersão são a composição e o método de preparação. No caso de nanocápsulas, as propriedades (viscosidade, hidrofobicidade, etc) do óleo contido no núcleo são determinantes (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1996; GHOSH e PARIA, 2011). Ressalta-se que o

monitoramento da tendência a sedimentação e agregação de nanopartículas pode ser visto pela mudança na distribuição de tamanho de partícula (CHO *et al.*, 2013).

Todo material em contato com um meio líquido pode adquirir uma carga elétrica na superfície, o que causa uma mudança na distribuição de íons na sua vizinhança, proporcionando um aumento de contra-íons próximo à superfície, o que dá origem à chamada dupla camada elétrica. Quando a partícula se movimenta, na presença de um campo elétrico, ela carrega ligada fortemente a ela uma camada dos contra-íons, formando um só sistema. O potencial zeta corresponde ao potencial elétrico no plano de cisalhamento entre esse sistema formado e o meio que o circunda (SALIM *et al.*, 2005). Sua medição pode ser realizada aplicando um campo elétrico no líquido onde as partículas estão dispersas. Equipamentos que integram a técnica de espalhamento de luz (DLS) com a presença de um campo elétrico são capazes de fazer esta medição. Portanto, como forma de verificar o potencial de superfície das nanopartículas, pode-se acompanhar o potencial zeta, medido por meio de técnicas de eletroforese, que avalia a mobilidade eletroforética das nanopartículas em suspensão. Este potencial é diretamente influenciado por mudanças na interface da partícula com o meio onde está dispersa, devido a dissociação de grupos funcionais na superfície ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio (CHO *et al.*, 2013).

Uma outra forma de avaliar a estabilidade de suspensões de nanopartículas é a partir da medição de seu pH no decorrer do tempo, visto que a alteração do pH pode indicar a degradação do polímero (SCHAFFAZICK,2003).

Para avaliar a eficiência de encapsulamento, uma técnica muito utilizada é a de ultrafiltração-centrifugação da suspensão de nanopartículas com membranas, possibilitando a determinação da concentração do ativo no sobrenadante, ou seja, a quantidade de ativo que não foi encapsulado. Dentre os fatores que influenciam no encapsulamento de ativos, podem-se citar as características físico-químicas do ativo e do agente encapsulante, o pH do meio dispersante, as características da superfície da partícula, a quantidade de ativo adicionado e o tipo e quantidade de surfactente utilizado na formulação (GHOSH e PARIA, 2011; CHO *et al.*, 2013).

Uma maneira de verificar a forma de associação e interações entre o agente encapsulante e o ativo é a partir da técnica de espectroscopia no infravermelho (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) (CHO *et al.*, 2013).

A partir dos espectros de infravermelho é possível obter informações sobre o padrão de interação entre os biopolímeros que compõem a casca da nanocápsula e o padrão de liberação do óleo essencial. Para um sistema eficaz de liberação de ativo, é necessário que a interação entre a matriz polimérica e o ativo não seja forte (JAMIL *et al.*, 2016). Esta técnica é capaz de identificar diferentes tipos de ligações químicas em uma molécula a partir da produção de um espectro de absorção de infravermelho (NATRAJAN *et al.*, 2015).

Para avaliar a ação antioxidante de um composto, uma das alternativas é utilizar o método do DPPH•. Segundo DUARTE-ALMEIDA *et al.* (2006), este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que perde sua coloração púrpura ao sofrer redução, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. É um método indireto, mas eficaz para verificação da atividade antioxidante de produtos naturais (BORGES *et al.*, 2011). A partir dos resultados obtidos, pode-se determinar a porcentagem de atividade antioxidante e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional.

2.5 Considerações gerais

A partir da revisão bibliográfica apresentada, percebe-se que, apesar da utilização crescente de materiais nanoestruturados em formulações cosméticas, uma das principais barreiras do setor de *skin care* ainda é a dificuldade na penetração de ativos na pele.

Desta forma, a proposta de facilitar a penetração cutânea por meio da otimização das características das nanocápsulas e de sua funcionalização pode se tornar mais um passo essencial para alcançar o grau de penetração desejado.

CAPÍTULO III

Metodologia

Neste capítulo são listados e descritos os materiais, equipamentos, métodos e caracterizações empregados para o desenvolvimento desta pesquisa. Os procedimentos descritos são os de síntese de nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana, extração e purificação de hialuronidase proveniente de testículos bovinos e funcionalização das nanocápsulas com hialuronidase.

Os métodos de caracterização foram realizados com o intuito de obter informações de potencial zeta, índice de polidispersão, distribuição do tamanho, estabilidade físico-química, eficiência de encapsulamento, perfil de liberação *in vitro* de α -Bisabolol, além de teor de proteína e atividade enzimática da hialuronidase extraída.

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes e soluções

- a) Síntese de nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana
- Água deionizada ultrapura Milli-Q®
 - Álcool etílico, EtOH, álcool absoluto 200 Proof, Tedia, Fairfield;
 - Alginato de sódio, Alginic acid Sodium salt from brown algae, Fluka Biochemika;
 - Quitosana de baixo peso molecular, Sigma-Aldrich;
 - α -Bisabolol, Citróleo, gentilmente doado pela Profa. Dra. Patrícia Fontes Pinheiro (Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo);
 - Tween 80 P.S. (Polissorbato), Vetec Química – Sigma-Aldrich;
 - Ácido acético glacial 99,8% supra puro, Vetec Química – Sigma-Aldrich;
 - Cloreto de cálcio PA (CaCl_2), calcium chloride dehydrate, Vetec Química – Sigma-Aldrich;
 - Hidróxido de Sódio (NaOH), Vetec Química – Sigma-Aldrich.

b) Extração e purificação de hialuronidase proveniente de testículos bovinos

- Água deionizada ultrapura Milli-Q®
- Sacarose PP. A. ACS, Vetec Química – Sigma-Aldrich.
- Ácido Clorídrico (HCl), Vetec Química – Sigma-Aldrich.
- Hidróxido de Sódio (NaOH), Vetec Química – Sigma-Aldrich
- Testículos bovinos (adquiridos em Vitória – ES)
- Hidroxiapatita – Sigma-Aldrich

Dosagem de proteína:

- Água deionizada ultrapura Milli-Q®
- Azul de Coomassie Brilhante G-250 (CI. 42655), Vetec Química – Sigma Aldrich
- Álcool etílico, EtOH, álcool absoluto 200 Proof, Tedia, Fairfield;
- Ácido fosfórico (orto) (H₃PO₄) 85% PP. A. ACS, Vetec Química – Sigma Aldrich
- Albumina de Soro Bovino (BSA) Fração V, InLab

Atividade enzimática:

- Água deionizada ultrapura Milli-Q®
- Ácido hialurônico, Mapric
- Fosfato de Sódio Monobásico Anidro PP. A., Vetec Química – Sigma-Aldrich
- Fosfato de Sódio Dibásico Anidro PP. A., Vetec Química – Sigma-Aldrich
- Cloreto de Sódio (NaCl) USP, Vetec Química – Sigma-Aldrich.
- Ácido Clorídrico (HCl), Vetec Química – Sigma-Aldrich.
- Acetato de Sódio Anidro PP. A. ACS ; Vetec Química – Sigma-Aldrich.
- Albumina de Soro Bovino (BSA) Fração V, InLab
- Ácido acético glacial 99,8% supra puro, Vetec Química – Sigma-Aldrich;

3.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético múltiplo, Fisatom;
- Balança analítica, Gehaka (AG-200), usada para pesagem dos materiais requeridos em cada etapa;
- Centrífuga, Eppendorf, Centrifuge 5810R, com rotor A-4-81, utilizada na separação dos produtos das reações realizadas;
- Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Zeta PALS, Zeta Potential Analyzer, Brookhaven, pertencente ao Laboratório de Bioquímica da professora Débora Foguel (CCS/UFRJ). Utilizado para medir o potencial zeta (ζ) e a distribuição do tamanho das partículas.
- Espectrofotômetro de Infravermelho - Perkin Elmer Spectrum Frontier FT-IR/FIR (LAPIN1/IMA/UFRJ)
- Espectroscópio de absorção no UV-visível, Bel Photonics, UV-vis spectrophotometer, UV-M51, pertencente ao laboratório Grifit.
- Evaporador rotativo (Fisatom® 802, São Paulo, Brasil);
- Liquidificador, Britânia Cristal 700
- Shaker com agitação orbital, TECNAL, TE-420 Incubadora, empregado nos testes de liberação;
- Sonicador, Hielscher (Modelo UP100H), utilizado para homogenizar as soluções referente ao recobrimento das nanopartículas com sílica;

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese de nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana

As nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana foram obtidas seguindo três etapas: emulsificação, gelificação ionotrópica e remoção de solvente, baseando-se nos trabalhos de LERTSUTTHIWONG *et al.* (2009), LERTSUTTHIWONG e ROJSITTHISAK (2011) e NATRAJAN *et al.* (2015).

a) Emulsificação

Inicialmente, em banho de gelo (Figura 11), foram gotejados 0,6 mL de solução etanólica de α -Bisabolol (20 mg/mL) em 20 mL de solução aquosa de alginato (0,3 mg/mL) e Tween 80 (1% m/v). O pH desta solução foi mantido em 7 com o auxílio de uma solução aquosa de NaOH (1M). Após 15 minutos de agitação no sonicador com amplitude de 100%, foram adicionados 4 mL de solução aquosa de cloreto de cálcio (0,67 mg/mL) e, em seguida, a solução foi agitada por mais 30 minutos no sonicador.



Figura 11: Aparato experimental para síntese das nanopartículas

b) Gelificação ionotrópica

A emulsão formada na etapa (a) foi então combinada com 4 mL de solução aquosa de quitosana (0,6 mg/mL) em 1% (v/v) de ácido acético e agitada por mais 30 minutos no sonicador. A solução de quitosana foi mantida em pH 4,3. A suspensão formada foi mantida em repouso por 12h para alcançar o equilíbrio.

c) Remoção do solvente

Para realizar a remoção do etanol da suspensão formada na etapa (b) foi utilizado um evaporador rotativo a 40 °C durante 20 minutos.

Por fim, o produto obtido foi centrifugado à 6000 rpm por 10 min, sendo separado o sobrenadante para análises posteriores, e o precipitado submetido à três lavagens com água deionizada ultrapura. A cada lavagem, os precipitados eram acrescidos de 20 mL de água e passados pela centrífuga à 6000 rpm por 5 min. Ao final, os precipitados foram deixados em suspensão em água.

3.2.2 Extração e purificação de hialuronidase proveniente de testículos bovinos

Seguindo o procedimento descrito por GONÇALVES (2007), a extração da hialuronidase proveniente de testículos bovinos foi realizada em três etapas: extração aquosa, precipitação de contaminantes e adsorção de proteínas contaminante em hidroxiapatita. Na Figura 12 é apresentado o fluxograma do procedimento adotado.

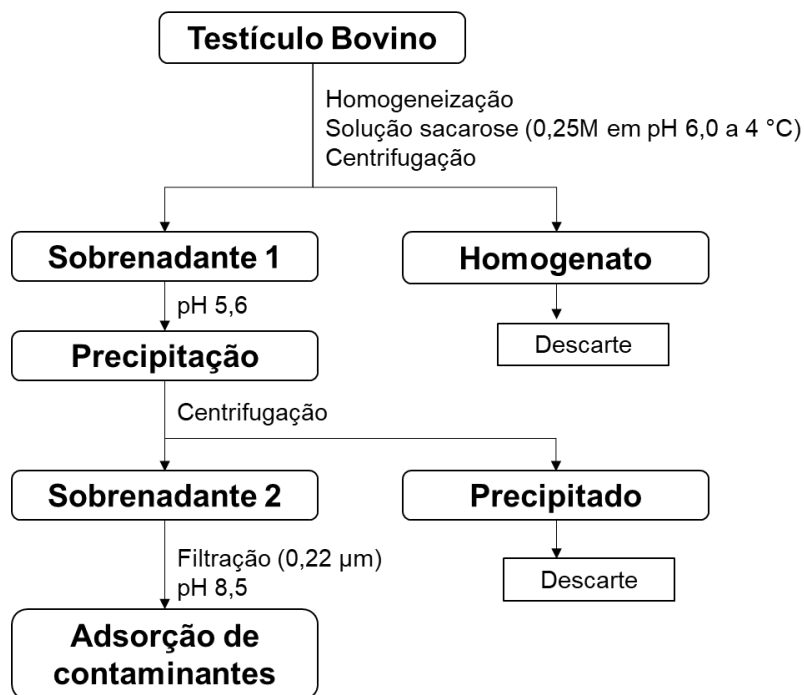


Figura 12: Fluxograma do procedimento de extração e purificação da enzima hialuronidase de testículos bovinos

Na primeira etapa, de extração aquosa, os testículos (Figura 13) foram limpos, a membrana que os envolve, o epidídimo, foi retirada, e 10 g de massa de testículos foram homogeneizados com 100 mL de solução extratora de sacarose (0,25M em pH 6 a 4 °C) durante 5 minutos utilizando-se um liquidificador (Britânia Cristal 700, - potência máxima).

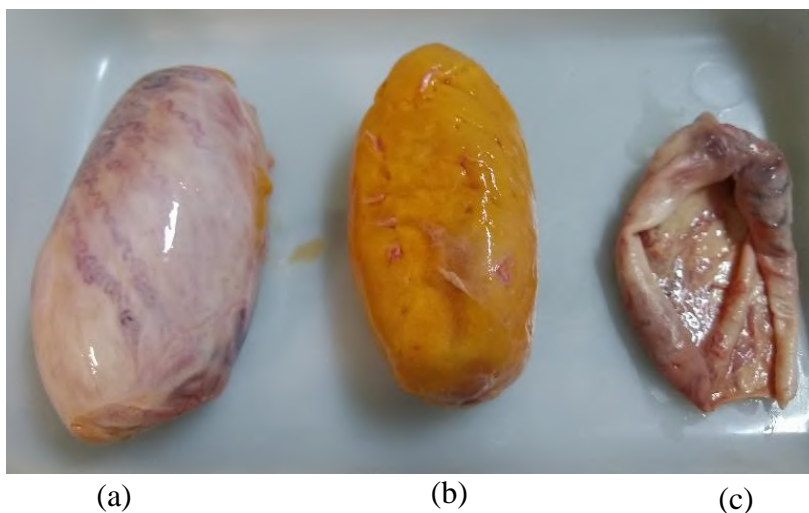


Figura 13: (a) Testículo bovino; (b) Testículo bovino sem o epidídimo; (c) Epidídimo

Na segunda etapa, de precipitação de contaminantes, o extrato foi centrifugado por 20 minutos a 5000 rpm, a parte sólida foi descartada, obtendo-se o sobrenadante 1 com pH inicial igual a 8,5. O pH do sobrenadante 1 foi então ajustado com uma solução de HCl 1M para o valor de pH 5,6, havendo formação de precipitado. Esta solução foi então centrifugada por 5 minutos com rotação de 5.000 rpm. O homogenato foi descartado e obteve-se então o sobrenadante 2.

O sobrenadante 2 foi filtrado em membrana de acetato de celulose (Millipore GSWP047S0) 0,22 μm de poro e, para a realização da última etapa, a de adsorção de contaminantes em hidroxiapatita, o pH do sobrenadante 2 que era de 5,6 foi reajustado para o valor 8,5 (pH onde há uma baixa adsorção da proteína) com solução de NaOH 1M. Este procedimento foi realizado com base nos estudos de GONÇALVES (2007), que observou a adsorção preferencial das proteínas contaminantes neste pH.

A adsorção foi realizada sem agitação, durante 24h a 25 °C, de forma a induzir a migração da hialuronidase para interface ar-água, ao invés de priorizar a adsorção da enzima na hidroxiapatita. Para os ensaios foram utilizados 0,075 g de hidroxiapatita e 30 mL dos extratos diluídos 100 vezes.

De forma a avaliar a eficiência do método utilizado, os resultados foram acompanhados pela dosagem de proteína e pelo consumo de ácido hialurônico em ensaio de atividade enzimática das amostras antes e depois da adsorção.

Dosagem de proteína

Para avaliar a dosagem de proteína, adotou-se o método de Bradford, que se baseia na observação da mudança de coloração do reagente Azul Brilhante de Coomassie G-250 ao se ligar à proteína. O complexo é formado rapidamente, em cerca de 2 minutos, e permanece disperso em solução por aproximadamente uma hora, o que permite grande sensibilidade na dosagem das proteínas (BRADFORD, 1976).

Inicialmente, preparou-se a solução corante, onde 50 mg de Azul Brilhante de Coomassie G foram dissolvidos em 25 mL de álcool etílico (95%), sob agitação constante. Em seguida, foram adicionados 50 mL de ácido fosfórico a 85%. A solução resultante foi então diluída com 500 mL de água MilliQ. A solução foi filtrada para remoção do corante não dissolvido e estocada a 4 °C.

A curva de calibração para dosagem de proteína foi construída utilizando-se albumina de soro bovino (BSA). Os pontos da curva foram obtidos com alíquotas de 0,6 mL de solução de BSA nas concentrações de 0,02 g/L a 0,1 g/L em 6 mL de solução corante. As amostras foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 600 nm. O zero do espectrofotômetro foi ajustado com uma amostra de 0,6 mL em água MilliQ em 6 mL de solução corante. Para a quantificação da dosagem de proteína nos extratos de hialuronidase, antes e após a adsorção de contaminantes, foram analisadas amostras de 0,6 mL de extrato de hialuronidase em 6 mL de solução corante. A curva e as amostras foram analisadas em triplicata.

A partir do método descrito é possível quantificar a dosagem de proteína total em solução, porém, para a análise em separado da hialuronidase, fez-se necessário um método mais específico. Desta forma, foi realizado também o método de avaliação de

atividade enzimática utilizando o ácido hialurônico como substrato, conforme é descrito a seguir.

Atividade enzimática da hialuronidase

Foi adotado o método de TOLKSDORF e MCCREADY (1949), que se baseia na medida de turbidez formada pela interação entre o ácido hialurônico e a albumina bovina em meio ácido, a partir da redução da N-acetilglucosamina. A quantificação de atividade enzimática se dá a partir de duas reações. Na primeira, cujo tempo de duração é de 10 minutos, a hialuronidase cliva o ácido hialurônico. Na segunda, onde é realizada a quantificação da atividade enzimática, o ácido hialurônico que não reagiu com a hialuronidase reage com uma solução de BSA hidrolisada. Esta reação também tem tempo de 10 minutos e o produto da segunda reação é uma solução turva. Para os testes é necessário o preparo de uma curva de calibração utilizando técnicas espectroscópicas, sendo o grau de turbidez associado a uma quantidade preestabelecida de ácido hialurônico.

Para o teste enzimático foram preparadas as seguintes soluções:

- Tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 5,3 com NaCl 0,15 M);
- Tampão acetato de sódio (0,5 M, pH 4,2)
- Solução de BSA: Foram dissolvidos 2,5 g de Albumina Bovina Fração V em 250 mL de tampão acetato de sódio (0,5 M, pH 4,2). O pH da solução resultante foi ajustado para 3,0 com uma solução de HCl 2M e aquecida a 93 °C durante 30 minutos. Por fim, a solução foi resfriada e adicionou-se tampão acetato de sódio (0,5 M, pH 4,2) até completar o volume de 1L.
- Solução de Ácido Hialurônico: Foram dissolvidos 10 mg de ácido hialurônico em 25 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 5,3 com NaCl 0,15 M). Para garantir a solubilização, a solução foi aquecida em banho de água fervente durante 15 minutos e mantida a temperatura ambiente durante 12h.

A curva de calibração foi preparada conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Curva de calibração para teste enzimático

Tubo	Solução de HA (mL)	Tampão fosfato de sódio (mL)	Solução de BSA (mL)
1 (controle)	0	1,0	9
2	0,1	0,9	9
3	0,2	0,8	9
4	0,3	0,7	9
5	0,4	0,6	9
6	0,5	0,5	9
7	0,6	0,4	9
8	0,7	0,3	9
9	0,8	0,2	9
10	0,9	0,1	9

Após adicionar a solução de ácido hialurônico e o tampão fosfato, todos os tubos foram mantidos em banho de água fervente durante 5 minutos. Em seguida, foram resfriados a temperatura ambiente e adicionaram-se 9 mL de solução de BSA em cada tubo. A solução permaneceu em repouso durante 10 minutos. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Para a quantificação de atividade enzimática, foram pipetados 0,5 mL de solução de ácido hialurônico em uma série de tubos e incubados a 37 °C durante 5 minutos, de forma que alcançassem a temperatura de equilíbrio. Em cada tubo foram adicionados 0,5 mL de solução de hialuronidase. Os tubos foram então incubados por exatamente 10 minutos e, em seguida, resfriados em banho de gelo até a temperatura ambiente. Então, foram adicionados 9 mL de solução de BSA em cada tubo. Por fim, foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos e seu conteúdo foi analisado em espectrofotômetro ($\lambda = 540 \text{ nm}$).

Para o cálculo da atividade enzimática da hialuronidase, utiliza-se a relação apresentada em GONÇALVES (2007), onde afirma que uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que consome 0,75 μg de ácido hialurônico em pH 5,3 a 37 °C no tempo de 10 minutos.

3.2.3 Síntese de nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana funcionalizadas com hialuronidase

Foram adotadas três estratégias diferentes para a funcionalização das nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana com hialuronidase, como pode ser visto na Figura 14.

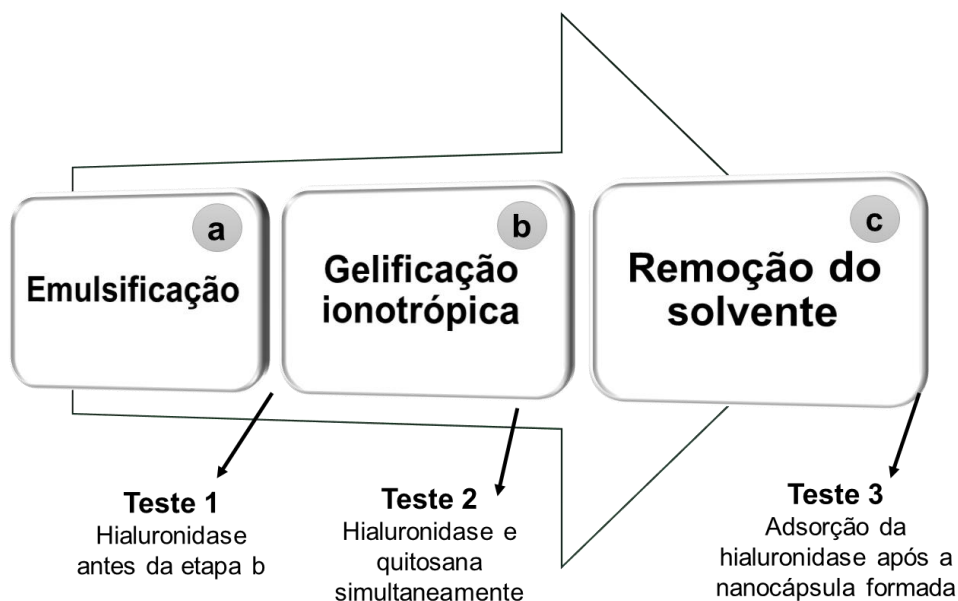


Figura 14: Estratégias adotadas para a funcionalização das nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana com hialuronidase

No Teste 1, seguiu-se o mesmo procedimento de gelificação ionotrópica apresentado anteriormente, porém, como tentativa de funcionalizar as nanocápsulas com hialuronidase, 2 mg de hialuronidase ressuspendidas em 4 mL de água MilliQ foram adicionadas à reação ao final da etapa (a). Já no Teste 2, as soluções aquosas de hialuronidase (2 mg em 4 mL de água MilliQ) e quitosana foram adicionadas simultaneamente. Por fim, no Teste 3, foi adotada a estratégia de adsorção de proteína na superfície das nanocápsulas, baseado no procedimento de MONDAL *et al.* (2015) descrito a seguir. Esta etapa será melhor detalhada a seguir.

Adsorção de hialuronidase na superfície das nanocápsulas

O procedimento de adsorção da hialuronidase foi conduzido em triplicata. Foram preparados meios reacionais com 5 mg de nanocápsulas ressuspendidas em 2 mL de água MilliQ e 2 mg de hialuronidase ressuspendidas em 2 mL de água MilliQ. Ajustou-se o pH do meio reacional para 6,0 com tampão acetato. Os frascos foram mantidos a 37 °C, com agitação de 200 rpm, por períodos de tempo determinados (de 0 a 60 minutos), de forma que a cinética de adsorção pudesse ser avaliada. Os conteúdos dos frascos, após atingirem o tempo especificado, foram filtrados em membrana de ultrafiltração de 100 kDa MWCO (Microcon, Millipore, Billerica, MA, USA) e lavadas 3 vezes com água MilliQ. A dosagem de hialuronidase contida no sobrenadante foi avaliada utilizando-se o método de Bradford, descrito anteriormente.

O pKa da quitosana é em torno de 6,5 (MONDAL *et al.*, 2015). Dessa forma, em valores de pH abaixo de 6,5 os grupos amina estão protonados, oferecendo mais locais de ligação para a hialuronidase. Além disso, a hialuronidase testicular bovina possui ponto isoelétrico (pI) em torno de 5,4 (FREEMAN *et al.*, 1950), ou seja, pode se adsorver mais facilmente via interações eletrostáticas em valores de pH maiores que 5,4. Sabe-se ainda que, de acordo com MONDAL *et al.* (2015), em soluções com pH menor que 5,5 pode ocorrer o inchamento das nanocápsulas que tem quitosana em sua composição, havendo assim sua desintegração. Desta forma, a melhor opção para adsorção da hialuronidase nas nanocápsulas é mantendo o meio reacional em $5,5 < \text{pH} < 6,5$, tendo-se escolhido o pH 6,0 para este teste.

3.3 Caracterizações

3.3.1 Distribuição de tamanho de partículas e potencial zeta

Neste trabalho, a distribuição de tamanho de partícula foi determinada por meio da técnica de espalhamento de luz. Com este método é possível obter um diâmetro hidrodinâmico médio, a curva de distribuição de tamanho e o índice de polidispersividade (XU, 2007). Para analisar a distribuição de tamanhos das nanopartículas formadas neste

trabalho, a amostra foi diluída em água deionizada ultrapura. Utilizou-se o equipamento Zeta Potential Analyzer (Brookhaven).

3.3.2 Estudo de estabilidade físico-química

A estabilidade físico-química das nanocápsulas durante a estocagem foi avaliada por um período de 75 dias sob duas condições: a 4 °C e 25 °C, em suspensão aquosa. O estudo foi feito por meio da análise da variação do tamanho de partícula e potencial zeta dos materiais nanoestruturados no decorrer do tempo de estocagem.

3.3.3 Análise de eficiência de encapsulamento

Neste trabalho, para a avaliação da eficiência de encapsulamento de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana, 2,5 mL de amostra contendo nanocápsulas, antes da etapa de remoção de solvente, foram centrifugados por meio de ultrafiltração (Amicon) em membrana de celulose (Millipore) de 3 kDa a 6000 rpm durante 10 minutos, sendo assim separadas do meio aquoso contendo o ativo não encapsulado. O sobrenadante foi quantificado por espectrofotometria com comprimento de onda de 208 nm. A curva de calibração foi construída utilizando diferentes concentrações de α -Bisabolol em etanol (1,25 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$). A eficiência de encapsulamento (EE%) foi calculada por meio da Equação 1.

$$EE\% = \left[\frac{(\text{Quantidade total de ativo}) - (\text{Quantidade de ativo não encapsulado})}{(\text{Quantidade total de ativo})} \right] \cdot 100\% \quad (1)$$

3.3.4 Ensaio de liberação *in vitro* de α -Bisabolol

Os ensaios de liberação *in vitro* de α -Bisabolol foram realizados em meio de fosfato-salino (PBS) com etanol 35% v/v, em triplicata, e em três diferentes condições, conforme apresentado na Tabela 3. No Teste 2 foi adicionado 1 mL de solução de HCl

1M, de forma a ajustar o pH de 7,2 para 5,5, de forma a obter um meio com condições similares às da pele humana.

O shaker tipo orbital operou a uma velocidade de 160 rpm e a uma temperatura de 37 °C. Já o sonicador, operou a uma amplitude de 0,5, ciclo 1 e em temperatura ambiente, sendo o intuito principal investigar se uma agitação mais rigorosa contribuiria para uma melhor liberação do ativo.

Tabela 3: Condições de ensaio de liberação *in vitro* de α -Bisabolol

	Teste 1	Teste 2	Teste 3
pH	7,2	5,5	7,2
Agitação	Shaker	Shaker	Sonicador
Temperatura	37 °C	37 °C	25°C
Tempos de coleta de alíquota (h)	1, 2, 3, 7, 10 e 12	1, 2, 3, 7, 10 e 12	1

Para os testes 1 e 2, o procedimento adotado foi adicionar as nanocápsulas ao sistema assim que o meio de liberação contido nos frascos atingisse 37°C e, em seguida, iniciar a contabilização do tempo.

Em todos os testes, amostras de 2 mL do meio foram retiradas a cada tempo de medida, foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi analisado no espectrofotômetro a 208 nm. O precipitado foi imediatamente redisperso em 2 mL do meio de liberação e essa suspensão foi adicionada de volta ao meio de origem.

3.3.5 Avaliação das interações entre os biopolímeros e o ativo

Os espectros de infravermelho (FTIR/ATR) do ativo e das nanoformulações previamente secas por liofilização foram obtidos utilizando pellets de KBr e resolução de 4 cm⁻¹ e 60 varreduras/amostra no espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum do Laboratório de Apoio Instrumental (LAPIN 1) do Instituto de Macromoléculas da

Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMA/UFRJ). Os espectros foram coletados entre 4000 e 600 cm^{-1} .

3.3.6 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do ativo e das nanocápsulas

Seguindo o procedimento descrito por PEREIRA (2015), para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do α -Bisabolol e das nanocápsulas formadas, foi adotado o método do radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), devido a sua relativa simplicidade e por permitir a avaliação de agentes antioxidantes lipofílicos, visto que o solvente utilizado na técnica é o metanol.

Sendo assim, foram preparadas, em triplicata, soluções metanólicas de 5 mg α -Bisabolol em 5 mL de metanol e 5 mg de nanocápsulas previamente secas por liofilização em 5 mL de metanol em 5 concentrações diferentes (0 a 10 mg/mL). A ruptura das nanocápsulas foi realizada por sonicação com amplitude de 100%. Em seguida, 50 μL de cada solução foram misturados com 2 mL de solução metanólica de DPPH (60 μM) e foram mantidas ao abrigo de luz durante 1 hora.

A análise das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis a 517 nm. Para a amostra controle utilizou-se metanol puro e para a solução controle utilizou-se a solução metanólica de DPPH (60 μM).

A porcentagem de inibição de cada amostra foi determinada de acordo com a Equação 2 (ABDOUL-LATIF *et al.*, 2011).

$$\text{Inibição (\%)} = 100\% - \left[\left(\frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right) 100\% \right] \quad (2)$$

Onde $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é o valor de absorbância do controle e $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorbância da amostra.

Os resultados obtidos são expressos em IC_{50} , que corresponde à inibição de 50% do DPPH. As porcentagens de inibição foram plotadas em função da concentração de cada amostra, e o IC_{50} foi calculado por regressão linear (MARTINS *et al.*, 2013).

CAPÍTULO IV

Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados da caracterização do ativo utilizado, da preparação das nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana por gelificação ionotrópica e sua caracterização, da extração de hialuronidase com avaliação de dosagem de proteína e atividade enzimática e, por fim, da funcionalização das nanocápsulas obtidas com a hialuronidase extraída.

4.1 Caracterização do ativo - α -Bisabolol

O ativo utilizado neste trabalho, o α -Bisabolol (~95% de pureza), foi cedido pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Campus de Alegre, por intermédio da Prof. Dra. Patrícia Fontes Pinheiro, em parceria com a empresa Citróleo. Essa substância foi devidamente caracterizada pela obtenção e análise dos espectros de massas e no infravermelho (IV) pelo grupo da Profa Patrícia, que também nos cedeu o resultado das análises.

Pelo espectro de massas (Figura 15) obtido para o α -Bisabolol, observou-se o pico do íon molecular $M.+ = 222$ (m/z) referente à massa molecular do referido composto, os outros fragmentos observados foram m/z= 204, 119, 109, 69, 43, que correspondem às massas típicas do padrão de fragmentação desse álcool sesquiterpênico.

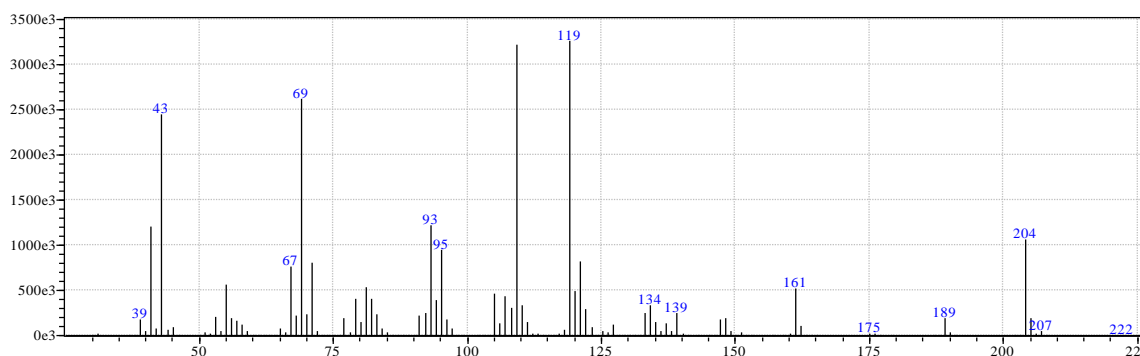


Figura 15: Espectro de massas do (-)- α -Bisabolol

O espectro no IV obtido para o α -Bisabolol, Figura 16, apresentou uma banda em forma de sino na região de 3409 cm^{-1} , típica do estiramento da ligação O-H. Na região de $2964\text{-}2914\text{ cm}^{-1}$ foram observadas bandas típicas de estiramento da ligação C-H e, em 1439 cm^{-1} foi observada uma banda característica da ligação C=C de alquenos (BARBOSA, 2007).

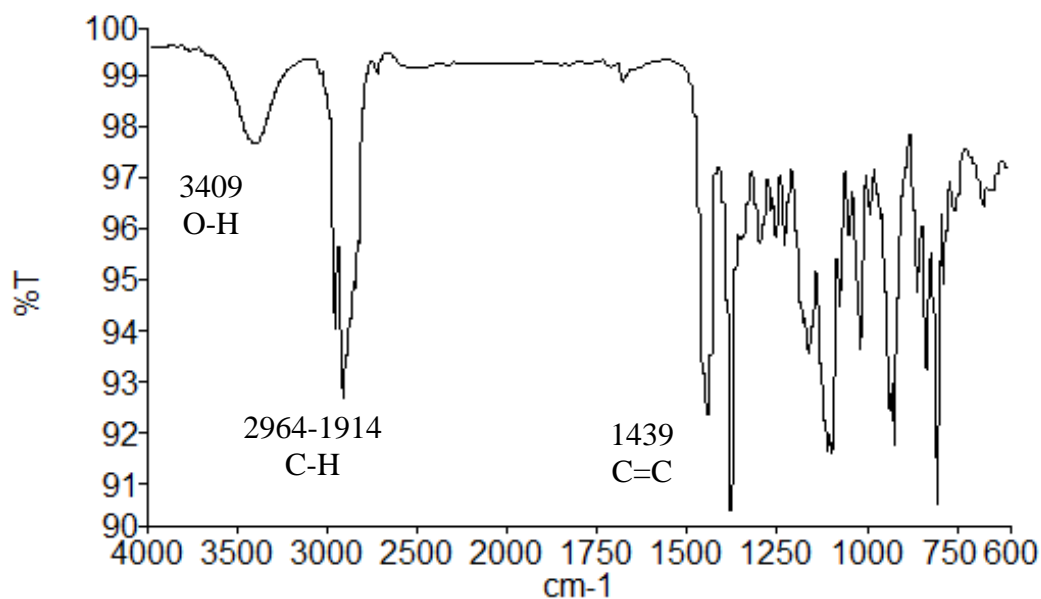


Figura 16: Espectro no infravermelho do α -Bisabolol

Após realizada sua caracterização, o α -Bisabolol foi utilizado como ativo na síntese das nanocápsulas propostas neste trabalho, cujos resultados de caracterizações são apresentados a seguir.

4.2 Caracterização das nanocápsulas não-funcionalizadas

4.2.1 Tamanho de partícula, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta

Nanopartículas de alginato-quitosana (controle) e nanocápsulas de α -Bisabolol em matriz de alginato-quitosana foram obtidas pelo método de gelificação ionotrópica. O

produto resultante destas reações são dispersões aquosas de nanopartículas/nanocápsulas com aspecto esbranquiçado, como pode ser visualizado na Figura 17.

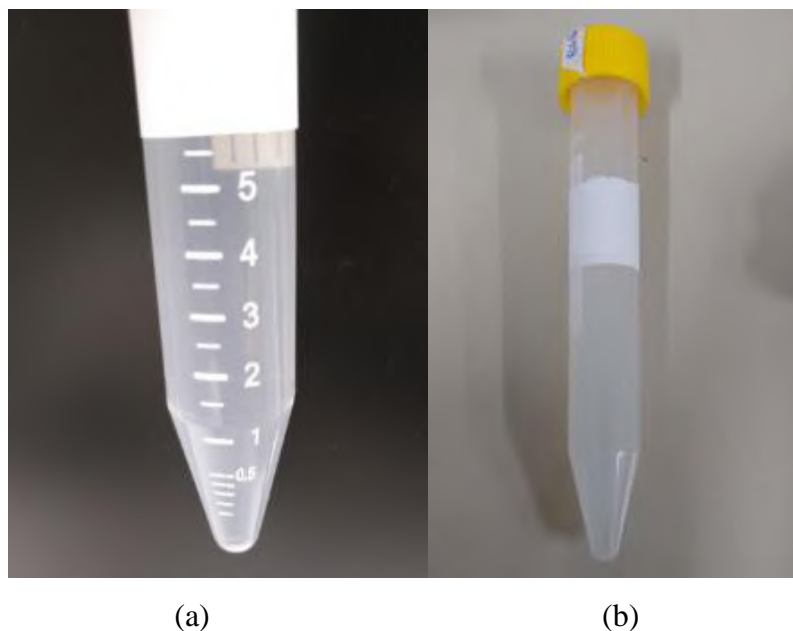


Figura 17: Produto obtido a partir da técnica de encapsulamento por gelificação ionotrópica (a) controle (sem ativo) e (b) com ativo.

Os resultados de distribuição de tamanho de partículas, índice de polidispersão e estabilidade foram obtidos por meio de análises de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

Na Figura 18 e na Figura 19 é possível observar os resultados de distribuição de tamanho de partículas para as nanopartículas de controle (sem ativo) e para as nanocápsulas, respectivamente.

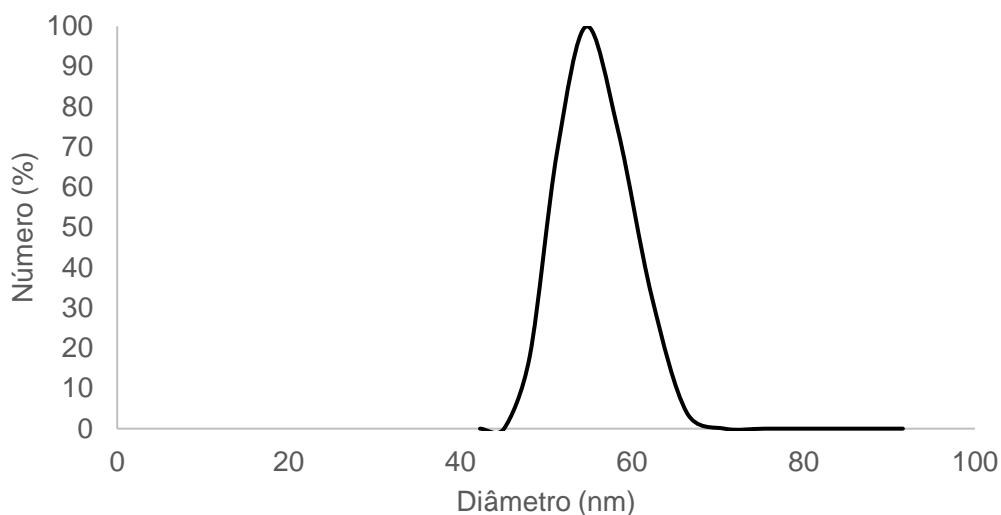


Figura 18: Distribuição de tamanho das nanopartículas sem o ativo (controle)

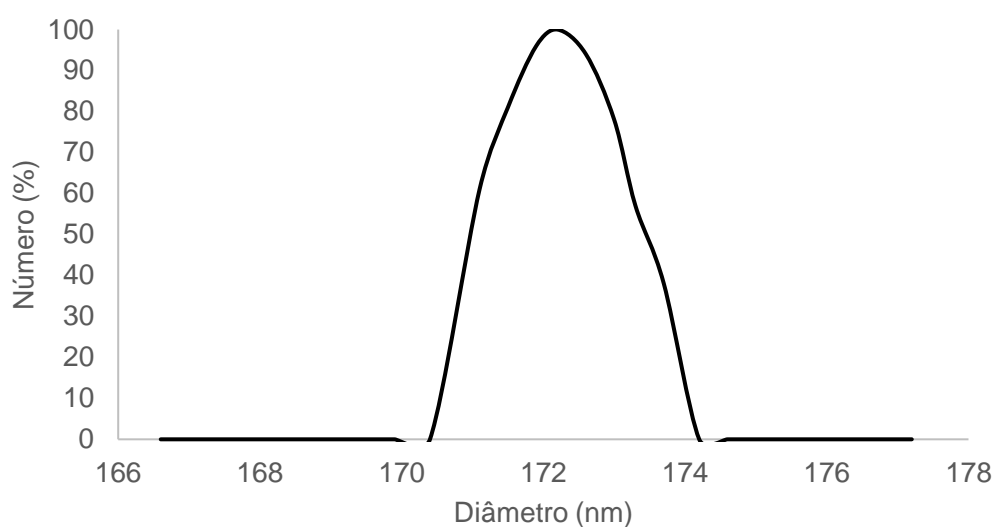


Figura 19: Distribuição de tamanho das nanocápsulas com o ativo

Além disso, é apresentada a Tabela 4 com os valores obtidos de diâmetro médio de partícula (D_p), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ).

Tabela 4: Diâmetro médio de partícula, IP e potencial zeta das nanoformulações

Amostra	Diâmetro médio de partícula – Dp (nm)	Índice de Polidispersão - IP	Potencial Zeta - ζ (mV)
Sem ativo (Controle)	55,5 ± 3,4	0,248	-14,70 ± 3,98
Com ativo	172,3 ± 14,0	0,005	-20,32 ± 1,15

É possível notar que ambas as amostras apresentaram uma distribuição unimodal com diâmetro médio de partícula dentro da faixa desejada, entre 50 e 300 nm, considerando que o objetivo principal deste trabalho é sua aplicação como parte das formulações de cosméticos para uso tópico.

O fato das nanocápsulas produzidas serem maiores que as nanopartículas (sem ativo) pode ser explicado, segundo ESMAEILI e EBRAHIMZADEH (2015), pelo aumento de viscosidade da fase orgânica decorrente da adição de óleo essencial ao meio reacional.

Nota-se também que o índice de polidispersividade de ambas manteve-se abaixo de 0,25, o que caracteriza um sistema monodisperso e com boa estabilidade coloidal, segundo MOHANRAJ e CHEN (2006).

Alguns fatores foram levados em consideração de forma a garantir que as partículas fossem formadas com o tamanho desejado. Dentre eles, foi realizado o controle de pH das soluções utilizadas, visto que, segundo NATRAJAN *et al.* (2015), nas condições de pH utilizadas, de aproximadamente 5, os grupos carboxila do alginato encontram-se ionizados e os grupos amina da quitosana encontram-se protonados, o que contribui para a formação do complexo e da estrutura nanométrica das nanocápsulas.

Além disso, de acordo com LERTSUTTHIWONG e ROJSITTHISAK (2011), o uso do surfactante Tween 80 e dos 15 minutos de sonicação depois da dispersão da

solução alcoólica de óleo essencial na solução aquosa de alginato são ideais para a obtenção de partículas com tamanho nanométrico.

A ordem de adição de CaCl_2 e quitosana também influencia de forma significativa, sendo mais vantajoso adicionar o CaCl_2 antes da solução aquosa de quitosana. Quando o CaCl_2 é adicionado primeiro, a interação entre os íons Ca^{+2} e o alginato forma uma estrutura conhecida como “caixa de ovos”. Desta forma, quando a quitosana é adicionada em seguida, ela estabiliza este sistema e produz partículas nanométricas. Porém, quando a adição é feita na ordem contrária, os grupos amina da quitosana interagem com o alginato de forma descoordenada, produzindo estruturas aleatórias, resultando em partículas maiores (LERTSUTTHIWONG e ROJSITTHISAK; 2011).

O potencial zeta das nanocápsulas depende principalmente da natureza química do polímero e do estabilizante utilizados e do pH do meio (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Analisando os valores de potencial zeta obtidos, supõe-se que o valor negativo encontrado para ambas as amostras é devido a presença de grupos carboxílicos encontrados nas extremidades das cadeias poliméricas que, quando expostas na superfície das nanocápsulas, expõem cargas negativas que fazem com que a carga líquida das partículas seja negativa (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

ABREU (2008) realizou um estudo sobre a variação do potencial zeta de hidrogéis de alginato-quitosana para diferentes valores de pH. A autora concluiu que, quanto maior o pH do meio, mais negativo se torna o potencial zeta. Em meios muito ácidos, os grupos amina da quitosana estão protonados, sendo responsáveis pela carga positiva do meio. Porém, a medida que o pH aumenta, como no caso deste trabalho (pH = 6,0), os grupos amino protonados se tornam desprotonados e os grupos carboxílicos do alginato se tornam ionizados, levando a uma diminuição nos potenciais.

Embora um potencial zeta positivo seja mais adequado à penetração na pele, partículas negativamente carregadas também possuem essa habilidade, como pode-se observar no trabalho de KOHLI e ALPAR (2004), que investigaram a penetração de nanopartículas de latex fluorescentes de 50 a 500 nm carregadas negativamente. Os autores concluíram que as nanopartículas foram capazes de penetrar a epiderme e que seu tamanho influenciou pouco nos resultados de penetração cutânea. Além disso, CUI e

MUMPER (2001) concluíram que partículas de quitosana carregadas negativamente foram capazes de induzir mais a proliferação de citocinas em comparação com partículas positivas quando aplicadas na pele. Ou seja, sua presença nas camadas mais internas da pele ficou mais evidente do que a presença das partículas positivas.

Com o intuito de analisar a estabilidade das nanocápsulas e nanopartículas no decorrer do tempo e em condições de armazenamento diferentes, foi realizado um estudo de estabilidade físico-química a partir de análises de DLS, cujos resultados são evidenciados no tópico a seguir.

4.2.2 Estudo de estabilidade físico-química

O estudo de estabilidade físico-química das amostras sem ativo e com ativo foi realizado em triplicata, durante um período de 75 dias e em condições de temperatura de 4 e 25 °C. Os resultados de diâmetro médio de partícula e potencial zeta são apresentados nas Figura 20 e na Figura 21, respectivamente.

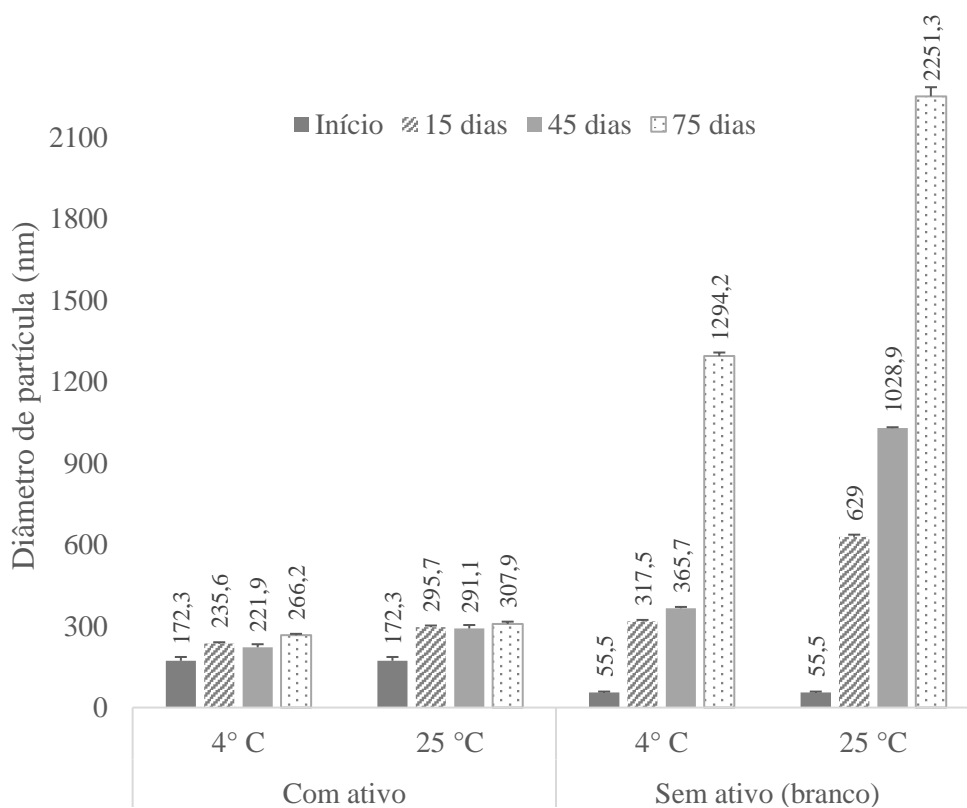


Figura 20: Observação do diâmetro médio de partícula das amostras sem ativo e com ativo durante 75 dias e a 4 e 25 °C.

Por meio da Figura 20, verifica-se que as amostras com o ativo, no decorrer do tempo de estudo, permaneceram dentro da faixa de tamanho ideal para a aplicação desejada, mesmo considerando o erro das medidas. Por outro lado, as amostras sem ativo ficaram cerca de 40 vezes maiores a 25 °C, ou seja, aumentaram de tamanho significativamente. Provavelmente ocorreu o inchamento das mesmas, visto que se encontravam em meio aquoso, e a ausência da fase interna (do óleo), aumenta a afinidade pela fase aquosa, dado que são hidrocolóides.

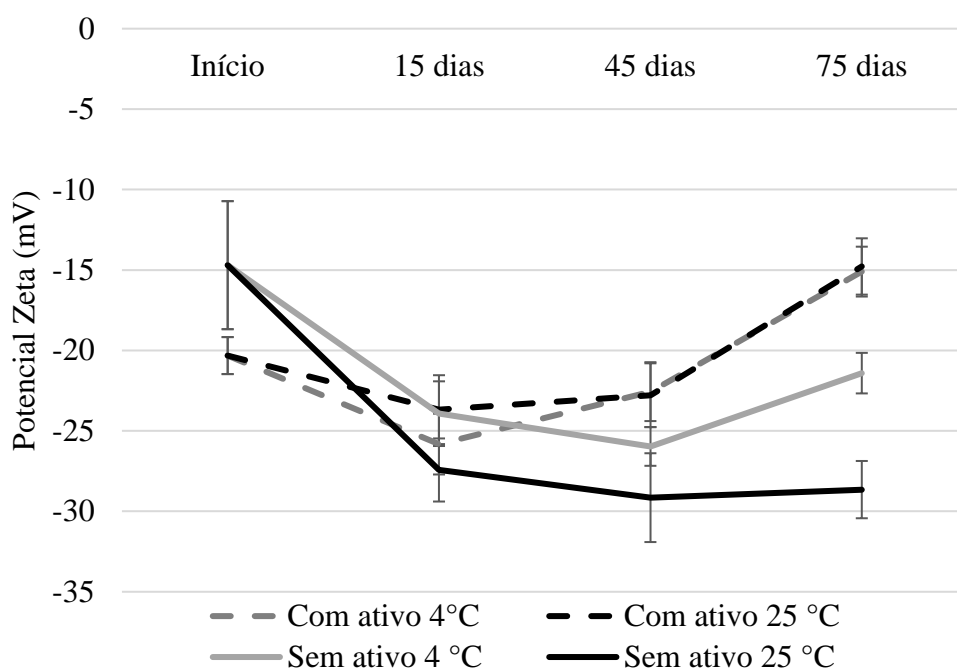


Figura 21: Observação do potencial zeta das amostras sem ativo e com ativo durante 75 dias e a 4 e 25 °C em pH 6,0.

A partir da Figura 21, verifica-se que o potencial zeta da amostra contendo o ativo mantém-se aproximadamente constante, considerando os erros atrelados às medições. Já a amostra sem ativo se torna cada vez mais negativa com o passar do tempo. Ou seja, o possível inchamento das nanopartículas provocou a variação da densidade de cargas superficiais, o que possivelmente prejudicaria a interação entre estas nanopartículas e a pele, visto que quanto mais negativas, menor seria a interação. Desta forma, sugere-se que a presença do ativo tornou a nanocápsula menos instável do que a nanopartícula sem ativo.

4.3 Avaliação da eficiência de encapsulamento (%EE)

A curva de calibração para avaliação da eficiência de encapsulamento (Figura 22) foi obtida por meio de análises em triplicata da absorbância de soluções etanólicas de α -Bisabolol em concentrações entre 1,25 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

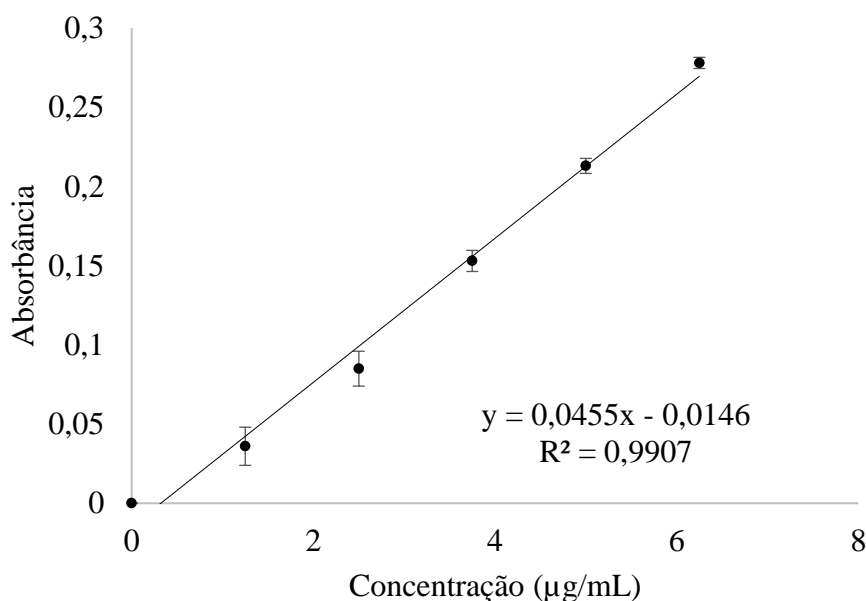


Figura 22: Curva de calibração para análise de eficiência de encapsulamento de α -Bisabolol

Após o procedimento de ultrafiltração das dispersões aquosas de nanocápsulas e nanopartículas, os sobrenadantes foram analisados em espectrofotômetro de UV-Vis a 208 nm para quantificação do α -Bisabolol que não foi encapsulado. Desta forma, realizando as análises em triplicata, foi obtido um valor de absorbância igual a $0,272 \pm 0,003$, o que corresponde a uma concentração de $6,299 \pm 0,389 \mu\text{g/mL}$, segundo a relação encontrada na curva de calibração ($y=0,0455 \cdot x - 0,0146$ $R^2=0,9907$). Dado que a concentração inicial de α -Bisabolol na reação foi de $419,58 \mu\text{g/mL}$, pode-se afirmar que 98,50% do α -Bisabolol utilizado foi encapsulado. Além disso, com esse resultado, verifica-se que os

agentes encapsulantes e a técnica de encapsulamento utilizados foram adequados para o encapsulamento do α -Bisabolol.

4.4 Avaliação das interações casca-núcleo

Por meio de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (no inglês *Attenuated Total Reflectance/ Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy* – ATR/FTIR), foram obtidos os espectros do α -Bisabolol (Figura 23(a)), das nanopartículas sem o ativo Figura 23(b)) e das nanocápsulas com o ativo (Figura 23(c)).

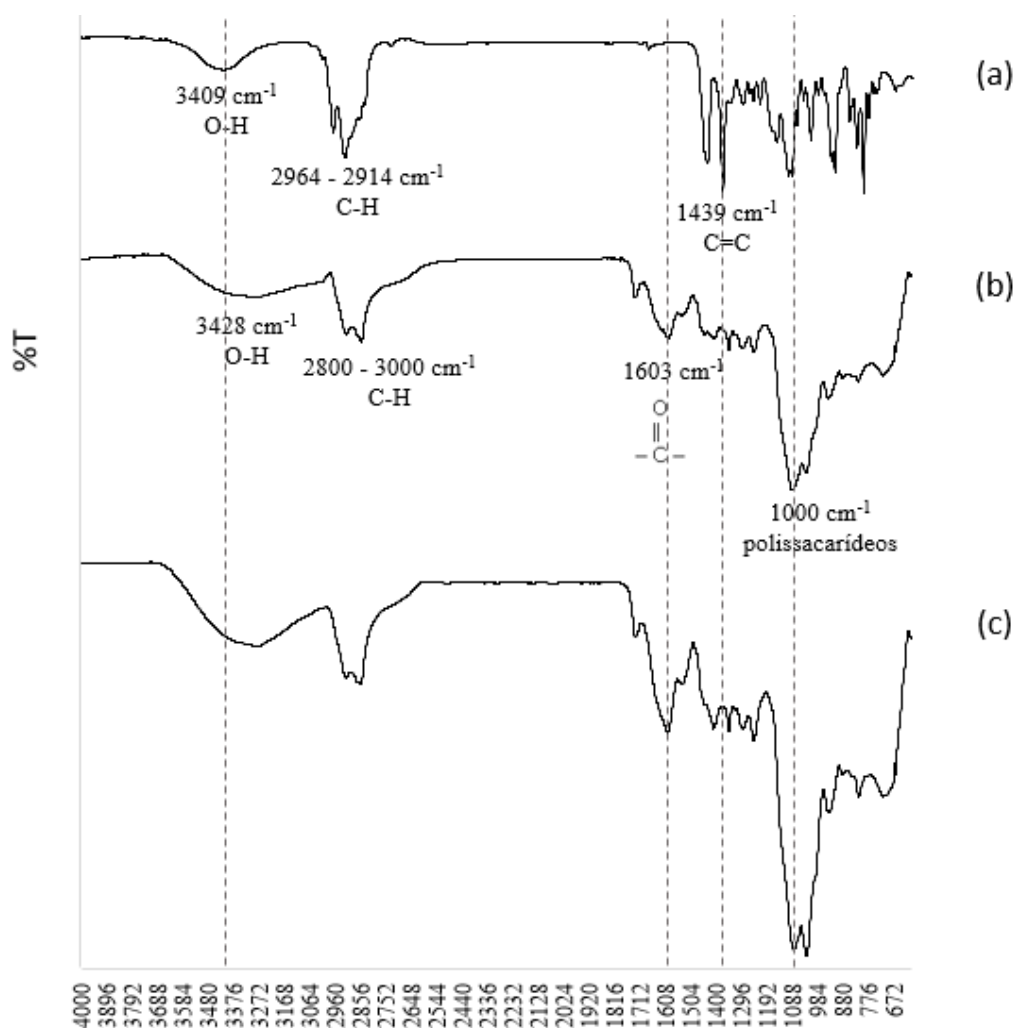


Figura 23: Espectros de ATR/FTIR de (a) α -Bisabolol, (b) nanopartículas sem o ativo e (c) nanocápsulas com o ativo

Conforme discutido anteriormente na caracterização do α -Bisabolol, na Figura 23 (a), referente ao espectro do α -Bisabolol, é possível observar uma banda em forma de sino em 3409 cm^{-1} , típica do estiramento da ligação O-H. Na região de $2964\text{--}2914\text{ cm}^{-1}$ foram observadas bandas típicas de estiramento da ligação C-H e, em 1439 cm^{-1} foi observada uma banda característica da ligação C=C de alquenos (BARBOSA, 2007).

Já na Figura 23(b), correspondente ao espectro das nanopartículas sem ativo, observa-se a formação de um pico em 1603 cm^{-1} , correspondente ao grupo carbonila da amida primária formada por interações iônicas entre o alginato e a quitosana (RIBEIRO *et al.*, 2005). Foram observadas ainda bandas entre 2800 e 3000 cm^{-1} , relativas à vibração axial das ligações C-H. Os picos encontrados em torno de 1000 cm^{-1} são característicos em polissacarídeos (SHAHID *et al.*, 2013). O pico em 3428 cm^{-1} indica a presença do grupo hidroxila do alginato (DAS *et al.*, 2010). O pico 1080 cm^{-1} indica o grupo amina da quitosana.

O espectro das nanocápsulas contendo α -Bisabolol, Figura 23(c), é similar ao espectro sem o ativo. Este resultado era esperado e indica que não houve migração do α -Bisabolol para as camadas mais superficiais das nanocápsulas. Ou seja, sabendo-se que a técnica de ATR/FTIR analisa a superfície da partícula, assume-se que, como não foi detectado pela técnica, o α -Bisabolol encapsulado encontra-se no núcleo da nanocápsula.

Sugere-se para trabalhos futuros que também seja utilizada a técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) para esta etapa de caracterização, visto que, a partir dela é possível verificar se houve alteração na estabilidade térmica das nanocápsulas e, portanto, demonstrando sua interação.

4.5 Ensaio de liberação *in vitro* do ativo encapsulado

Com o intuito de avaliar a taxa de liberação do ativo encapsulado, foram realizados três testes no ensaio de liberação. Os resultados dos Testes 1 e 2, utilizando um agitador do tipo “shaker” para efetuar a agitação do meio, e duas condições distintas de pH, 7,2 e 5,5, respectivamente, são apresentados na Figura 24.

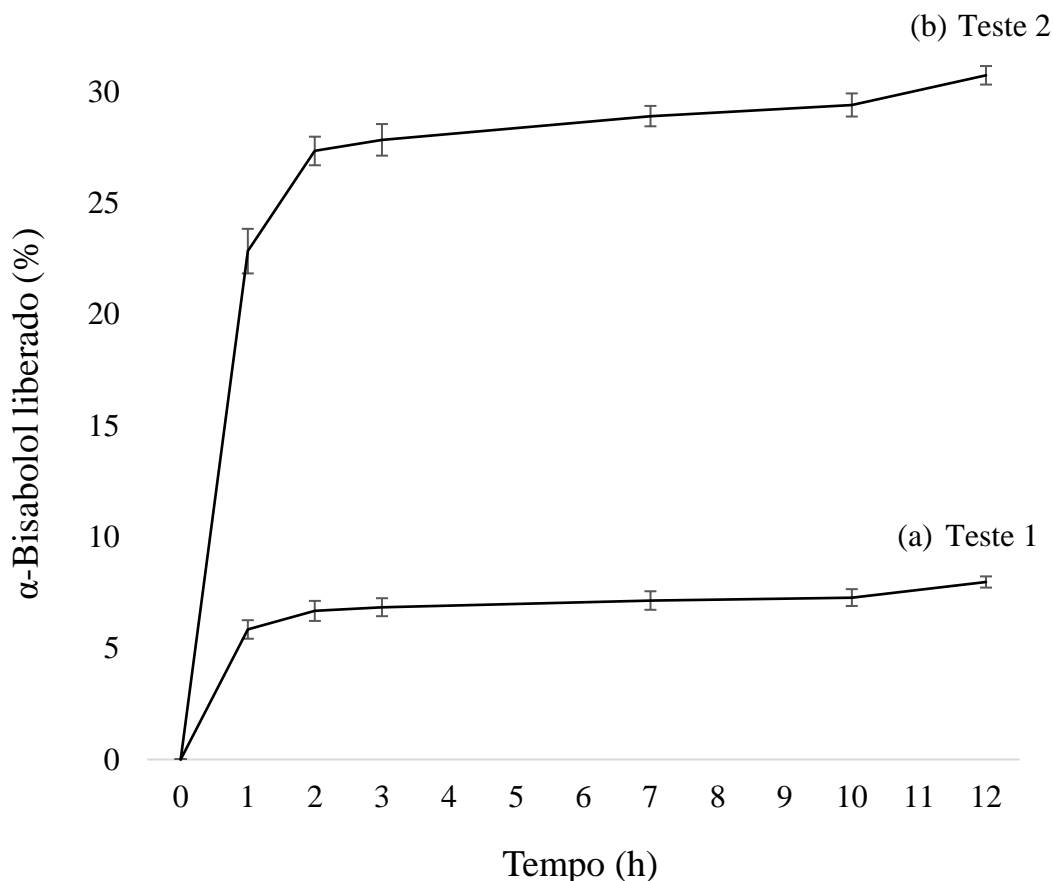


Figura 24: Ensaio de liberação do ativo encapsulado em agitador do tipo “shaker”. (a) Teste 1 – pH 7,2; (b) Teste 2 – pH 5,5.

Em ambos os testes é possível perceber que a partir de 2 horas de ensaio, a taxa de liberação diminui significativamente. Além disso, o ensaio evidenciou que em pHs mais ácidos, o qual se assemelha mais às condições da pele humana, a liberação foi maior, de cerca de $30,74 \pm 0,42$ % em 12 horas, enquanto que no meio com pH de 7,2 a liberação foi de $7,98 \pm 0,25$ %.

Já para o Teste 3, realizado em sonicador durante 1 hora e pH 7,2, obteve-se $6,18 \pm 0,40$ % de liberação. Ou seja, semelhante à liberação obtida no Teste 1, onde foi utilizado o mesmo pH.

O comportamento da liberação *in vitro* de ativos pode sofrer influência de diversos fatores, como as características físico-químicas e a concentração do ativo (solubilidade e coeficiente de partição óleo/água), a natureza, a degradabilidade o peso molecular e a

concentração do polímero utilizado como agente encapsulante, o tamanho da nanocápsula, o método de síntese e, principalmente, as condições utilizadas no ensaio de liberação (pH do meio, temperatura, tempo de ensaio, etc) (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Na Figura 24 é possível notar uma taxa de liberação significativamente maior nas primeiras 2 horas de ensaio, denominada primeira fase. Este efeito recebe o nome de liberação imediata (*burst effect*) e pode ser atribuído à desorção do ativo localizado na superfície da nanocápsula (FERRANTI *et al.*, 1999; PEREZ *et al.*, 2001; CRUZ *et al.*, 2006), ou à degradação das nanocápsulas com membrana polimérica mais fina (CAUCHETIER *et al.*, 2003). Considerando que, neste trabalho, não foi evidenciada a presença do ativo nas camadas mais superficiais das nanocápsulas nas análises de ATR/FTIR, supõe-se que a liberação imediata evidenciada na Figura 24 pode ser decorrente da degradação das nanocápsulas com membrana polimérica mais fina.

A segunda fase de liberação, que pode ser vista na Figura 24 a partir de 2 horas de ensaio, corresponde à difusão das moléculas do núcleo das nanocápsulas para a fase externa. Supõe-se que este processo de difusão é afetado pelo coeficiente de partição do ativo entre o núcleo oleoso e o meio aquoso externo e pelo volume relativo de ambas as fases e pela interação entre o ativo e a casca (CALVO *et al.*, 1997; ZILI *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2005; BLOUZA *et al.*, 2006). Segundo ROMERO-CANO e VINCENT (2002), a quantidade de polímero utilizada pode reduzir significativamente a taxa de liberação. Em altas concentrações (acima de 1% de fase orgânica) ou utilizando polímeros de alto peso molecular, a casca formada tende a ser mais consistente, podendo impactar na liberação do ativo encapsulado (CRUZ *et al.*, 2006). Além disso, a liberação incompleta do ativo ainda pode ser atribuída à capacidade de retenção do ativo pelo polímero ou pelo surfactante utilizado (CAUCHETIER *et al.*, 2003).

A maior liberação de ativo em pH ácido ocorre pois, em pHs ácidos (< 6,5), a quitosana tem seus grupos aminas protonados, apresentando uma alta densidade de cargas positivas. Desta forma, ocorre a formação de pares iônicos entre estes grupos e as carboxilas do alginato. Em conformidade com os resultados encontrados por BHUNCHU e ROJSITTHISAK (2018), o ativo foi liberado mais rápido em condições ácidas do que em condições mais alcalinas. Este comportamento pode ser atribuído ao aumento da solubilidade da quitosana em meio ácido, visto que, em pHs ácidos, a quitosana tende a

se dissolver da matriz formada, causando erosões na matriz polimérica e uma maior liberação do ativo. Já em pH neutro ou alcalino, a quitosana não é solúvel, limitando assim a liberação do ativo.

Ressalta-se ainda que a porosidade das nanocápsulas determina a quantidade de material que será liberado num determinado período de tempo. Em geral, a liberação do material encapsulado em alginato é normalmente rápida. Desta forma, uma das maneiras de aumentar o controle desta liberação é utilizar um polímero catiônico para formação de uma camada protetora, como a quitosana, diminuindo assim a porosidade das partículas através da interação iônica entre os dois biopolímeros (DOHNAL e STEPANEK, 2010).

4.6 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do ativo puro e do ativo encapsulado

A avaliação de atividade antioxidante foi realizada pelo método do DPPH, escolhido principalmente pela sua sensibilidade, rapidez e uso de quantidades reduzidas de amostra (ABDOUL-LATIF *et al.*, 2011).

A atividade sequestrante de DPPH do ativo antes e após o encapsulamento foi calculada utilizando-se a Equação 2, descrita no tópico de metodologia. Além disso, a concentração do ativo (mg/mL) necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH foi calculada e é expressa em IC₅₀. Quanto menor o IC₅₀, maior a atividade antioxidante da amostra analisada.

A curva de concentração *versus* inibição de radicais DPPH[•] obtida para a amostra de α -Bisabolol não encapsulado é apresentada na Figura 25. A inibição variou de 3,02 a 10,80 % nas concentrações de 2 a 10 mg/mL, com IC₅₀ de 48,05 mg/mL.

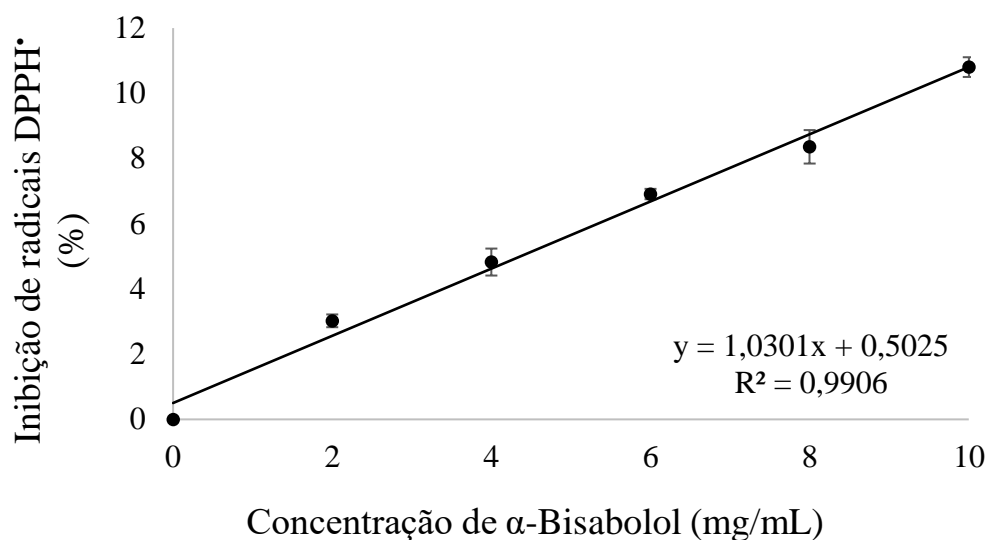


Figura 25: Curva de Inibição *versus* Concentração de α -Bisabolol antes do encapsulamento para avaliação de atividade antioxidante

A inibição com o α -Bisabolol após encapsulamento e rompimento das NCs variou de 1,91 a 10,90% nas concentrações de 2 a 10 mg/mL, com IC_{50} de 46,82 mg/mL. A curva de concentração *versus* inibição obtida para esta amostra é apresentada na Figura 26.

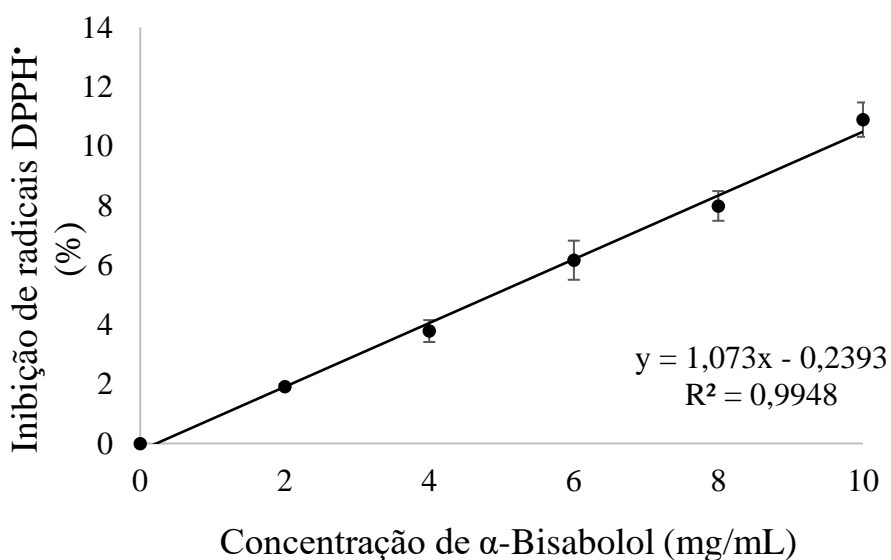


Figura 26: Curva de Inibição *versus* Concentração de α -Bisabolol após o encapsulamento para avaliação de atividade antioxidante

A Tabela 5 resume os resultados encontrados nesta análise.

Tabela 5: Concentração de α -Bisabolol necessária para reduzir em 50% de DPPH

	α-Bisabolol não-encapsulado	α-Bisabolol encapsulado
IC₅₀ (mg/mL)	48,05	46,82

Utilizando o método de DPPH, FIRAT *et al.* (2018) obtiveram um valor de IC₅₀ igual a 43,88 mg/mL para o ativo. A partir disto, chega-se à conclusão que os valores de IC₅₀ do ativo antes e após o encapsulamento são bem próximos e condizem com a literatura estudada, comprovando sua atividade antioxidante moderada, quando comparados a compostos como o ácido ascórbico, que, segundo FIRAT *et al.* (2018), possui IC₅₀ igual a 0,015 mg/mL, indicando alta atividade antioxidante.

Segundo DASTMALCHI *et al.* (2008), o método de DPPH* é um dos métodos mais comuns para a análise da atividade antioxidante de produtos naturais. Porém, devido a algumas limitações da sua aplicação, como solubilidade e problemas de interferência espectrais, é comum utilizar também um método alternativo, como o método TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) ou ABTS•+ (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*), FRAP (*Ferric-Reducing Ability of Plasma*), TRAP (Total Radical - Trapping Antioxidant Parameter), CUPRAC (*Cupric ions Cu²⁺ reducing antioxidant power*) e métodos de peroxidação lipídica (CIEŚLA *et al.*, 2012; MOON e SHIBAMOTO, 2009). Desta forma, como atividade futura, sugere-se também a avaliação da atividade antioxidante por algum método adicional.

4.7 Caracterização da hialuronidase extraída de testículos bovinos

Para caracterizar a enzima hialuronidase extraída de testículos bovinos foram realizadas a avaliação de dosagem de proteína e a avaliação de atividade enzimática, antes e após a purificação com hidroxiapatita. Os resultados são apresentados a seguir.

4.7.1 Avaliação de dosagem de proteína

A avaliação de dosagem de proteína, seguindo o método de Bradford, foi realizada com o intuito de quantificar o teor de proteínas totais no meio. Este método se baseia na observação da mudança de coloração do reagente Azul Brilhante de Coomassie G-250 ao se ligar na proteína. O método foi utilizado antes e após a purificação com hidroxiapatita.

A curva de calibração para dosagem de proteína, Figura 27, foi construída utilizando-se BSA nas concentrações de 0,02 g/L a 0,1 g/L e lidas em espectrofotômetro UV-Vis a 600 nm. Todos os pontos foram analisados em triplicata.

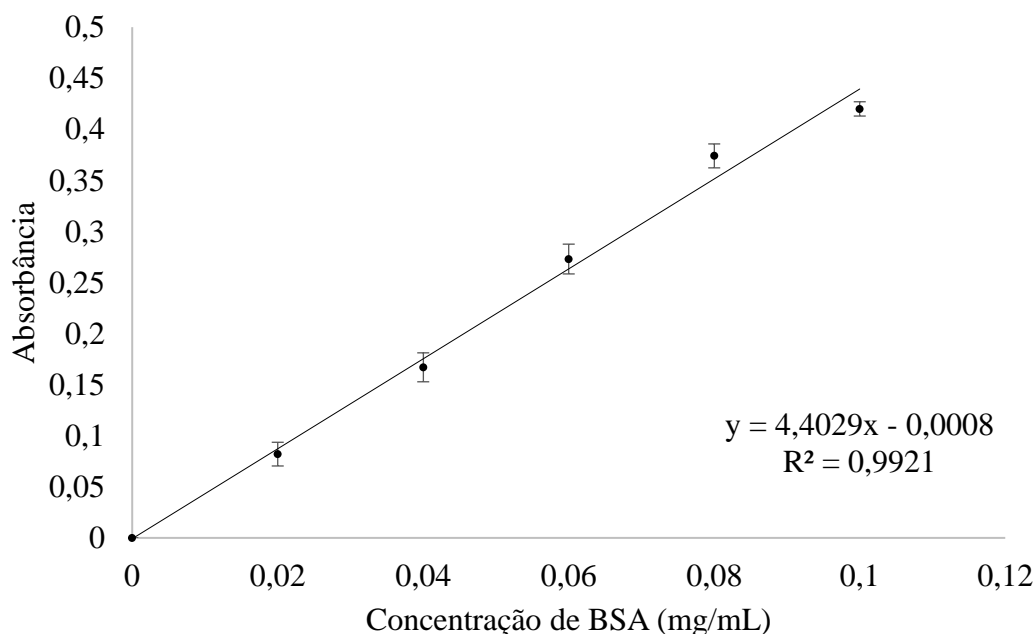


Figura 27: Curva de calibração para avaliação de dosagem de proteína

Desta forma, foram obtidos os seguintes valores de dosagem de proteína: $3,129 \pm 0,026$ mg/mL para a amostra antes de purificar e $3,042 \pm 0,044$ mg/mL para a amostra após a purificação.

Seguindo a mesma metodologia apresentada neste trabalho, GONÇALVES (2007) obteve um teor total de proteínas igual a 25,7 mg/mL para o extrato de hialuronidase antes da purificação com hidroxiapatita e 10,28 mg/mL após purificação. Essa diferença de valores pode ser atribuída, em parte, à heterogeneidade de substâncias de procedência biológica.

Além disso, foi estudada a cinética de adsorção, Figura 28, para verificação dos efeitos da adsorção das proteínas contaminantes durante a primeira hora de experimento.

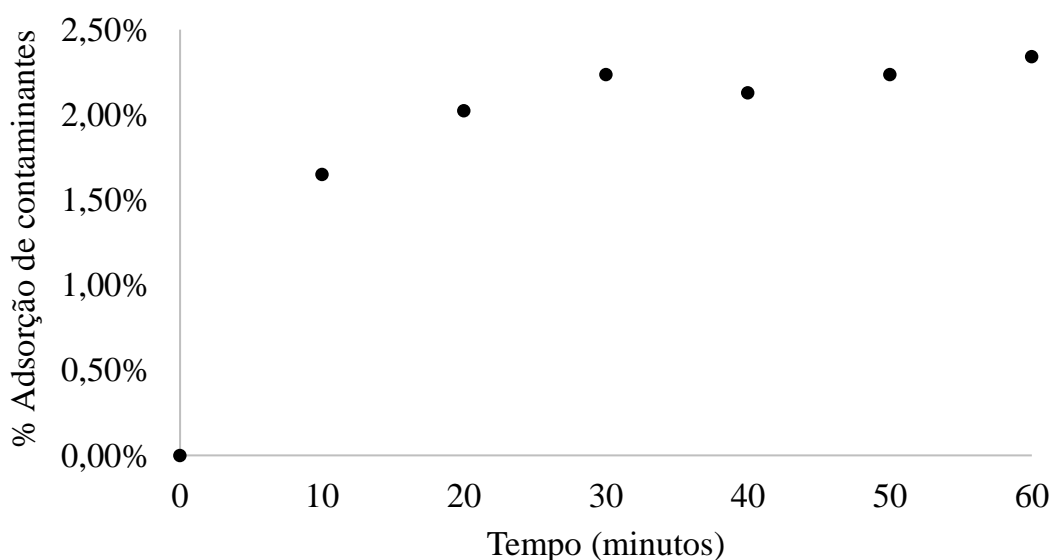


Figura 28: Cinética de adsorção das proteínas contaminantes em hidroxiapatita

A partir dos resultados apresentados, pode-se verificar que a adição de hidroxiapatita no meio causou a redução do teor de proteínas totais. Em 1 hora de experimento, cerca de 2,5% de proteínas foram adsorvidas.

Sabendo que o método de Bradford analisa proteína total em solução, para a análise em separado da hialuronidase foi empregado um método específico para esta

proteína. Desta forma, foram realizados ensaios de atividade enzimática da hialuronidase, utilizando o ácido hialurônico como substrato, conforme apresentado do tópico a seguir.

4.7.2 Avaliação de atividade enzimática

Selecionou-se o método da turbidez para a avaliação da atividade enzimática da hialuronidase. Este método se baseia na medida de turbidez formada pela interação entre o ácido hialurônico e a BSA em meio ácido, a partir da redução da N-acetilglucosamina. A quantificação de atividade enzimática se dá a partir de duas reações. Na primeira, cujo tempo de duração é de 10 minutos, a hialuronidase cliva o ácido hialurônico. Na segunda, onde é realizada a quantificação da atividade enzimática, o ácido hialurônico que não reagiu com a hialuronidase reage com uma solução de BSA hidrolisada. Esta reação também tem tempo de 10 minutos e o produto da segunda reação é uma solução turva.

Desta forma, foi construída uma curva de calibração (Figura 29) para avaliar a relação entre a concentração de hialuronidase e a quantidade de ácido hialurônico consumido.

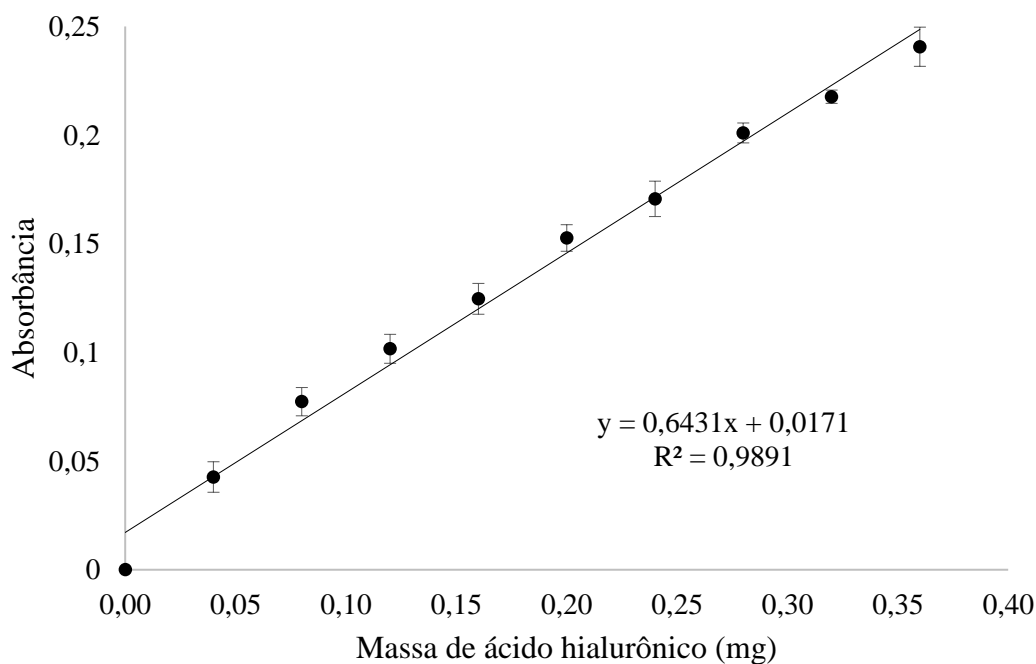


Figura 29: Curva de calibração para avaliação de atividade enzimática da hialuronidase

A partir da curva de calibração verifica-se que a turbidez da solução aumenta com o aumento da quantidade de ácido hialurônico no meio. Isto se dá devido à interação entre o ácido hialurônico e a BSA.

Avaliando a atividade enzimática do extrato antes de purificar, obteve-se um valor de absorbância igual a $0,110 \pm 0,004$, o que corresponde a um valor de massa de ácido hialurônico de 0,145 mg, de acordo com a curva de calibração ($y=0,6431x+0,0171$ $R^2=0,9891$). Ou seja, dado que a quantidade inicial de ácido hialurônico no meio era de 0,2 mg, 0,055 mg de ácido hialurônico reagiram com a BSA.

Após a purificação, o valor de absorbância obtido foi de $0,101 \pm 0,003$, o que corresponde a um valor de massa de ácido hialurônico de 0,130 mg. Ou seja, 0,069 mg de ácido hialurônico reagiram com a BSA.

Para o cálculo da atividade enzimática da hialuronidase, utiliza-se a relação apresentada em GONÇALVES (2007), onde afirma que uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que consome 0,75 μ g de ácido hialurônico em pH 5,3 a 37 °C no tempo de 10 minutos.

Sendo assim, na Tabela 6 são apresentados os valores de atividade enzimática para ambos os casos, antes e após a purificação.

Tabela 6: Atividade enzimática da hialuronidase antes e após purificação

	Atividade (U)	Atividade específica (U / mg hialuronidase)
Após precipitação	73,37	48,24
Após purificação	92,72	60,96

Segundo GONÇALVES (2007), a atividade da hialuronidase comercial é de 608 U / mg de enzima, aproximadamente 10 vezes maior que o valor obtido neste trabalho após a purificação com hidroxapatita.

De forma a verificar o grau de pureza da hialuronidase obtida, sugere-se que, para trabalhos futuros, seja realizada adicionalmente a eletroforese da amostra obtida.

4.8 Caracterização das nanocápsulas funcionalizadas

Neste tópico são apresentados os resultados das três estratégias de funcionalização adotadas para este trabalho. Na Estratégia 1 a hialuronidase foi adicionada ao meio reacional logo após a etapa de emulsificação. Na Estratégia 2 a hialuronidase e a quitosana foram adicionadas simultaneamente. Por fim, na Estratégia 3, foi adotada a estratégia de adsorção de proteína na superfície das nanocápsulas previamente prontas, seguindo o procedimento de MONDAL *et al.* (2015).

4.8.1 Estratégia 1 – Adição de hialuronidase após etapa de emulsificação

Os resultados obtidos a partir da caracterização do produto seguindo a Estratégia 1 são apresentados a seguir. Na Figura 30 é possível observar a distribuição de tamanho de partículas do produto.

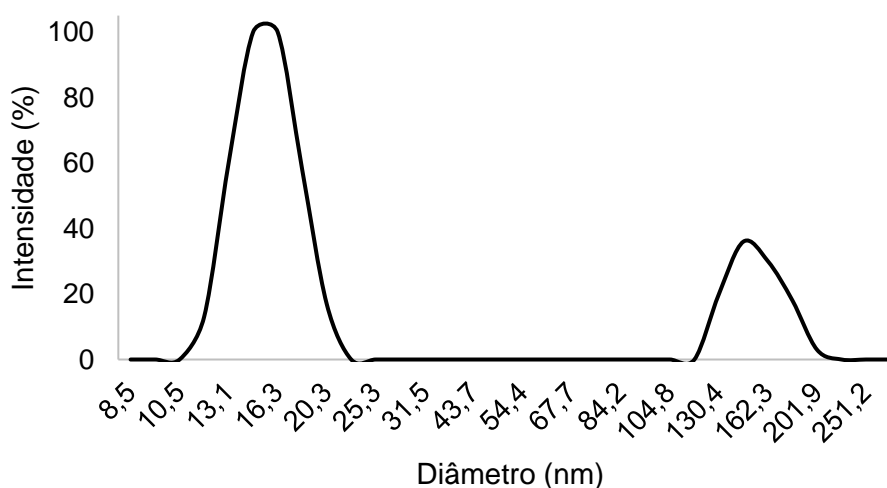


Figura 30: Distribuição de tamanho de partículas obtida para a Estratégia 1.

Nota-se que a distribuição obtida é multimodal, com a presença de dois picos, onde o pico de maior intensidade, localizado em $D_p = 16,3$ nm, não está em conformidade com o resultado esperado para esta etapa. Além disso, a amostra apresentou um valor de índice de polidispersão igual a 0,233 e potencial zeta igual a $-4,92 \pm 5,73$ mV.

Supõe-se que a adição da hialuronidase após a etapa de emulsificação possa ter influenciado na reticulação, inviabilizando este processo.

4.8.2 Estratégia 2 – Adição de hialuronidase e quitosana simultaneamente

Os resultados obtidos a partir da caracterização do produto seguindo a Estratégia 2 são apresentados a seguir. Na Figura 31 é possível observar a distribuição de tamanho de partículas do produto.

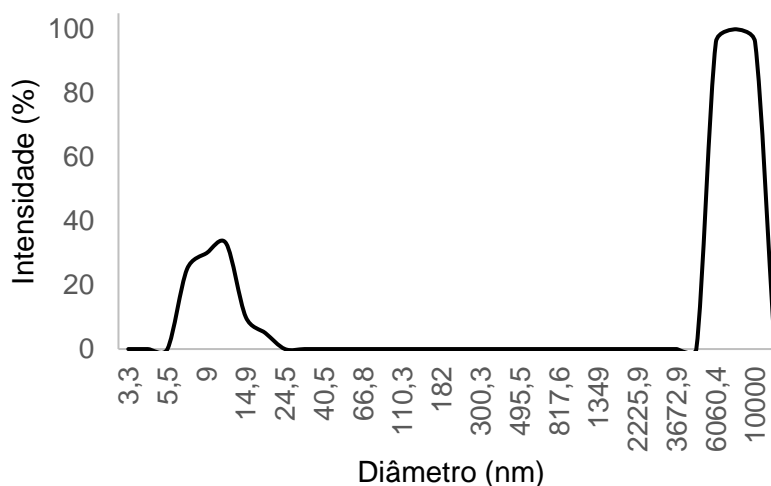


Figura 31: Distribuição de tamanho de partículas obtida para a Estratégia 2.

Nota-se que a distribuição obtida é multimodal, com a presença de dois picos, cujos valores de D_p não estão em conformidade com o resultado esperado para esta etapa. Além disso, a amostra apresentou um valor de índice de polidispersão igual a 0,442 e potencial zeta igual a $-7,32 \pm 3,98$ mV

Assim como apresentado na Estratégia 1, supõe-se que a adição da hialuronidase durante a formação das nanocápsulas possa ter influenciado no recobrimento com a quitosana, inviabilizando este processo.

4.8.3 Estratégia 3 – Adsorção de hialuronidase na superfície das NCs

É apresentada na Figura 32 a distribuição de tamanho de partículas da nanoformulação obtida seguindo a Estratégia 3.

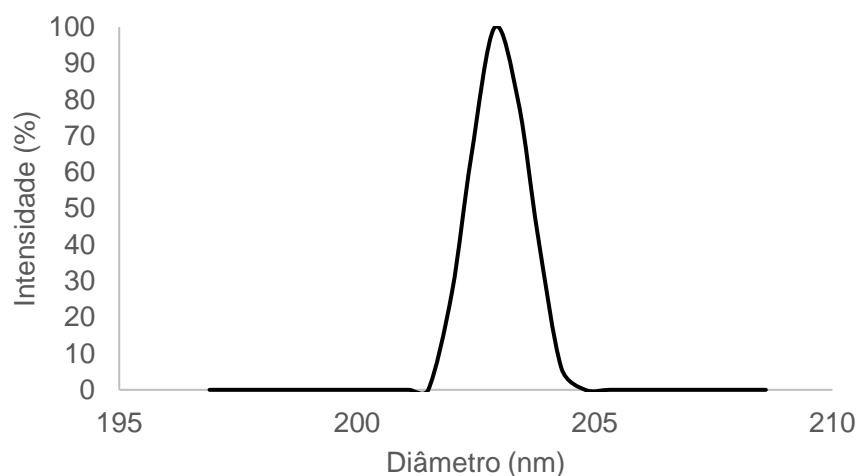


Figura 32: Distribuição de tamanho de partículas obtida para a Estratégia 3.

Com a caracterização das nanocápsulas funcionalizadas foram obtidos os valores de diâmetro médio de partículas igual a $202,9 \pm 6,7$ nm, índice de polidispersão de $0,004 \pm 0,001$ e potencial zeta de $-15,93 \pm 1,49$ mV.

A curva cinética de adsorção obtida para 60 minutos de experimento é apresentada na Figura 33. Os pontos da curva foram obtidos a partir da análise do sobrenadante de amostras mantidas a 37°C e 200 rpm durante períodos de tempo entre 0 e 60 minutos. O teor de enzima presente no sobrenadante foi avaliado com o auxílio da curva de calibração obtida pelo método de Bradford, Figura 27.

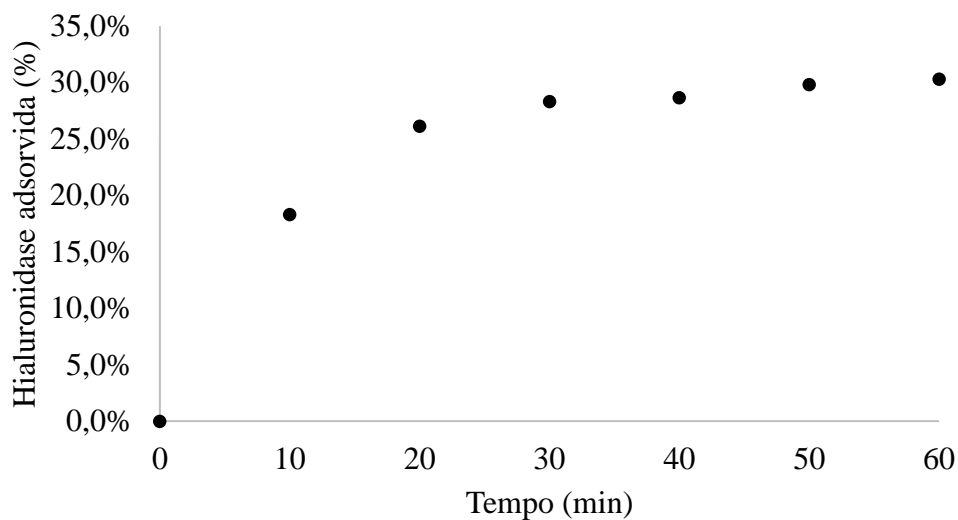


Figura 33: Cinética de adsorção de hialuronidase em nanocápsulas de bisabolol em matriz de alginato-quitosana

Ao final dos 60 minutos de procedimento obteve-se um valor de eficiência de funcionalização igual a 30,3%, ou seja, 30,3% da hialuronidase adicionada no meio se adsorveu nas nanocápsulas. A eficiência da funcionalização por este método pode ser melhorada utilizando-se outras concentrações iniciais da enzima, ou selecionando-se outras condições de pH e força iônica.

CAPÍTULO V

Conclusões e Sugestões

5.1 Conclusões

Neste trabalho foi realizada a síntese de nanocápsulas de α -bisabolol em matriz de alginato-quitosana funcionalizadas com hialuronidase. Inicialmente foram sintetizadas as nanocápsulas não-funcionalizadas com tamanho e carga de superfície adequadas para uso tópico.

O encapsulamento foi realizado com sucesso e a interação iônica entre os grupos amina da quitosana e os grupos carboxila do alginato foi comprovada pela análise ATR/FTIR. Além disso, as NCs apresentaram uma liberação sustentada em 12 horas de ensaio *in vitro*. Por meio do estudo de estabilidade físico-química realizado em um período de 75 dias, verificou-se que as NCs permaneceram estáveis.

A atividade antioxidante do ativo foi comprovada pelo método do radical DPPH, o que o torna interessante para o uso no tratamento de olheiras, visto que substâncias que possuem atividade antioxidante são capazes de auxiliar na remoção de melanina em excesso, sendo o aumento do depósito de melanina na região dos olhos uma das principais causas de olheira.

Por fim, foi realizada a extração da hialuronidase a partir de testículos bovinos e foi comprovada sua atividade. A hialuronidase extraída foi utilizada na última etapa deste trabalho, a etapa de funcionalização das NCs, devido à sua capacidade de tornar a matriz extracelular da pele menos densa por meio da degradação do ácido hialurônico.

Dentre as três estratégias de funcionalização adotadas, selecionou-se a Estratégia 3, a qual produziu os melhores resultados, sendo possível adsorver 30,3% da hialuronidase na superfície das NCs, que ao fim do experimento apresentaram $202,9 \pm 6,7$ nm e $-15,93 \pm 1,49$ mV de potencial zeta.

Assim, a nanoformulação produzida neste trabalho revelou-se útil para a aplicação em tratamento de olheiras.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Almejando-se um aprimoramento e futura comercialização na área cosmética das nanocápsulas sintetizadas nesta pesquisa, propuseram-se as sugestões listadas a seguir:

- Avaliar a influência das interações dos biopolímeros e da espessura da casca na liberação do ativo encapsulado;
- Avaliar a morfologia das nanocápsulas formadas por meio de análises de MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão);
- Avaliar a atividade antioxidante do ativo antes e após o encapsulamento utilizando métodos alternativos ao DPPH;
- Realizar análise de DSC nas nanocápsulas para avaliar a interação entre os componentes das nanocápsulas, de forma a complementar as análises de FTIR.
- Avaliar o grau de purificação da hialuronidase extraída a partir da técnica de eletroforese;
- Avaliar a atividade antioxidante do ativo após a funcionalização;
- Realizar ensaios *in vivo* com intuito de investigar as funcionalidades desejadas.

CAPÍTULO VI

Referências Bibliográficas

- ABDOUL-LATIF, F. M., MOHAMED, N., EDOU, PP., et al., “Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and methanol extract of *Matricaria chamomilla* L. from Djibouti”. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 9, pp. 1512-1517, 2011.
- ABDUL, B. K., FAHMY, S. A., "Development of coated beads for oral controlled delivery of cefaclor: *In vitro* evaluation”. **Acta Pharmaceutica**, v. 63, n. 1, pp. 31-44, 2013.
- ABREU, F. O. M. S., 2008, *Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos*. Tese* de D.Sc., Escola de Engenharia - UFRGS, Rio Grande do Sul, RS, Brasil.
- AGHEYISI, R. *Cosmeceuticals: Products and Global Markets*, 2013. Disponível em <http://www.bccresearch.com/market-research/advanced-materials/cosmeceuticals-global-markets-avm099a.html>. Acesso em 27 mar. 2019, 10:45:10.
- ALEIXO, A. M., 1999, *Desenvolvimento de metodologias para oxidações seletivas em esqueletos pmentânicos. Utilização em reações para transposição 1,2 de enonas ou apenas de carbonilas. Aplicações em sínteses de produtos naturais*. 1999. Tese* de D.Sc, Instituto de Química, UEC, Campinas, SP, Brasil.
- ALVES, S. F., BORGES, L. L., DOS SANTOS, T. O., et al., “Microencapsulation of essential oil from fruits of *Pterodon emarginatus* using gum arabic and maltodextrin as wall materials: composition and stability”. **Drying technology**, v. 32, n. 1, pp. 96-105, 2014.
- AMMALA, A. “Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets”. **International journal of cosmetic science**, v. 35, n. 2, pp. 113-124, 2013.

- ANDERSEN, F. A. “Final safety assessment for PCA and sodium PCA”. **International Journal of Toxicology**, v. 18, n. 2, pp. 25-34, 1999.
- ANTON, N., BENOIT, J., SAULNIER, P., “Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review”. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, pp. 185-199, 2008.
- ARORA, S., BUDHIRAJA, R. D. “Chitosan-alginate microcapsules of amoxicillin for gastric stability and mucoadhesion”. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology e Research**, v. 3, n. 1, pp. 68, 2012.
- ASSIS, L. M. D., ZAVAREZE, E. D. R., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C., et al. “Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods”. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, pp. 99-109, 2012.
- AUBIN G. “Experimentação biológica dos produtos cosméticos”. In: **Pruniéras M. Manual de cosmetologia dermatológica**. 2. ed. São Paulo, 1994.
- BAKRY, A. M., ABBAS, S., ALI, B., MAJEED, H., et al., “Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications”. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, pp. 143-182, 2016.
- BALAJI, R. A., RAGHUNATHAN, S., REVATHY, R, *et al.* “Levofloxacin: formulation and in-vitro evaluation of alginate and chitosan nanospheres”. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 14, n. 1, pp. 30, 2015.
- BALIN, A. K., PRATT, L. A., “Physiological consequences of human skin aging”. **Cutis**, v. 43, n. 5, pp. 431-436, 1989.
- BANGA, A. K., “Microporation applications for enhancing drug delivery”. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 6, n. 4, pp. 343-354, 2009.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos**. 1 ed. Minas Gerais, Editora UFV, 2007.
- BARIL, M. B., FRANCO, G. F., VIANA, R. S., et al., “Nanotecnologia aplicada aos cosméticos”. **Visão Acadêmica**, v. 13, n. 1, 2012.

- BAROLI, B. "Skin absorption and potential toxicity of nanoparticulate nanomaterials". **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 5, pp. 485-496, 2010.
- BARUCH, L., MACHLUF, M., "Alginate–chitosan complex coacervation for cell encapsulation: Effect on mechanical properties and on long-term viability". **Biopolymers**, v. 82, n. 6, pp. 570-579, 2006.
- BASAVARAJ, K. H., "Nanotechnology in medicine and relevance to dermatology: present concepts". **Indian Journal of Dermatology**, v. 57, n. 3, pp. 169, 2012.
- BASER, K. H. C., BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. 1. ed., CRC Press, 2015.
- BECK, R., GUTERRES, S., POHLMANN, A., "Nanocosmetics and nanomedicines: new approaches for skin care". **Springer Science e Business Media**, 2011.
- BHATIA, S. P. P., MCGINTY, D., LETIZIA, C. S., et al., "Fragrance material review on α -(-)-Bisabolol". **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2008, pp. 572–576, 2008.
- BHUNCHU, S., ROJSITTHISAK, P. "Kinetic study of chitosan-alginate biopolymeric nanoparticles for the controlled release of curcumin diethyl disuccinate". **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v. 27, n. 2, 2018.
- BLANK, I. H., SCHEUPLEIN, R. J. "Permeability of the skin". **Physiol. Rev.** n. 51, pp. 702–747, 1971.
- BLOUZA, I. L., CHARCOSSET, C., SFAR, S., et al., "Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, n. 1-2, pp. 124-131, 2006.
- BOLZINGER, M. A., BRIANÇON, S., PELLETIER, J., et al., "Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane". **Current Opinion in Colloid e Interface Science**, v. 17, n. 3, pp. 156-165, 2012.
- BONDIOLI, L., COSTANTINO, L., BALLESTRAZZI, A., et al., "PLGA nanoparticles surface decorated with the sialic acid, N-acetylneuraminic acid". **Biomaterials**, v. 31, n. 12, pp. 3395-3403, 2010.

- BORGES, L. L., LÚCIO, T. C., GIL, E. D. S., et al., “Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais”. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 7, n. 12, 2011.
- BOUWSTRA, J. A., PONEC, M. “The skin barrier in healthy and diseased state”. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 12, pp. 2080-2095, 2006.
- BRADFORD, M. M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, pp. 248-254, 1976.
- BRANDT, F. S., CAZZANIGA, A., HANN, M. “Cosmeceuticals: current trends and market analysis. In: Seminars in cutaneous medicine and surgery”. **WB Saunders**, 2011. pp. 141-143.
- BRODY, H. J. “Use of hyaluronidase in the treatment of granulomatous hyaluronic acid reactions or unwanted hyaluronic acid misplacement”. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 8, pp. 893-897, 2005.
- BUCAY, V. W., DAY, D. “Adjunctive skin care of the brow and periorbital region”. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 40, n. 1, pp. 225-236, 2013.
- BURKE, K. E. “Prevention and treatment of aging skin with topical antioxidants”. In: **Skin Aging Handbook**, pp. 149-176, William Andrew Publishing, 2009.
- BUSINESS WIRE. *The Global Cosmetics Market to Reach \$390 Billion by 2020 - Rising Demand For Natural Cosmetics - Research and Markets.*, 2017. Disponível em <http://www.businesswire.com/news/home/20170524005627/en/Global-Cosmetics-Market-Reach-390-Billion-2020>. Acesso em 07 nov. 2017, 12:04:15.
- CALVO, P., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. “Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 153, n. 1, pp. 41-50, 1997.
- CAMPBELL, C. S. J., CONTRERAS-ROJAS, L. R., DELGADO-CHARRO, M. B., et al. “Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after

- topical exposure”. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, pp. 201-207, 2012.
- CARLOTTI, M. E., GALLARATE, M., ROSSATTO, V., “O/W microemulsion as a vehicle for sunscreens”. **Journal of Cosmetic Science**, v. 54, n. 5, pp. 451-462, 2003.
- CARRER, D. C., VERMEHREN, C., BAGATOLLI, L. A. “Pig skin structure and transdermal delivery of liposomes: a two photon microscopy study”. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 1, pp. 12-20, 2008.
- CARVALHO, I. T., ESTEVINHO, B. N., SANTOS, L. “Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products—a review”. **International journal of cosmetic science**, v. 38, n. 2, pp. 109-119, 2016.
- CASANOVA, F., SANTOS, L. “Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application—a review”. **Journal of Microencapsulation**, v. 33, n. 1, pp. 1-17, 2015.
- CAUCHETIER, E., DENIAU, M., FESSI, H., et al., “Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their *in vitro* characteristics”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, pp. 273-281, 2003.
- CESTARI, T. F., DANTAS, L. P., BOZA, J. C., “Acquired hyperpigmentations”. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, pp. 11-25, 2014.
- CESTARI, T., ARELLANO, I., HEXSEL, D., et al. “Melasma in Latin America: options for therapy and treatment algorithm”. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 7, pp. 760-772, 2009.
- CEVC, G., VIERL, U., “Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal”. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, pp. 277-299, 2010.
- CHAN, A. C., “Partners in defense, vitamin E and vitamin C”. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, n. 9, pp. 725-731, 1993.

- CHAN, H. H. L., MANSTEIN, D., YU, C. S., et al. "The prevalence and risk factors of post-inflammatory hyperpigmentation after fractional resurfacing in Asians". **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, n. 5, pp. 381-385, 2007.
- CHEN, H., LANGER, R. "Oral particulate delivery: status and future trends". **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, n. 2-3, pp. 339-350, 1998.
- CHEUNG, H., LAU, K. T., LU, T. P., et al. "A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development". **Composites Part B: Engineering**, v. 38, n. 3, pp. 291-300, 2007.
- CHICO, K. C., 2016, *Síntesis, caracterización y funcionalización de nanopartículas magnéticas para detección de patógenos: estudio de la funcionalización con SiO₂ mesoporoso*. Trabalho de Conclusão de Curso em Química – Universidade da Coruna, Espanha.
- CHO, E. J., HOLBACK, H., LIU, K. C., et al., "Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies". **Molecular pharmaceutics**, v. 10, n. 6, pp. 2093-2110, 2013.
- CHORILLI, M., CARVALHO, L. D. S., PIRES-DE-CAMPOS, M. S. M., et al. "Avaliação histológica da hipoderme de suínos submetida a tratamento mesoterápico com tiratricol, cafeína e hialuronidase". **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 1, pp. 14-18, 2005.
- CIEŚLA, Ł., KRYSZEŃ, J., STOCHMAL, A., et al., "Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds". **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, pp. 126-135, 2012.
- COLVEN, R. M., PINNELL, S. R. "Topical vitamin C in aging". **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 2, pp. 227-234, 1996.
- COPPI, G., IANNUCELLI, V., SALA, N., et al. "Alginate microparticles for Polymyxin B Peyer's patches uptake: microparticles for antibiotic oral administration". **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 8, pp. 829-839, 2004.

- CORNWELL, P. A., BARRY, B. W. “Sesquiterpene components of volatile oils as skin penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil”. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 4, pp. 261-269, 1994.
- COSTA, J. R., SILVA, N. C., SARMENTO, B. *et al.* “Potential chitosan-coated alginate nanoparticles for ocular delivery of daptomycin”. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, v. 34, n. 6, pp. 1255-1262, 2015.
- CROISIER, F., JÉRÔME, C. “Chitosan-based biomaterials for tissue engineering”. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, pp. 780-792, 2013.
- CRUZ, L., SOARES, L. U., DALLA COSTA, T., *et al.*, “Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, n. 1-2, pp. 198-205, 2006.
- CSOKA, A. B., FROST, G. I., STERN, R. “The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes”. **Matrix Biology**, v. 20, n. 8, pp. 499-508, 2001.
- CUI, Z., MUMPER, R. J. “Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization”. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 3, pp. 409-419, 2001.
- DANA, D. A. “The nanotechnology challenge: creating legal institutions for uncertain risks”. **Cambridge University Press**, 2011.
- DAS, R. K., KASOJU, N., BORA, U. “Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells”. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, pp. 153-160, 2010.
- DASTMALCHI, K., DORMAN, H. D., OINONEN, P. P., *et al.*, “Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract”. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, pp. 391-400, 2008.
- DAUDT, R. M., EMANUELLI, J., KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C., *et al.*, “A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos”. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, pp. 28-31, 2013.
- DE AZEREDO, L. A. I., LEITE, S. G. F., FREIRE, D. M. G., BENCHETRIT, L. C., COELHO, R. R. R. Proteases from actinomycetes interfere in solid media plate

- assays of hyaluronidase activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 45, n. 3, pp. 207-212, 2001.
- DE FREITAS, R. G, NOBRE, Y. D., DEMARCHI, G. T., et al., “Topical treatment for phimosis: time span and other factors behind treatment effectiveness”. **Journal of Pediatric Urology**, v. 2, n. 4, pp. 380-385, 2006.
- DEMARCO, F. F., TARQUINIO, S. B. C., JAEGER, M. M. M., et al., “Evaluation of the cytotoxicity of two dentin-bonding systems”. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 12, n. 4, pp. 375-382, 1998.
- DENET, A., VANBEVER, R., PRÉAT, V. “Skin electroporation for transdermal and topical delivery”. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, pp. 659-674, 2004.
- DERMATOLOGYINC. *Microdermabrasion e Chemical Peels*, 2009. Disponível em: <http://www.dermatologyinc.com/about/services-procedures/microdermabrasion-chemical-peels/>. Acesso em 14 mar. 2019, 18:04:30.
- DESAI, P., PATLOLLA, R. R., SINGH, M. “Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery”. **Molecular membrane biology**, v. 27, n. 7, pp. 247-259, 2010.
- DESTRUEL, P. L., ZENG, N., MAURY, M., et al. “*In vitro* and *in vivo* evaluation of in situ gelling systems for sustained topical ophthalmic delivery: state of the art and beyond”. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 4, pp. 638-651, 2017.
- DIAS, A. J. L. G., 2009, *Estudos para a preparação de tetraidrofuranos substituídos a partir do α -(-)-Bisabolol e obtenção de análogos de compostos com atividade biológica*. Dissertação* de M.Sc. – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
- DIVKOVIC, M., PEASE, C. K., GERBERICK, G. F., et al. “Hapten–protein binding: from theory to practical application in the *in vitro* prediction of skin sensitization”. **Contact Dermatitis**, v. 53, n. 4, pp. 189-200, 2005.
- DOHNAL, J., STEPANEK, F. “Inkjet fabrication and characterization of calcium alginate microcapsules”. **Powder Technology**, v. 200, pp. 254-259, 2010.

- DUARTE-ALMEIDA, J. M., SANTOS, R. D., GENOVESE, M. I., et al., “Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH”. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, pp. 446-452, 2006.
- DUNN, A. L., HEAVNER, J. E., RACZ, G., et al. “Hyaluronidase: a review of approved formulations, indications and off-label use in chronic pain management”. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 10, n. 1, pp. 127-131, 2010.
- EL ASBAHANI, A., MILADI, K., BADRI, W., et al., “Essential oils: from extraction to encapsulation”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1, pp. 220-243, 2015.
- ELIAS, P. M. “Epidermal lipids, barrier function, and desquamation”. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, 1983.
- ESMAEILI, A., EBRAHIMZADEH, M. “Preparation of polyamide nanocapsules of Aloe vera L. Delivery with *in vivo* studies”. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 2, pp. 242-249, 2015.
- ESTEVINHO, B. N., ROCHA, F., SANTOS, L., et al., “Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications—A review”. **Trends in Food Science e Technology**, v. 31, n. 2, pp. 138-155, 2013.
- ETHERIDGE, M. L., CAMPBELL, S. A., ERDMAN, A. G., et al., “The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products”. **Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine**, v. 9, n. 1, pp. 1-14, 2013.
- EZHILARASI, P. N., KARTHIK, P., CHHANWAL, N., *et al.* “Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review”. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, pp. 628-647, 2013.
- FANGER, G. O. “Microencapsulation: a brief history and introduction”. In: **Microencapsulation**. Springer US, pp. 1-20, 1974
- FARR, C., MENZEL, J., SEEBERGER, J., *et al.* “Clinical pharmacology and possible applications of hyaluronidase with reference to Hylase Dessau”. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 147, n. 15, pp. 347-355, 1997.

- FARRIS, P. K. “Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions”. **Dermatologic Surgery**, v. 31, pp. 814-818, 2005.
- FDA. *Is It a Cosmetic, a Drug, or Both? (Or Is It Soap?)*, 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetics-laws-regulations/it-cosmetic-drug-or-both-or-it-soap>. Acesso em 25 mar. 2019, 19:05:20.
- FELDMAN, C., COCKERAN, R., JEDRZEJAS, M. J., et al. “Hyaluronidase augments pneumolysin-mediated injury to human ciliated epithelium”. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, pp. 11-15, 2007.
- FENNER, R., BETTI, A. H., MENTZ, L. A., et al. “Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica”. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 42, n. 3, pp. 369-394, 2006.
- FERRANTI, V., MARCHAIS, H., CHABENAT, C., et al. “Primidone-loaded poly-ε-caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and *in vitro* release profiles”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, n. 1, pp. 107-111, 1999.
- FINKEL, R., PRAY, W. S. “Guia de dispensação de produtos terapêuticos que não exigem prescrição”. **Porto Alegre: Artmed**, pp. 479-481, 2007.
- FIRAT, Z., DEMIRCI, F., DEMIRCI, B. “Antioxidant Activity of Chamomile Essential Oil and Main Components”. **Natural Volatiles e Essential Oils**, v. 5, n. 1, pp. 11-16, 2018.
- FISZER-SZAFARZ, B. “Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidases from bacteria, slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes, and human serum”. **Analytical Biochemistry**, v. 143, n. 1, pp. 76-81, 1984.
- FLOR, J., DAVOLOS, M. R., CORREA, M. A. “Protetores solares”. **Química Nova**, pp. 153-158, 2007.
- FRANCISQUINE, E., SCHOENMAKER, J., SOUZA, J. A. “Nanopartículas magnéticas e suas aplicações”. **Química Supramolecular e Nanotecnologia**, pp. 269, 2014.

- FREEMAN, M. E., ANDERSON, P., WEBSTER, M. E., et al., "Ethanol fractionation of bovine testicular hyaluronidase". **Journal of Biological Chemistry**, v. 186, n. 1, pp. 201-206, 1950.
- FREITAG, F. M., CESTARI, T. F. "What causes dark circles under the eyes?". **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 6, n. 3, pp. 211-215, 2007.
- FRIEDMAN, A. J., PHAN, J., SCHAIRER, D. O. *et al.* "Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate nanoparticles: A targeted therapy for cutaneous pathogens". **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 5, pp. 1231-1239, 2013.
- FROST, G. I., CSÓKA, T., STERN, R. "The hyaluronidases". **Trends in glycoscience and glycotecnology**, v. 8, n. 44, pp. 419-434, 1996.
- GEESIN, J. C., DARR, D., KAUFMAN, R, et al. "Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblasts". **Journal of Investigative Dermatology**, v. 90, n. 4, pp. 420-424, 1988.
- GENDLER, E. C. "Treatment of periorbital hyperpigmentation". **Aesthetic Surgery Journal**, v. 25, n. 6, pp. 618-624, 2005.
- GENSLER, H. L., MAGDALENO, M. "Topical vitamin E inhibition of immunosuppression and tumorigenesis induced by ultraviolet irradiation". **Nutrition and Cancer**, v.15, n. 2, pp. 97-106, 1991.
- GHAYEMPOUR, S., MORTAZAVI, S. M. "Preparation and investigation of sodium alginate nanocapsules by different microemulsification devices". **J Appl Polym Sci**, n. 132, 2015
- GHOSH, C. R., PARIA, S. "Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications". **Chemical Reviews**, v. 112, n. 4, pp. 2373-2433, 2011.
- GOMES, R. K., DAMAZIO, M. G. "Cosmetologia: descomplicando os princípios ativos". São Paulo: **Livraria Médica Paulista**, 2009.
- GOMES-CARNEIRO, M. R., DIAS, D. M., DE-OLIVEIRA, A. C. A. X., et al. "Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α -bisabolol in the

- Salmonella/microsome assay”. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 585, n. 1-2, pp. 105-112, 2005.
- GONÇALVES, S. B., 2007, *Extração, purificação e estudos sobre a formação de filmes monomoleculares da hialuronidase bovina*. Tese* de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- GONCHOROSKI, D. D., CORRÊA, G. M.. “Tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras”. **Infarma**, v. 17, n. 3-4, pp. 84-8, 2005.
- GORHAM, S. D., OLAVESSEN, A. H., DODGSON, K. S. “Effect of ionic strength and pH on the properties of purified bovine testicular hyaluronidase”. **Connective Tissue Research**, v. 3, n. 1, pp. 17-25, 1975.
- GRIMES, P. E. “Management of hyperpigmentation in darker racial ethnic groups”. In: **Seminars in cutaneous medicine and surgery**. pp. 77-85, 2009.
- GUIX, M., CARBONELL, C., COMENGE, J. *et al.* “Nanoparticles for cosmetics: how safe is safe?”. **Contributions to science**, pp. 213-217, 2008.
- GUNDUZ, U., KESKIN, T., TANSIK, G., et al. “Idarubicin-loaded folic acid conjugated magnetic nanoparticles as a targetable drug delivery system for breast cancer”. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 68, n. 6, pp. 729-736, 2014.
- GUTERRES, S. S., ALVES, M. P., POHLMANN, A. R. “Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications”. **Drug Target Insights**, v. 2, pp. 147-157, 2007.
- HAFNER, A., LOVRIĆ, J., LAKOŠ, G. P., et al. “Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions”. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, pp. 1005, 2014.
- HARDY, L. D., 2007, *Estudos para Transformações Químicas em Sistemas Sesquiterpênicos do Tipo Bisabolano*. Dissertação* de M.Sc., Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

- HARI, P. R., CHANDY, T., SHARMA, C. P. “Chitosan/calcium alginate microcapsules for intestinal delivery of nitrofurantoin”. **Journal of Microencapsulation**, v. 13, n. 3, pp. 319-329, 1996.
- HENCH, L. L. “Biomateriais: uma introdução. Biomateriais: fundamentos e aplicações”. **Cultura Médica**, pp. 1-7, 2006.
- HIRSCH, R. J., BRODY, H. J., CARRUTHERS, J. D. “Hyaluronidase in the office: a necessity for every dermasurgeon that injects hyaluronic acid”. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 9, n. 3, pp. 182-185, 2007.
- HONG, K., PARK, S. “Melamine resin microcapsules containing fragrant oil: synthesis and characterization”. **Mater. Chem. Phys**, n. 58, p. 128–131, 1999.
- HSIEH, W., CHANG, C., GAO, Y. “Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments”. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, n. 2, pp. 209-214, 2006.
- HUANG, Y. B., LIN, Y. H., LU, T. M., et al. “Transdermal delivery of capsaicin derivative-sodium nonivamide acetate using microemulsions as vehicles”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1-2, pp. 206-211, 2008.
- HUDSON, D., MARGARITIS, A. “Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals”. **Critical reviews in biotechnology**, v. 34, n. 2, pp. 161-179, 2014.
- ISKAKOV, R. M., KIKUCHI, A., OKANO, T.. “Time-programmed pulsatile release of dextran from calcium-alginate gel beads coated with carboxy-n-propylacrylamide copolymers”. **Journal of Controlled Release**, v. 80, n. 1-3, pp. 57-68, 2002.
- IZARD, J.C., “Grape vine resveratrol: health and beauty benefits”. In: **International Conference of Resveratrol and Health**, 2010.
- JAIN, D., ATHAWALE, R., BAJAJ, A., et al., “Studies on stabilization mechanism and stealth effect of poloxamer 188 onto PLGA nanoparticles”. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, pp. 59-67, 2013.
- JAISWAL, M., DUDHE, R., SHARMA, P. K. “Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system”. **Biotech**, v. 5, n. 2, pp. 123-127, 2015.

- JAMIL, B., HABIB, H., ABBASI, S., et al., "Cefazolin loaded chitosan nanoparticles to cure multi drug resistant Gram-negative pathogens". **Carbohydrate Polymers**, v. 136, pp. 682-691, 2016.
- JANG, Y. H., LEE, J. Y., KANG, H. Y., et al. "Oestrogen and progesterone receptor expression in melasma: an immunohistochemical analysis". **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 11, pp. 1312-1316, 2010.
- JEDRZEJAS, M. J., MELLO, L. V., DE GROOT, B. L., et al. "Mechanism of Hyaluronan Degradation by Streptococcus pneumoniae Hyaluronate Lyase Structures of Complexes with the Substrate". **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 31, pp. 28287-28297, 2002.
- JOHNSON, J. E. "Free radicals, aging, and degenerative diseases". **Liss**, 1986.
- KANG, H. Y., ORTONNE, J., "What should be considered in treatment of melasma". **Annals of Dermatology**, v. 22, n. 4, pp. 373-378, 2010.
- KHOEE, S., YAGHOUBIAN, M. "An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion". **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, pp. 2392-2399, 2009.
- KIM, D., YOON, E. S., JI, Y. H., et al. "Vascular complications of hyaluronic acid fillers and the role of hyaluronidase in management". **Journal of Plastic, Reconstructive e Aesthetic Surgery**, v. 64, n. 12, pp. 1590-1595, 2011.
- KIM, S., LEE, J., JUNG, E., et al., "Mechanisms of depigmentation by α -bisabolol". **Journal of Dermatological Science**, v. 52, n. 3, pp. 219-222, 2008.
- KIM, Y. M., YUN, J., LEE, C. K., et al., "Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action". **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, pp. 16340-16344, 2002.
- KOHLI, A. K., ALPAR, H. O. "Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 275, n. 1-2, pp. 13-17, 2004.

- L'ORÉAL, 2016. **Annual Report 2016**. Disponível em: <http://www.loreal-finance.com/en/annual-report-2016/>. Acesso em: 07 nov. 2017, 17:30:20.
- LARANJEIRA, M. C. M., DE FÁVERE, V. T. “Quitosana biopolímero funcional com potencial industrial biomédico”. **Química Nova**, v. 32, n. 3, pp. 672-678, 2009.
- LAUGIER, J. P., SHUSTER, S., ROSDY, M., et al., “Topical hyaluronidase decreases hyaluronic acid and CD44 in human skin and in reconstituted human epidermis: evidence that hyaluronidase can permeate the stratum corneum”. **British Journal of Dermatology**, v. 142, n. 2, pp. 226-233, 2000.
- LEE, A., GRUMMER, S. E., KRIEGEL, D., et al., “Hyaluronidase”. **Dermatologic Surgery**, v. 36, n. 7, pp. 1071-1077, 2010.
- LEE, J., JUN, H., JUNG, E., et al., “Whitening effect of α -bisabolol in Asian women subjects”. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 32, n. 4, pp. 299-303, 2010.
- LERTSUTTHIWONG, P., ROJSITTHISAK, P. “Chitosan-alginate nanocapsules for encapsulation of turmeric oil”. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 12, pp. 911-915, 2011.
- LERTSUTTHIWONG, P., ROJSITTHISAK, P., NIMMANNIT, U. “Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules”. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 3, pp. 856-860, 2009.
- LETFORD, K., BURT, H. “A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes”. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, pp. 259-269, 2007.
- LI, M. W., YUDIN, A. I., ROBERTSON, K. R., et al., “Importance of Glycosylation and Disulfide Bonds in Hyaluronidase Activity of Macaque Sperm Surface PH-20”. **Journal of andrology**, v. 23, n. 2, pp. 211-219, 2002.
- LI, S., KELLY, S. J., LAMANI, E., et al. “Structural basis of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase”. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 6, pp. 1228-1240, 2000.

- LIN, Y., MAHAN, K., LATHROP, W. F., et al. "A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg". **The Journal of Cell Biology**, v. 125, n. 5, pp. 1157-1163, 1994.
- LOPES, T. L., 2010, *Modificação do produto natural α -(-)-Bisabolol*. 2010. 160pp. Dissertação* de M.Sc., Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, SP, Brasil.
- MALVERN INSTRUMENTS. "Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes". **Technical Note Malvern, MRK656-01**, pp. 1-8, 2012.
- MARÇALO, A. R. A., 2013, *Nanotecnologia na Dermocosmética: Aplicação a formulações antienvhecimento*. Tese* D.Sc., Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade do Algarve, Portugal.
- MARONA, H., LUCCHESI, M. "Refining the intestinal motility test in mice to reduce animal stress". **Revista de Ciências Farmaceuticas**, pp. 79-82, 2003.
- MARTINS, R. M., PEREIRA, S. V., SIQUEIRA, S., et al., "Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract". **Food Research International**, v. 50, n. 2, pp. 657-663, 2013.
- MATHIAS, I., 2010, *Funcionalização do Peuamm com anidrido maleico via moagem de alta energia*. Dissertação* de M.Sc., Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Rio Grande do Sul, RS, Brasil.
- MAYAUD, L., CARRICAJÓ, A., ZHIRI, A., et al., "Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics". **Letters in applied microbiology**, v. 47, n. 3, pp. 167-173, 2008.
- MCCAY, P. B. "Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate". **Annual Review of Nutrition**, v. 5, n. 1, pp. 323-340, 1985.
- MEYER, K. "Hyaluronidases". In: **The enzymes. Academic press**, pp. 307-320, 1971.
- MIGUEL, L. M. "Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França". **Revista Geográfica de América Central**, v. 2, pp. 1-15, 2011.

- MIHRANYAN, A., FERRAZ, N., STRØMME, M. “Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics”. **Progress in Materials Science**, v. 57, n. 5, pp. 875-910, 2012.
- MISHRA, B. B. T. S., PATEL, B. B., TIWARI, S. “Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery”. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine**, v. 6, n. 1, pp. 9-24, 2010.
- MISHRA, M. **Handbook of encapsulation and controlled release**. 1. ed., CRC Press, 2015.
- MOFIDI, N., AGHAI-MOGHADAM, M., SARBOLOUKI, M. N. “Mass preparation and characterization of alginate microspheres”. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 9, pp. 885-888, 2000.
- MOHANRAJ, V. J., CHEN, Y. “Nanoparticles-a review”. **Tropical journal of pharmaceutical research**, v. 5, n. 1, pp. 561-573, 2006.
- MONDAL, S., LI, C., WANG, K. “Bovine serum albumin adsorption on glutaraldehyde cross-linked chitosan hydrogels”. **Journal of Chemical e Engineering Data**, v. 60, n. 8, pp. 2356-2362, 2015.
- MOON, J., SHIBAMOTO, T. “Antioxidant assays for plant and food components”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, pp. 1655-1666, 2009.
- MORA-HUERTAS, C. E., FESSI, H., ELAISSARI, A. “Polymer-based nanocapsules for drug delivery”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, pp. 113-142, 2010.
- MOSS, G. P., DEARDEN, J. C., PATEL, H., et al., “Quantitative structure–permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption”. **Toxicology in vitro**, v. 16, n. 3, pp. 299-317, 2002.
- MOTTA, E. A. **Perspectivas do investimento nas indústrias baseadas em ciência**. In: Relatório integrante da pesquisa “Perspectivas do Investimento no Brasil”, Instituto de Economia, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

- MOTWANI, S. K., CHOPRA, S., TALEGAONKAR, S., et al., “Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and *in vitro* characterization”. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, pp. 513-525, 2008.
- MUCKENSCHNABEL, I., BERNHARDT, G., SPRUSS, T., et al., “Quantitation of hyaluronidases by the Morgan–Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers”. **Cancer letters**, v. 131, n. 1, pp. 13-20, 1998.
- MURATA, Y. SASAKI, N., MIYAMOTO, E., et al., “Use of floating alginate gel beads for stomach-specific drug delivery”. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 2, pp. 221-226, 2000.
- NAGARAJ, V., JAFFAR, H., ANSARI, N. “Riehl Melanosis in a 27-Year-Old Bahraini Woman”. **Cosmetic Dermatology-Cedar Knolls-**, v. 21, n. 3, pp. 145-150, 2008.
- NASTITI, C., PONTO, T., ABD, E., et al., “Topical nano and microemulsions for skin delivery”. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, pp. 37, 2017.
- NATRAJAN, D., SRINIVASAN, S., SUNDAR, K., et al., “Formulation of essential oil-loaded chitosan–alginate nanocapsules”. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, pp. 560-568, 2015.
- NDIAYE, M., PHILIPPE, C., MUKHTAR, H., et al. “The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges”. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, n. 2, pp. 164-170, 2011.
- NIEMIEC, S. M., RAMACHANDRAN, C., WEINER, N. “Influence of nonionic liposomal composition on topical delivery of peptide drugs into pilosebaceous units: an *in vivo* study using the hamster ear model”. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 8, pp. 1184-1188, 1995.
- OLIVEIRA, M. P. D., ROSSI, W. S., BRENDLER, C. F., et al. “Drawing, virtual modeling and 3D print in the production of didactic models for the teaching-learning of visually impaired students: case study of nanostructured systems”. **International Journal of Education and Research**, v. 13, n. 12, pp. 453-466, 2015.

- PANDEY, R., KHULLER, G. K. “Chemotherapeutic potential of alginate–chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers”. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 4, pp. 635-640, 2004.
- PASTORINO, F., BRIGNOLE, C., MARIMPIETRI, D., et al., “Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy”. **Cancer research**, v. 63, n. 21, pp. 7400-7409, 2003.
- PAWAR, K. R., BABU, R. J. “Polymeric and lipid-based materials for topical nanoparticle delivery systems”. **Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst**, n. 27, pp. 419–459, 2010.
- PERBELLINI, L., GOTTARDO, R., CAPRINI, A., et al., “Determination of alpha-bisabolol in human blood by micro-HPLC–ion trap MS and head space-GC–MS methods”. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, pp. 373-377, 2004.
- PEREIRA, S. V. *Sistemas microestruturados contendo extratos de Chamomilla recutita L. para aplicações dermocosméticas*. Tese* de D.Sc., USP, São Paulo, SP, Brasil.
- PERETTI, S. C., MOREIRA, M. A. L., BARRETO, G. R., et al., “Resveratrol para cosméticos no clareamento da pele”. **InterfacEHS**, v. 10, n. 1, 2015.
- PEREZ, C., SANCHEZ, A., PUTNAM, D., et al., “Poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA”. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 1-2, pp. 211-224, 2001.
- PÉREZ, M., SÁNCHEZ, J. L., AGUILÓ, F. “Endocrinologic profile of patients with idiopathic melasma”. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 81, n. 6, pp. 543-545, 1983.
- PILKINGTON, S. J., BELDEN, S., MILLER, R. A. “The tricky tear trough: A review of topical cosmeceuticals for periorbital skin rejuvenation”. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 8, n. 9, pp. 39, 2015.
- PINNELL, S. R., YANG, H., OMAR, M., et al. “Topical L-ascorbic acid: percutaneous absorption studies”. **Dermatologic Surgery**, v. 27, n. 2, pp. 137-142, 2001.
- PINTO, T. J. A., KANEKO, T. M., PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**, 1. ed., Barueri, Manole, 2015.

- PISKIN, E. "Biodegradable polymers as biomaterials". **Journal of Biomaterials Science, Polyme Edition**, v. 6, n. 9, pp. 775-795, 1995.
- PONCELET, D., LENCKI, R., BEAULIEU, C., et al., "Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I". **Methodology. Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, pp. 39-45, 1992.
- QUINTANAR-GUERRERO, D., ALLÉMANN, E., FESSI, H., et al., "Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers". **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, pp. 1113-1128, 1998.
- QUINTANAR-GUERRERO, D., FESSI, H., ALLÉMANN, E., et al., "Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D, L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 143, n. 2, pp. 133-141, 1996.
- RADTCHENKO, I. L., SUKHORUKOV, G. B., MÖHWALD, H. "Incorporation of macromolecules into polyelectrolyte micro-and nanocapsules via surface controlled precipitation on colloidal particles". **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 202, n. 2-3, pp. 127-133, 2002.
- RAJARATNAM, R., HALPERN, J., SALIM, A., et al. "Interventions for melasma". **Cochrane database of systematic reviews**, n. 7, 2010.
- RAJENDRAN, R., RADHAI, R., KOTRESH, T. M., et al., "Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles". **Carbohydrate polymers**, v. 91, n. 2, pp. 613-617, 2013.
- RAWAT, M., SINGH, D., SARAF, S., et al., "Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs". **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, pp. 1790-1798, 2006.
- REIS, C. P., NEUFELD, R. J., VILELA, S., et al., "Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles". **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 3, pp. 245-257, 2006.

- RIBEIRO, A. J., SILVA, C., FERREIRA, D., et al., "Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique". **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, pp. 31-40, 2005.
- ROBERTS, W. E. "Periorbital hyperpigmentation: review of etiology, medical evaluation, and aesthetic treatment". **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 13, n. 4, pp. 472-482, 2014.
- RODRIGUES, A. P., HIRSCH, D., FIGUEIREDO, H. C. P., *et al.*, "Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination". **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, pp. 638-643, 2006.
- ROGER, E., LAGARCE, F., GARCION, E., et al. "Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery". **Nanomedicine**, v. 5, n. 2, pp. 287-306, 2010.
- ROH, M. R., CHUNG, K. Y. "Infraorbital dark circles: definition, causes, and treatment options". **Dermatologic surgery**, v. 35, n. 8, pp. 1163-1171, 2009.
- ROMANOWSKI, P., SCHUELLER, R. "Fundamentals of cosmetic product safety testing: A discussion of commonly employed test methods". **Cosmetics and Toiletries**, v. 111, n. 10, pp. 79-86, 1996.
- ROMERO-CANO, M. S., VINCENT, B. "Controlled release of 4-nitroanisole from poly (lactic acid) nanoparticles". **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 1, pp. 127-135, 2002.
- ROSSI-BERGMANN, B. "A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico". **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, pp. 54-57, 2008.
- SABITHA, P., RATNA, J. V., REDDY, K. R. "Design and evaluation of controlled release chitosan-calcium alginate microcapsules of antitubercular drugs for oral use". **Int. J. Chem. Technol. Res**, v. 2, n. 1, pp. 88-98, 2010.
- SAHASATHIAN, T., PRAPHAIRAKSIT, N., MUANGSIN, N. "Mucoadhesive and floating chitosan-coated alginate beads for the controlled gastric release of amoxicillin". **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 6, pp. 889-899, 2010.

- SAITOH, H., TAKAGAKI, K., MAJIMA, M. *et al.* “Enzymic reconstruction of glycosaminoglycan oligosaccharide chains using the transglycosylation reaction of bovine testicular hyaluronidase”. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 8, pp. 3741-3747, 1995.
- SALIM, V. M. M., BORGES, C.P, ALVES, T.L.M, et al., **Fenômenos Interfaciais**. Rio de Janeiro, Escola Piloto-Programa de Engenharia Química–COPPE/UFRJ, 2005.
- SANCHEZ, N. P., PATHAK, M. A., SATO, S., et al. “Melasma: a clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study”. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 4, n. 6, pp. 698-710, 1981.
- SATHYA, S., SHANMUGANATHAN, B., MANIRATHINAM, G., et al., “ α -Bisabolol loaded solid lipid nanoparticles attenuates A β aggregation and protects Neuro-2a cells from A β induced neurotoxicity”. **Journal of Molecular Liquids**, v. 264, pp. 431-441, 2018.
- SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. L. D. L., et al., “Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos”. **Química nova**, v. 26, n. 5, pp. 726-737, 2003.
- SHAHID, M., BUKHARI, S. A., GUL, Y., et al., “Graft polymerization of guar gum with acryl amide irradiated by microwaves for colonic drug delivery”. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, pp. 172-179, 2013.
- SHIN, J., KIM, J.H., KIM, E. K. “Repeated exposure of human fibroblasts to UVR induces secretion of stem cell factor and senescence”. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, n. 12, pp. 1577-1580, 2012.
- SIHMID, D., ZUELLI, F. “Role of beta-endorphin in the skin”. **SÖFW-journal**, v. 131, n. 4, pp. 4-8, 2005.
- SINGH, R., TIWARI, S., TAWANIYA, J. “Review on nanotechnology with several aspects”. **International Journal of Research in Computer Engineering and Electronics**, v. 2, n. 3, pp. 1–8, 2013.

- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA - SBD. *Censo dermatológico da SBD 2018*, 2018. Disponível em: <http://www.sbd.org.br>. Acesso em 27 de mar 2019, 18:54:20.
- SOLIMAN, E. A., EL-MOGHAZY, A. Y., EL-DIN, M. M., et al., “Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and *in vitro* evaluation of antifungal activity”. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 3, n. 01, pp. 48, 2013.
- SOPARKAR, C. N. S., PATRINELY, J. R., SKIBELL, B. C., et al., “Hyaluronidase and restylane”. **Archives of Facial Plastic Surgery**, v. 9, n. 4, pp. 299-300, 2007.
- SOPPIMATH, K. S. AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R., et al., “Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices”. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1-2, pp. 1-20, 2001.
- SOUZA, A. L. R., KIILL, C. P., SANTOS, F. K., et al., “Nanotechnology-based drug delivery systems for dermatomycosis treatment”. **Current Nanoscience**, v. 8, n. 4, pp. 512-519, 2012.
- SOUZA, K. V., PERALTA-ZAMORA, P., ZAWADZKI, S. F. “Imobilização de ferro (II) em matriz de alginato e sua utilização na degradação de corantes têxteis por processos Fenton”. **Química Nova**, v. 31, n. 5, pp. 1145-1149, 2008.
- STEICHEN, S. D., CALDORERA-MOORE, M., PEPPAS, N. A. “A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics”. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, pp. 416-427, 2013.
- STERN, R., JEDRZEJAS, M. J. “Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action”. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 3, pp. 818-839, 2006.
- STOCCO, B., 2016, *Avaliação da atividade estrogênica de extrato de soja biotransformado por fungo na produção de colágeno*. Tese* de D.Sc, USP, São Paulo, SP, Brasil.
- SUAVE, J., DALL’AGNOL, E. C., PEZZIN, A. P. T., et al., “Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas”. **Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, pp. 12-20, 2006.

- SUBBIAH, R., VEERAPANDIAN, M., S YUN, K. “Nanoparticles: functionalization and multifunctional applications in biomedical sciences”. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 36, pp. 4559-4577, 2010.
- SUHONEN, T. M., BOUWSTRA, J. A., URTTI, A. “Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations”. **Journal of Controlled Release**, v. 59, n. 2, pp. 149-161, 1999.
- SUTAPHANIT, P., CHITPRASERT, P. “Optimisation of microencapsulation of holy basil essential oil in gelatin by response surface methodology”. **Food chemistry**, v. 150, pp. 313-320, 2014.
- SVOBODA, K. P., GREENAWAY, R. I. “Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L.(summer savory) and phytochemical comparison of different varieties”. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 4, pp. 196-202, 2003.
- TAN, N., PONNUDURAI, G. N. A. N. A. J. O. T. H. Y. “Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms”. **Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 103, n. 2, pp. 299-302, 1992.
- TAYLOR, S. C. “Epidemiology of skin diseases in ethnic populations”. **Dermatologic Clinics**, v. 21, n. 4, pp. 601-607, 2003.
- TEIXEIRA, G. F. D., VIEIRA-NETO, A. E., DA COSTA, F. N., et al., “Antinociceptive effect of (-)- α -Bisabolol in nanocapsules”. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 91, pp. 946-950, 2017.
- TEIXEIRA, M., ALONSO, M. J., PINTO, M. M., et al. “Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone”. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, n. 3, pp. 491-500, 2005.
- TERROSO, T. F., CONDOTTA, K. B., DA FONSECA, F. N., et al., “*In vivo* prophylactic gastroprotection using α -Bisabolol encapsulated in lipid-core nanocapsules and in cocoa-theospheres”. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 36, pp. 99-109, 2016.

- TOGNOLO, A. C. T., 2017, *Funcionalização de nanopartículas superparamagnéticas com polímero termossensível para liberação controlada de fármaco e hipertermia magnética*. Dissertação* de M.Sc., UNESP, São Paulo, SP, Brasil.
- TOLKSDORF, S., MCCREADY, M. H. “The turbidimetric assay of hyaluronidase”. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 34, n. 1, pp. 74-89, 1949.
- TOLL, R., JACOBI, U., RICHTER, H., et al., “Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles”. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 1, pp. 168-176, 2004.
- TORRECILLA, D. LOZANO, M. V., LALLANA, E., *et al.*, “Anti-tumor efficacy of chitosan-g-poly (ethylene glycol) nanocapsules containing docetaxel: anti-TMEFF-2 functionalized nanocapsules vs. non-functionalized nanocapsules”. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 3, pp. 330-337, 2013.
- TOUITOU, E. “Drug delivery across the skin”. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 2, n. 7, pp. 723-733, 2002.
- TREVITHICK, J. R., XIONG, H., LEE, S., et al., “Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-associated erythema, edema, and skin sensitivity in hairless mice”. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 296, n. 2, pp. 575-582, 1992.
- TSOLI, M., KUHN, H., BRANDAU, W., et al., “Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters”. **Small**, v. 1, n. 8-9, pp. 841-844, 2005.
- VASHI, N. A., KUNDU, R. V. “Facial hyperpigmentation: causes and treatment”. **British Journal of Dermatology**, v. 169, pp. 41-56, 2013.
- VILJOEN, A. M., GONO-BWALYA, A., KAMATOU, G. P., et al., “The Essential Oil Composition and Chemotaxonomy of *Salvia stenophylla* and its Allies *S. repens* and *S. runcinate*”. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, 2006.
- VONCINA, B., KREFT, O., KOKOL, V., et al., “Encapsulation of rosemary oil in ethylcellulose microcapsules”. **Textile and Polymer Journal**, v. 1, n. 1, pp. 13, 2009.

- WISSING, S. A., MÜLLER, R. H. “The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity—*in vivo* study”. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 1, pp. 67-72, 2003.
- WOHLRAB, J., FINKE, R., FRANKE, W. G., et al., “Clinical trial for safety evaluation of hyaluronidase as diffusion enhancing adjuvant for infiltration analgesia of skin with lidocaine”. **Dermatologic Surgery**, v. 38, n. 1, pp. 91-96, 2012.
- XU, R. “Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement”. **Particuology**, v. 6, n. 2, pp. 112-115, 2008.
- XU, X., GUY, R. H. “Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics”. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 19, n. 6, pp. 371-384, 2009.
- YAMAZAKI, S. S., SILVEIRA, D. B., 2010, *O direito dos animais frente às pesquisas laboratoriais das indústrias dos cosméticos*. Monografia*, Centro Universitário Toledo, Araçatuba, São Paulo, SP, Brasil.
- YILMAZ, E., BORCHERT, H.. “Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema—an *in vivo* study”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, pp. 232-238, 2006.
- YOUNG, A. R. “Chromophores in human skin”. **Physics in Medicine e Biology**, v. 42, n. 5, pp. 789, 1997.
- ZAHALKA, M. A., OKON, E., GOSSLAR, U., *et al.*, “Lymph node (but not spleen) invasion by murine lymphoma is both CD44-and hyaluronate-dependent”. **The Journal of Immunology**, v. 154, n. 10, pp. 5345-5355, 1995.
- ZANEVELD, L. J. D., POLAKOSKI, K. L., SCHUMACHER, G. F. B. “Properties of Acrosomal Hyaluronidase from Bull Spermatozoa Evidence for its Similarity to Testicular Hyaluronidase”. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 2, pp. 564-570, 1973.
- ZHENG, Z., TAN, H., WANG, M. “Tyrosinase inhibition constituents from the roots of *Morus australis*”. **Fitoterapia**, v. 83, n. 6, pp. 1008-1013, 2012.

- ZHOU, H., FAN, Z., DENG, J., et al., “Hyaluronidase embedded in nanocarrier PEG shell for enhanced tumor penetration and highly efficient antitumor efficacy”. **Nano letters**, v. 16, n. 5, pp. 3268-3277, 2016.
- ZHOU, J., RALSTON, J., SEDEV, R., et al., “Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability”. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 331, n. 2, pp. 251-262, 2009.
- ZIELINSKI, J. E., PINNELL, S. R. “Stabilized ascorbic acid compositions and methods therefor”. **U.S. Patent**, n. 7, 2007.
- ZILI, Z., SFAR, S., FESSI, H. “Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, n. 1-2, pp. 261-267, 2005.
- ZOHRI, M., ALAVIDJEH, M. S., HARIRIAN, I., et al., “A comparative study between the antibacterial effect of nisin and nisin-loaded chitosan/alginate nanoparticles on the growth of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk samples”. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 2, n. 4, pp. 258-266, 2010.