

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

PATRÍCIA FERNANDA DE SOUZA

**Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado (CLN)
como sistema de co-encapsulação de curcuminóides e timol para
aplicação tópica**

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado (CLN)
como sistema de co-encapsulação de curcuminóides e timol para
aplicação tópica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Patrícia Fernanda de Souza

Orientadora: Prof^a. Dr^a Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 29/01/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

De Souza, Patrícia Fernanda

Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado (CLN) como sistema de co-encapsulação de curcuminóides e timol para aplicação tópica. Ribeirão Preto, 2017. 186 p.: 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Marcato Gaspari, Priscyla Daniely.

1. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 2. Curcuminóides.
3. Timol. 4. Formulação tópica. 5. Emulgel.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Patrícia Fernanda de Souza

Título do trabalho: Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado (CLN) como sistema de co-encapsulação de curcuminóides e timol para aplicação tópica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho,

*As pessoas mais importantes na minha vida, meus pais **Sueli e Roberto** que sempre acreditaram em mim, sempre ofereceram apoio incondicional, suporte e incentivo para alcance dos meus objetivos e sonhos.*

*Ao meu amigo, companheiro e namorado **Paulo**, pessoa que admiro e que esteve sempre ao meu lado me incentivando e apoiando nos momentos mais difíceis dessa trajetória.*

*Aos **amigos** que foram família e ao meu irmão **Paulo Roberto** que me apoiaram e souberam entender a ausência necessária e as dificuldades para completar essa etapa da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus amigos e ao meu namorado por terem sempre me apoiado e incentivado e por estarem presentes em todos os momentos dos felizes aos mais difíceis. Amo vocês!

Agradeço especialmente à Profa. Dr^a Priscyla Daniely Marcato Gaspari por ter aceitado me orientar diante de todas as condições adversas de tempo, pela dedicação no seu papel de orientadora, pelo empenho, amor, incentivo e amizade. Por sempre me compreender e ajudar da melhor forma. E por toda confiança depositada em mim. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Flavio da Silva Emery por me aceitar no programa, por me permitir tentar e por compreender e apoiar as mudanças quando a realização do Mestrado parecia não ser mais possível.

Agradeço imensamente aos técnicos Tais Nader Chrysostomo Massaro, Luís Henrique Cenzi, Fabíola Garcia, Aurea Donizeti Lanchote, José Roberto Jabor, Henrrique Diniz, José Orestes Del Ciampo, Patrícia Sper Simão, Eduardo Tozatto e Ivana Borin pela gentileza com que sempre me ajudaram na realização dos experimentos.

Aos amigos no NanoBiolab pelos momentos vividos, experiências e experimentos compartilhados e pelas muitas risadas. Pela ajuda nos momentos de angústia e dificuldades. Em especial agradeço a Thais Priscilla Pivetta, Tais Nader Chrysostomo Massaro, Jacqueline Campos, Letícia Bueno, Marisa Miranda e Ana Helena Sampar que sempre me ajudaram e fizeram desse trajeto menos árduo.

Aos professores Jairo Kenupp Bastos, Maria Vitória Lopes Badra Bentley, Yara Maria Lucisano Valim, Luís Alexandre Pedro de Freitas, Maria José Vieira Fonseca, Renata Fonseca Vianna Lopez, Lorena Rigo Gaspar Cordeiro e Flavio da Silva Emery por disponibilizar a infraestrutura dos laboratórios para realização dos experimentos.

À Caroline Arruda pela gentileza e grande ajuda na realização das análises de HPLC.

À Dayane Moraes pela disponibilidade em ensinar e ajudar com a realização do teste de quimioluminescência.

À Margarete Moreno pela disposição na realização do teste de viabilidade celular.

Aos amigos do QHETEM por me acolherem e tentarem me ensinar algo de síntese, por me mostrar novos caminhos e pelas inúmeras e divertidas confraternizações.

À empresa Ourofino Saúde Animal em especial à minha amiga e na época coordenadora Maira, por sempre me apoiar e incentivar no meu crescimento pessoal e profissional e por flexibilizar meu horário de trabalho viabilizando a realização desse trabalho.

À Coordenação do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelo suporte e auxílio no projeto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim agradeço todos àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

DE SOUZA, P. F. **Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado (CLN) como sistema de co-encapsulação de curcuminóides e timol para aplicação tópica**. 2017. 186f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A pele desempenha um importante papel na homeostasia e é uma via muito utilizada na administração de fármacos. O envelhecimento compromete sua função protetora e contribui para o aparecimento de sintomas como a rugosidade, flacidez, secura, prurido, hiperpigmentação dificuldade de cicatrização e a incidência de melanomas. Os raios UV são a principal causa do envelhecimento devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica. Os danos causados pelos ROS podem ser mitigados pelo uso de antioxidantes tópicos como a curcumina e timol (TML). No entanto, a baixa permeabilidade e estabilidade são fatores limitantes para sua aplicação. Para superar esses desafios, ECUR e TML podem ser encapsulados em nanopartículas, como os carreadores lipídicos nanoestruturado (CLN). Assim, os objetivos desse projeto foi desenvolver um CLN estável com manteiga Illipê, óleo de calêndula e TPGS para co-encapsular ECUR e TML e incorporação em uma formulação tópica. O padrão analítico dos curcuminóides foi isolado de amostra comercial, identificado por LC-MS e RMN e a metodologia analítica para quantificação CUR e TML foi validada. Os CLNs foram produzidos por emulsão quente e sonicação e otimizados utilizando a ferramenta de DoE Box-Behnken. Foram caracterizados em relação às propriedades físicas, citotoxicidade em células HaCaT e atividade antioxidante. O CLN otimizado apresentou tamanho em torno de 130 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,200 e potencial zeta negativo. A eficiência de encapsulação foi acima de 97% tanto para TML quanto CUR. CLN com e sem ativos demonstrou baixo índice de recristalização e forma esférica caracterização por DSC e AFM e não foram citotóxicos para células HaCaT, mostrando viabilidade celular superior a 80% na concentração $1,48 \times 10^{12}$ partículas/ml, correspondente a 0,8 µg/ml de TML/CUR co-encapsulados. Além disso, TML/CUR livre e co-encapsulado mostrou alta atividade antioxidante em ensaios *in vitro* para inibição de xantina oxidase e auto-oxidação do pirrogalol, indicando sua potente capacidade de inibição da enzima superóxido dismutase mesmo quando encapsulados. O emulgel tópico foi desenvolvido e apresentou estabilidade física após a incorporação do CLN no teste de estabilidade acelerada. O perfil reológico do emulgel demonstrou característica plástica e reopexa e se manteve estável com o tempo e sob as variações de temperatura de análise, indicando alta estabilidade física da formulação. O perfil de liberação de ECUR e TML indicou cinética de liberação correspondente ao modelo de Higuchi sem influência da co-encapsulação na liberação da CUR e com liberação mais lenta do TML encapsulado. Os dados de permeação sugerem que os ativos possam permear na pele. A extensão e a intensidade da permeabilidade dos ativos promovida pelo CLN determinarão a aplicabilidade da formulação que poderá ser interessante para o desenvolvimento de um produto cosmético, dermocosmético, ou mesmo para um medicamento transdérmico. Em conclusão, o CLN desenvolvido apresentou características físicas e biológicas interessantes para a aplicação tópica.

Palavras-chave: carreadores lipídicos nanoestruturados, curcuminóides, timol, aplicação tópica, emulgel.

ABSTRACT

DE SOUZA, P. F. **Development of nanostructured lipid carrier (NLC) as a co-encapsulation system of curcumin and thymol for topical application.** 2017. 186f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Skin plays an important role in homeostasis and it is an important route for drug delivery. Aging compromises its protective function and contributes to the appearance of symptoms such as roughness, sagging, dryness, pruritus, hyperpigmentation, scarring deficient and the incidence of melanomas. UV rays are the main cause of photo-aging due of ROS generation and lipid peroxidation. ROS damage can be mitigated by using topical antioxidants as curcumin and thymol. However, low permeability and physico-chemical stability are disadvantages for its clinical application. To overcome these challenges, ECUR and TML can be encapsulated in nanoparticles such as nanostructured lipid carriers (NLC). This project aimed to develop a stable NLC composed by Illipê butter, calendula oil and TPGS to co-encapsulate ECUR and TML, followed by the NLC incorporation into a cosmetic formulation. Curcuminoid's analytical standard was isolated from commercial sample, identified by LC-MS and NMR, and the analytical methodology for quantification CUR and TML was validated. NLCs were produced by sonication emulsification method and their development was designed by Box-Behnken DoE and characterized in relation to physical properties, HaCaT cell cytotoxicity and antioxidant activity. Optimized NLC with size around 130 nm, polydispersity index (Pdl) below 0.200 and negative zeta potential was obtained. The encapsulation efficiency (EE%) was above 97% for both TML and CUR. Empty and co-encapsulated NLC showed in DSC and AFM characterization low recrystallization index and spherical shapes and were not cytotoxic for HaCaT cells, showing cell viability over 80% at the maximum concentration evaluated (1.48×10^{12} particles / ml, wich corresponds to 0.8 μg / ml co-encapsulated TML / CUR). Furthermore, free and co-encapsulated TML / CUR showed high antioxidant activity in *in vitro* assays due inhibition of xanthine oxidation and pyrogallol autoxidation, indicating their potent superoxide dismutase inhibition even when co-encapsulated. The cosmetic emulgel was developed and physically stable after NLC incorporation in accelerated stability. Emulgel rheological profile showed a plastic and rheopexy characteristic, which remained storage stability. The rheological profile did not change due variations in the temperature analysis, indicating good formulation physical stability and cosmetic acceptability. The release profile of ECUR/TML release kinetics corresponded to the Higuchi model without influence of co-encapsulation with slower release of the encapsulated TML. Permeation data suggest that the active substances may permeate deep into skin. The actives permeability extent and intensity promoted by CLN will determine the applicability of the formulation that can be interest for the development of a cosmetic, dermocosmetic product or even for a transdermal drug. In conclusion, the developed CLN presented interesting physical and biological characteristics for topical application.

Keywords: nanostructured lipid carriers, curcumin, thymol, topical application, emulgel.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estruturas da pele e Permeação cutânea

A pele constitui o maior órgão do corpo humano, estando constantemente exposta aos danos físicos, químicos e microbiológicos aos quais estamos suscetíveis, sendo, portanto uma barreira de proteção (Lin et al., 2018). Também permite a percepção de estímulos sensoriais e conserva a homeostasia do corpo através da regulação térmica, hidrodinâmica e do metabolismo. Seu revestimento é multifuncional e de composição complexa, sendo histologicamente dividida em duas camadas teciduais distintas a camada mais externa, denominada derme; e a epiderme, camada mais interna que tem continuidade com a hipoderme, rica em tecido adiposo (Souto e Lopes, 2011).

A derme é formada por um tecido conjuntivo denso, altamente vascularizado e inervado com terminações nervosas livres. As células principais da derme são os fibroblastos, responsáveis pela síntese de colágeno e elastina (Losquadro, 2017). Também estão presentes as células responsáveis pelas respostas imunitárias (mastócitos e macrófagos) e as glândulas sudoríparas e sebáceas, folículos pilosos e as unhas, esses são denominados de anexos cutâneos (Souto e Lopes, 2011).

A epiderme é por sua vez composta de diversas camadas celulares, sendo elas desde a mais profunda até a mais superficial, o estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo (Fuchs e Raghavan, 2002; Baroni *et al.*, 2012). O estrato basal é responsável pela renovação celular, nele estão presentes os queratinoblastos, células indiferenciadas que sofrem proliferação, diferenciação e queratinação, passando a serem denominadas de queratinócitos, células fundamentais da epiderme (Ulmann *et al.*, 2007; Lorencini *et al.*, 2014). O processo de diferenciação ocorre desde o estrato basal até a camada mais superficial do estrato córneo, onde os queratinócitos se transformam em corneócitos (Souto e Lopes, 2011).

No estrato basal também está presente a maior concentração de cisteína, aminoácido que dá origem a proteína estrutural da pele, a queratina. A biossíntese da queratina tem início no estrato basal, formando a queratohialina,

molécula precursora que se organiza em granulações nas células do estrato granuloso dando origem à queratina (Souto e Lopes, 2011).

O estrato córneo apresenta a maior barreira de proteção da pele, possui uma espessura de 15 a 20 μm , constituída principalmente pelos corneócitos, células desidratadas, anucleadas e cheias de queratina (Souto e Lopes, 2011). A organização dos corneócitos vai se tornando frouxa e desorganizada nas camadas mais superficiais da pele onde sofrem descamação (Eckhart *et al.*, 2013; Costanzo *et al.*, 2015). No estrato córneo ocorre a liberação de emulsão de lipídeos e conteúdos aquosos provenientes das glândulas sudoríparas e sebáceas e produtos da queratinização. Essas secreções embebem as células mortas e possui um pH entre 5,0- 5,5. Na interface celular encontra-se a matriz intercelular, formada por compostos com propriedades tensoativas como ceramidas, colesterol e ácidos graxos livre que formam a bicamada lipídica cuja composição influí diretamente na permeabilidade da pele (Hadgraft, 2001).

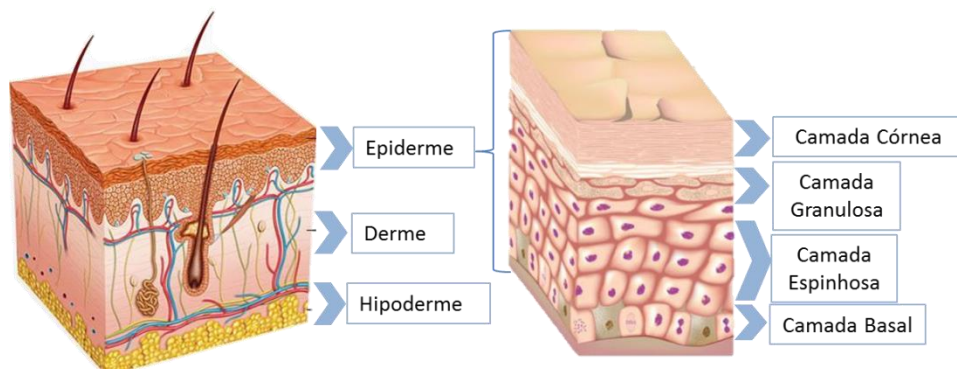


Figura 1. Anatomia da pele evidenciando as camadas da epiderme. Adaptado de Fonte: <http://www.dermatologia.net/a-pele/>.

Existem vias pelas quais os fármacos podem permear através da pele para exercer funções farmacológicas sejam elas vias tópicas ou sistêmicas (Marwah *et al.*, 2016). A permeação dérmica ou transdérmica pode ocorrer de forma passiva pela difusão do fármaco através da pele e está por sua vez pode ocorrer por duas vias, a via anexial, onde a permeação ocorre pelos anexos cutâneos, e a via transepidérmica que envolve a passagem do fármaco pela matriz lipoproteica intercelular ou através das células da epiderme (intracelular) (Herman e Herman, 2015; Marwah *et al.*, 2016).

A via transepidérmica é a principal via de permeação para fármacos e ativos cosméticos e cosmecêuticos. As características físico-químicas das moléculas irão influenciar na via de permeação da mesma na pele. Que por sua vez terão sua permeabilidade influenciada diretamente pela característica do veículo ao qual está incorporado e as condições da pele (Herman e Herman, 2015). Embora existam meios pelos quais os fármacos e moléculas possam permear através da pele, o desenvolvimento de produtos tópicos continua sendo um desafio enfrentado pela indústria farmacêutica e cosmética (Naik *et al.*, 2000). Isso porque muitas moléculas apresentam baixa permeabilidade por essas vias, podendo, além disso, ser irritantes para as células da epiderme, não apresentarem estabilidade adequada ou mesmo não atingir o local desejado para sua ação (Naik *et al.*, 2000; Walter e Xu, 2015).

Como consequência, diversas tecnologias têm sido desenvolvidas para viabilizar a aplicação tópica de moléculas (Marwah *et al.*, 2016). Dentre elas pode-se citar o uso de substâncias promotoras da absorção que incrementam a solubilidade da molécula nas estruturas da epiderme ou mesmo modificam a estrutura do estrato córneo. Embora, esta técnica possa aumentar a permeabilidade de moléculas ativas muitas vezes não será eficiente para diminuir sua irritabilidade, melhorar sua estabilidade ou direcioná-lo para o local de ação (Walter e Xu, 2015). Para tal, umas das estratégias que vem sendo utilizada é o encapsulamento do fármaco ou moléculas ativas em nanoestruturas (Costa e Santos, 2017), dentre as quais se destacam o desenvolvimento de sistemas micro ou nanoemulsionados, os lipossomas, e as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), que além de permitirem uma maior permeação do fármaco quando comparado à molécula livre, fornece uma liberação sustentada e direcionada do mesmo, diminuindo possíveis efeitos irritantes e melhorando sua estabilidade (Uprit *et al.*, 2013; Walter e Xu, 2015; Montenegro *et al.*, 2016).

1.2. Envelhecimento da pele e ação preventiva dos antioxidantes

O envelhecimento é um processo natural e tempo-dependente que ocorre no organismo. Trata-se de alterações biomoleculares que acontecem a nível celular. Essas alterações levam a perda progressiva das funções normais dos

órgãos e sofrem influência do meio no qual o organismo está exposto ao longo da vida (Montagner e Costa, 2009).

As principais alterações biomoleculares observadas no processo de envelhecimento são a senescência celular e a diminuição da produção de colágeno associado ao aumento da sua degradação. Essas alterações acontecem seja pelo fator cronológico intrínseco e predisposição genética como pela exposição a agentes químicos e físicos, como os raios UV através da exposição solar (foto-envelhecimento) (Lorencini *et al.*, 2014).

A exposição aos raios UV são os principais responsáveis extrínsecos pelos danos celulares e genéticos sofridos na pele, e principais responsáveis pelo foto-envelhecimento. A exposição aos raios UVA e UVB formam, através de mecanismos distintos, espécies reativas do oxigênio (ROS), causam a diminuição da síntese de colágeno nos fibroblastos, acelerando a pigmentação pela estimulação da melanogênese e a atividade das glândulas sebáceas. Além disso, pode aumentar a secreção de sebo devido ao aumento a oxidação de lipídeos, colesterol e triglicerídeos presentes na pele, favorecendo o desenvolvimento da acne e processos inflamatórios (Masaki, 2010).

Os ROS podem ser formados de forma endógena (através da respiração celular e processos biológicos) ou exógena (Montagner e Costa, 2009). Fisiologicamente as células da epiderme possuem mecanismos de combate aos ROS, dentre eles destaca-se o sistema ubiquitina-proteossoma que funciona como um antioxidante secundário, marcando as células senescentes e destinando-as à proteólise com a função de renovação celular. Porém, esses mecanismos se tornam enfraquecidos com o envelhecimento e como consequência ocorre um aumento no estresse oxidativo e dos danos às proteínas celulares da epiderme e ao DNA, somado à maior senescência celular (Lorencini *et al.*, 2014).

As alterações na morfologia da epiderme por consequência do envelhecimento não só comprometem sua função de proteção como também colabora para o surgimento de rugosidades e flacidez, secura, prurido, hiperpigmentação, fragilidade, dificuldade de cicatrização e diminuição da absorção de fármacos como também da incidência de melanomas (Lorencini *et al.*, 2014). Portanto, a preservação da sua homeostasia e tenacidade se fazem

importante não somente pelo fator estético como para prevenção de doenças relacionadas à senilidade e uma maior qualidade de vida (Cui *et al.*, 2016).

O uso tópico de substâncias antioxidantes atenua os efeitos causados pelo acúmulo de ROS, despertando grande interesse de pesquisadores e da indústria (Costa e Santos, 2017). Na área cosmética produtos com atividade antioxidante são os anti-aging mais populares do mercado e somado ao aumento na demanda dos consumidores por produtos de origem natural (Antignac *et al.*, 2011; Brewer, 2011), tem-se os curcuminóides e (ECUR) e o timol (TML) como potenciais moléculas com efeito antioxidante para uso como anti-aging (Ratz-Lyko *et al.*, 2015).

1.2.1. Curcuminóides

A curcumina, como é popularmente conhecida, é um corante natural de coloração amarelo da classe dos polifenóis isolado dos rizomas da planta *Curcuma longa*. O seu extrato comercial é composto de uma mistura de curcuminóides, sendo os três principais a própria curcumina (CUR), a demetoxicurcumina (DMC) e a bis-demetoxicurcumina (BDMC), todos com atividades biológicas relatadas (Syedl *et al.*, 2015). Tem sido extensivamente utilizando na medicina Ayuverdica como anti-inflamatório, mas também possui atividades relatadas como antioxidante, antimicrobiano, anti-carcinogênico, e atividade nos processos degenerativos relacionados à senescência (Miquel *et al.*, 2002).

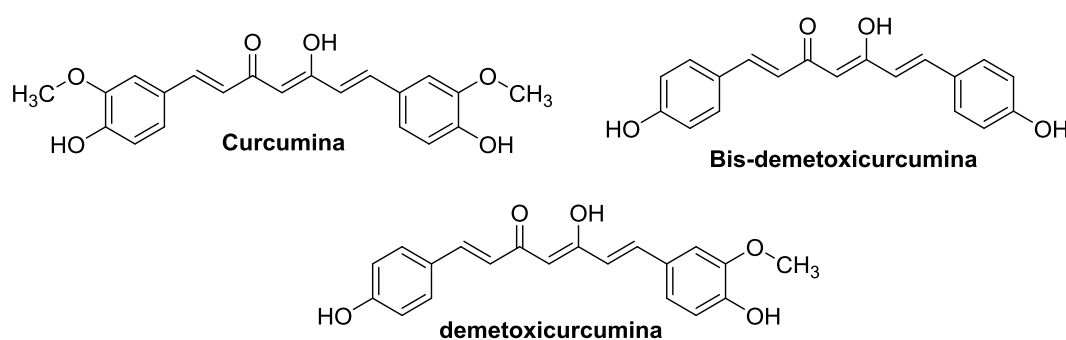


Figura 2. Fórmulas estruturais dos principais curcuminóides encontrados na amostra comercial de curcumina.

Processos biológicos com mecanismos relacionados ao estresse oxidativo são de especial interesse para a ação antioxidante da CUR, incluindo anti-aging (Lima *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2012; Tundis *et al.*, 2015). Testes realizados *in vitro* e *in vivo* comprovaram uma importante ação antioxidante da CUR pela inibição da peroxidação lipídica (Ramirez-Tortosa *et al.*, 1999). Outra atividade apresentada foi o efeito anti-psoriático observado em modelo em ratos e em pacientes com psoríase ativa (Heng *et al.*, 2000). Também já foi descrito na literatura a atividade anti-inflamatória, antitumoral, antirreumática, antidiabética, antiviral da CUR além de atuar como modulador imunológico (Miquel *et al.*, 2002; Teiten *et al.*, 2014; Tundis *et al.*, 2015). Embora seja um antioxidante potente, a curcumina apresenta uma limitada aplicação clínica devido a sua alta lipofilicidade, baixa permeabilidade, baixa biodisponibilidade tópica e oral, e instabilidade físico-química (Friedrich *et al.*, 2015).

Muitas técnicas para encapsulamento e promoção da permeabilidade da CUR já foram testadas visando favorecer seu uso em produtos, seja farmacêutico ou cosmético (Anand *et al.*, 2007). O desenvolvimento de vesículas lipossomais e niossomas de CUR aumentou sua solubilidade e permeabilidade na epiderme, favorecendo seu efeito antioxidativo no foto-envelhecimento e estresse oxidativo (Gupta e Dixit, 2011).

O nano-encapsulamento de CUR com resveratrol em partícula polimérica de poli(caprolactona) com óleo de semente de uva aumentou a permeabilidade e a biodisponibilidade destes compostos, apresentando um efeito sinérgico sobre a biodisponibilidade e permeabilidade do resveratrol (Friedrich *et al.*, 2015).

1.2.2. Timol

O timol (TML) é um monoterpene encontrado em alta concentração no óleo essencial obtido das folhas de *Lippia sidoides Cham.*, arbusto aromático presente no nordeste brasileiro conhecido popularmente pelo nome de alecrim-pimenta (Maia De Oliveira *et al.*, 2014) ou erva do Thyme (*Thymus vulgaris*), o popular orégano (Pan *et al.*, 2014; Marchese *et al.*, 2016).

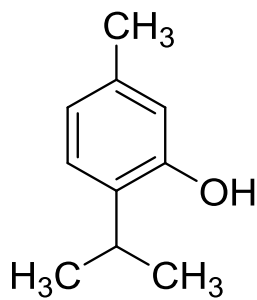


Figura 3. Fórmula estrutural do timol (TML).

Seu uso na medicina popular e como fitoterápico é amplamente conhecido (Maia De Oliveira *et al.*, 2014). Diversas atividades farmacológicas são descritas para o TML, como anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana e antioxidante (Riella *et al.*, 2012; Wattanasatcha *et al.*, 2012; Marchese *et al.*, 2016).

Como antioxidante foi relatada sua atividade sobre a inibição da peroxidação lipídica e na geração de radicais livres (Braga *et al.*, 2006). Além disso, pode também estimular a proliferação de fibroblastos podendo levar ao aumento na deposição de colágeno, conforme observado em estudo *in vivo* realizado em ratos (Riella *et al.*, 2012). Cornaghi e colaboradores (2015), demonstraram importante efeito do timol e do extrato de *Thymus vulgaris L.* na prevenção de danos celulares causados pela exposição aos raios UV e suportaram a possibilidade do seu uso tanto na indústria alimentícia como cosmética (Cornaghi *et al.*, 2015).

Devido a essas propriedades sugere-se seu potencial uso como anti-aging (Javan e Javan, 2014). O TML pode ainda fornecer um efeito sinérgico quando associado a outro composto com atividade antioxidante como os curcuminóides (Gao e Singh, 1997; 1998). Os terpenos possuem conhecida capacidade em atuar como promotor de permeação aumentando a permeabilidade de fármacos da pele por dissolver componentes da camada córnea aumentando a descontinuidade e fluidez do tecido (Jain *et al.*, 2017). Dessa forma o TML também pode atuar sinérgicamente como um promotor de permeação para os curcuminóides.

Entretanto, assim como os curcuminóides, o TML apresenta elevada lipossolubilidade, baixa estabilidade e alta reatividade (Pan *et al.*, 2014). Apresenta atividade sobre as membranas celulares desestabilizando a dupla camada lipídica e atua sobre as proteínas dos canais iônicos de cálcio alterando

o fluxo do íon e por isso, pode apresentar citotoxicidade dependendo da concentração utilizada (Kang *et al.*, 2014; Maia De Oliveira *et al.*, 2014). Assim, acredita-se que inclusão do TML em um carreador lipídico nanoestruturado poderá além de melhorar sua solubilidade diminuir seu potencial efeito citotóxico e a dose de aplicação.

Diversas tecnologias de encapsulação e complexação já foram testadas visando melhorar as propriedades farmacológicas do TML dentre elas pode-se citar a sua inclusão em ciclodextrinas melhorando sua biodisponibilidade e propriedades organolépticas para uso oral, sendo que parte do TML não absorvido no trato gástrico apresentou efeito tóxico intestinal como antimicrobiano (Nieddu *et al.*, 2014).

O estudo de incorporação do TML em emulsões O/A e A/O demonstrou que sua atividade antioxidante foi maior em formulações O/A enquanto que a atividade antimicrobiana foi maior nas formulações A/O (Deng *et al.*, 2015). Sua encapsulação em micropartículas poliméricas de celulose obtidas por *spray drying* aumentou a meia vida e a biodisponibilidade oral do TML demonstrando o potencial destas formulações para uso na terapia antimicrobiana (Rassu *et al.*, 2014).

1.3. Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

As NLS surgiram no início da década de 90, como estruturas semelhantes às nanoemulsões, porém constituídas por uma matriz lipídica sólida à temperatura corporal (Souto e Lopes, 2011).

O interesse das NLS como transportadores de fármacos deve-se as vantagens que estes sistemas podem proporcionar como, por exemplo, aumentar a estabilidade físico-química dos fármacos, aumentar a biodisponibilidade e permeabilidade de ativos lipofílicos, direcionar o fármaco ao alvo terapêutico, permitir uma liberação prolongada, e diminuir sua toxicidade e efeitos adversos. Essas propriedades, já eram observadas nos sistemas coloidais tradicionais como lipossomas e nanoemulsões, entretanto as NLS minimizam as desvantagens observadas para esses sistemas. As dimensões nanométricas das

NLS (50-1000nm) permite sua aplicação por diversas vias de administrações (Souto e Lopes, 2011; Beloqui *et al.*, 2016; Geszke-Moritz e Moritz, 2016).

Os fármacos podem ser incorporados na matriz lipídica de três maneiras distintas. O modelo tipo I é definido como matriz homogênea onde fármaco encontra-se distribuído por toda a matriz. No modelo de tipo II o fármaco encontra-se concentrado na parede externa da NLS envolvendo um núcleo lipídico. E na NLS tipo III ocorre o oposto do observado no tipo II e o fármaco encontra-se concentrado mais interiormente na matriz lipídica. Esses três tipos de NLS representam modelos, porém podem coexistir em uma mesma partícula, ou mesmo o fármaco pode estar ligado à camada externa da nanopartícula dependendo do tensoativo utilizado. O tipo de partícula obtido de uma forma geral dependerá das características físico-químicas dos constituintes da matriz, do coeficiente de partição do fármaco na matriz e da técnica utilizada no preparo da NLS (Souto e Lopes, 2011; Geszke-Moritz e Moritz, 2016).



Figura 4. Esquemática dos tipos de estruturas de NLS. Adaptado de Müller *et al.* **Adv Drug Deliv Rev**, 2002.

Potenciais desvantagens das NLS são a baixa capacidade de encapsulação, ocorrências de transições polimórficas dos lipídeos levando a problemas de estabilidade durante seu armazenamento e à possibilidade de expulsão do fármaco da matriz. A baixa capacidade de encapsulamento das NLS, em partes foi aperfeiçoada pela incorporação de um lipídio líquido na matriz sólida permitindo a incorporação de uma quantidade maior de fármaco, mantendo a estabilidade física da partícula, minimizando a expulsão do fármaco da partícula com o tempo e diminuindo o volume de água da formulação. Essa geração de NLS surgiu no final da década de 90, e foi denominada de CLN (Souto e Lopes, 2011; Montenegro *et al.*, 2016).

Assim como descrito para as NLS, os CLN são exemplificados em três modelos. O tipo I é definido como CLN imperfeito, uma vez que na sua matriz existem imperfeições que permitem acomodar elevadas concentrações de fármacos. Isso ocorre devido ao uso de lipídeos sólidos de cadeias de ácidos graxos de diferentes comprimentos ocasionando imperfeições no cristal e gerando espaços onde as moléculas do fármaco podem se acomodar. O modelo tipo II é definido como amorfo e é obtido pela mistura de lipídeos sólidos e líquidos, minimizando a eventual expulsão do fármaco. E o modelo tipo III é designado como múltiplo, podendo ser comparado às emulsões múltiplas. Nele a mistura do lipídeo líquido no lipídeo sólido ultrapassa sua solubilidade levando a formação de pequenos compartimentos de óleo no interior da matriz lipídica sólida, aumentando sua capacidade de encapsulação uma vez que a maioria dos fármacos lipofílicos apresenta maior solubilidade nos óleos em relação aos lipídeos sólidos (Souto e Lopes, 2011; Beloqui *et al.*, 2016; Montenegro *et al.*, 2016).



Figura 5. Modelos esquemáticos CLN: Tipo I – CLN imperfeito; Tipo II – CLN amorfo e Tipo III CLN múltiplo. Adaptado de Souto e Lopes, 2011.

Diversos trabalhos demonstram as vantagens das NLS e CLN. A estratégia de *co-delivery* pelo uso das NLS foi relatada como benéfica na terapia do câncer e na atividade antimicrobiana. A combinação de dois agentes em um mesmo nanocarreador lipídico pode diminuir a toxicidade e os efeitos adversos advindos da terapia, bem como aumentar a atividade farmacológica pelo efeito sinérgico ou aditivo das moléculas encapsuladas, conforme descrito para a associação do antibiótico vancomicina com ácido linoleico (Gescke-Moritz e Moritz, 2016).

O potencial dos CLN para aplicação tópica tem sido demonstrado em vários estudos, tanto para ação local como para produtos transdérmicos (Beloqui *et al.*, 2016).

A encapsulação do extrato de cenoura em CLN utilizando os diferentes óleos na constituição da matriz lipídica (cártamo, cardo ou espinheiro do mar) demonstrou que cada carreador apresentou ações antioxidantes e anti-inflamatórias complementares e com ação em mediadores distintos, demonstrando a influência direta da composição da matriz lipídica na atividade da molécula encapsulada. (Istrati *et al.*, 2016).

Outro estudo relatou a incorporação do anti-inflamatório naproxeno em NLS, levando ao aumento da permeação dérmica deste fármaco. A otimização das concentrações dos tensoativos Tween e Span utilizados diminuiu a absorção sistêmica do fármaco, direcionando o fármaco para o local de ação (Akbari *et al.*, 2016).

A comparação da incorporação do antioxidante luteína em NLS de cera de carnaúba, CLN composta de cera de carnaúba com triglicerídeos de cadeia média, e uma nanoemulsão demonstrou que os três sistemas apresentaram diferentes perfis de permeação, sendo que as NLS e CLN apresentaram perfil de permeação mais prolongado além de aumentar a foto-estabilidade do fármaco quando comparado à nanoemulsão (Mitri *et al.*, 2011).

Os estudos utilizados como exemplo demonstram o potencial uso dos carreadores lipídicos nanoestruturados e das nanopartículas lipídicas sólidas em formulações para aplicação tópica evidenciando a estratégia de *co-delivery* para obtenção de um efeito sinérgico ou aditivo da atividade pretendida.

A escolha da composição para o CLN desenvolvido nesse trabalho teve como base o trabalho anteriormente desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Nano biotecnologia – FCFRP (NanoBiolab) sob coordenação da Prof^a Dr^a. Priscyla Daniely Marcato Gaspari, no qual foi realizado o encapsulamento do timol em CLN composto de manteiga de illipê, óleo de calêndula e Poloxamer 188. Esse CLN serviu como base inicial dos estudos, e posteriormente foi modificado quantitativamente quanto às concentrações dos componentes e qualitativamente pela troca do estabilizante Poloxamer 188 pela Vitamina E - TPGS. Não foram encontrados dados anteriores ao

desenvolvimento do projeto sobre o uso associado da manteiga de illipê, óleo de calêndula e TPGS para formação de nanopartículas, o que torna o CLN desenvolvido para co-encapsulamento de CUR e TML inédito.

1.3.1. Manteiga e Illipê

A manteiga de illipê ou “engkabang fat” é extraída de sementes de plantas de espécies pertencentes ao gênero *Shorea*. Essas plantas são encontradas e produzidas em grande quantidade na floresta de Borneo (Sarawak e Kalimantan) (Abd Gani *et al.*, 2011). Mais de 50% da sua composição é formada por triglicerídeos de alto valor agregado com grande aplicação nas áreas alimentícia, farmacêutica e cosmética (Fariza *et al.*, 2013). Segundo o estudo de caracterização realizado por Rahman *et al.* (2011), seus principais constituintes foram identificados como sendo triglicerídeos como o ácido esteárico (43,3%), ácido oleico (37,4%) e ácido palmítico (18%) (Abd Gani *et al.*, 2010).

Suas características físico-químicas são semelhantes à da manteiga de cacau, e por isso é considerado um ótimo substituinte na fabricação de chocolates (Rahman *et al.*, 2011). A manteiga de illipê é sólida à temperatura ambiente devido à alta concentração de ácido esteárico, com faixa de fusão entre 34 – 38°C, com uma coloração levemente amarelado e com um odor suave de noz (Abd Gani *et al.*, 2010).

Devido à sua composição nutritiva, a manteiga de illipê apresenta diversas propriedades como antioxidante, emoliente, calmante, hidratante e restauradora da elasticidade da pele. Essas propriedades somadas às propriedades físico-químicas fazem com que a manteiga de illipê seja considerada uma manteiga exótica, tendo importante papel na indústria cosmeceutica (Abd Gani *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2011).

Gani *et al.* (2010), comparou os efeitos potencializadores na hidratação da pele obtido pelo uso da manteiga de illipê ou de derivados esterificados com a cera de abelhas em emulsões para incorporação dos ativos vitamina E e óleo essencial de lavanda. As formulações foram preparadas utilizando homogeneização por *high shear* seguida por homogeneização de alta pressão.

O estudo demonstrou que as partículas apresentaram alta estabilidade. Nos estudos de avaliação da eficácia da hidratação as formulações com manteiga de illipê aumentaram mais a hidratação da pele quando comparadas as formulações que continham somente a cera de abelhas (Abd Gani *et al.*, 2010).

1.3.2. Óleo de Calêndula

O óleo de calêndula é obtido através da extração das folhas secas de *Calendula officinalis* L. (*Asteraceae*), planta nativa da região do mediterrâneo, popularmente conhecida como marigold ou maravilha (Parente *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2010). O uso da *C. officinallis* na medicina popular é conhecido desde a antiguidade no tratamento de queimaduras, equimoses, erupções cutâneas, lesões na pele, dentre outras doenças inflamatórias tanto tópicas como internas (Parente *et al.*, 2009).

As propriedades terapêuticas da *C. officinallis* são atribuídas à grande riqueza de compostos que a compões que incluem substâncias esteroides, terpenóides, triterpenos alcoólicos livres e esterificados, ácidos fenólicos, flavonoides (quercetina, rutina, narcissina, isorhamnetina, kaempferol), quinonas, coumarinas e carotenoides (carotenos, licopeno, flavoxantina, luteína e rubixantina) (Parente *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2010).

A grande concentração de compostos antioxidantes encontrados no óleo de *C. officinallis*, sugere que ele possa desenvolver uma importante atividade prevenindo danos na pele provenientes da indução de ROS por exposição à radiação UV. Em um estudo realizado em ratos com administração oral do extrato de *C. officinallis* foi observado que após a administração houve uma diminuição na indução da depleção de GSH na pele após a exposição a raios UVB. Também foi observada uma alteração na secreção e atividade de proteinases, aumentando a atividade da gelatinase e promovendo um efeito benéfico pelo aumento da síntese de pró-colágeno (Fonseca *et al.*, 2010).

O estudo de nanopartículas envolvendo *C. officinallis* foi relatado para incorporação do seu extrato em uma nanopartícula sólida para uso no tratamento da secura ocular e demonstrou aumento na re-epitelização do epitélio conjuntival em estudo realizado em células (Arana *et al.*, 2015). Outro estudo encontrado foi

o uso do extrato da folha de *C. officinallis* na produção de nanopartícula de prata. As partículas obtidas demonstraram efeito antioxidante (Baghizadeh *et al.*, 2015).

Portanto, sua rica atividade antioxidante e protetora dérmica associada às suas propriedades lipídicas torna o óleo de calêndula uma opção interessante para uso na construção de carreadores lipídicos nanoestruturados focados na aplicação dermocosmética para prevenção do envelhecimento.

1.3.3. Kolliphor TPGS

O Kolliphor TPGS (d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate) é um éster hidrossolúvel derivado da vitamina E natural, produzido e comercializado pela BASF® (Saadati e Dadashzadeh, 2014).

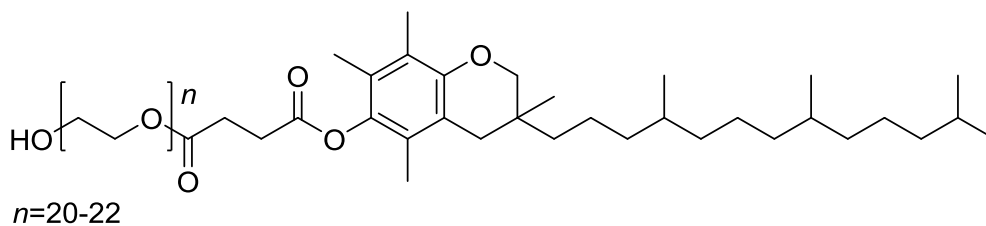


Figura 6. Fórmula estrutural do TPGS.

Devido sua propriedade anfifílica, o TPGS atua como um tensoativo (HLB ~13) não iônico onde a porção succinato de tocoferol é a parte lipofílica e a parte do polietileno glicol hidrofílica (Saadati e Dadashzadeh, 2014). Possui um peso molecular de aproximadamente 15313 g/mol e à temperatura ambiente se apresenta como uma cera sólida com ponto de fusão entre 37-41°C. O conteúdo de vitamina E na molécula é de 260-300 mg/g como d- α -tocoferol. É estável na faixa de pH entre 4,5 – 7,5 com uma concentração micelar crítica de 0,02% m/v. Pode ser dissolvido na água e deve ser utilizado preferencialmente na concentração 0,5-20% (Reintjes, 2011).

Nas formulações farmacêuticas pode aumentar a biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade tanto pelo aumento na solubilidade como pela modulação do efluxo de fármacos dependente de glicoproteína-P (Johnson *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2014), além de poder ser utilizado na formulação de emulsões O/A como tensoativo. Também atua reduzindo a sensibilidade da pele a certos

fármacos, como carreador em aplicações tópicas e como ligante em tecnologias de “hot-melt granulation” e “hot-melt extrusion” (Guo *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; Lamm *et al.*, 2016).

Farmacologicamente tem sido utilizado como suplementação oral de vitamina E em pacientes com deficiência na absorção de vitamina E (Papas *et al.*, 2007), uma vez que mesmo com a ausência do grupo hidroxila livre ainda assim pode ser utilizado como antioxidante (Baumgart *et al.*, 2015).

Acredita-se que seu uso na construção das nanopartículas lipídicas poderá favorecer sua permeabilidade na epiderme, diminuir eventuais efeitos citotóxicos, além de atuar sinergicamente como antioxidante (Baumgart *et al.*, 2015), uma vez que sofre hidrólise por esterases citoplasmáticas liberando a Vitamina E que tem comprovada ação anti-aging (Yan *et al.*, 2007).

1.4. Desafios no desenvolvimento de formulação tópica

A aplicação cutânea de NPL e CLN pode ser realizada a partir da incorporação destes sistemas em formulações de uso tópico (Souto e Lopes, 2011). São consideradas formulações tópicas os cosméticos, cosmeceúticos ou medicamentos que são aplicados diretamente sobre a pele (Nair *et al.*, 2013). Diversas formas farmacêuticas podem ser utilizadas para veiculação tópica de ativos, sendo as formulações semissólidas as mais utilizadas. Dentre as quais podemos citar as pomadas, géis, cremes e loções (Chang *et al.*, 2013). Produtos para uso tópico possuem maior aceitabilidade de mercado, pois são de fácil aplicação e convenientes para o transporte. As desvantagens são a baixa absorção e considerações cosméticas da formulação (Joshi *et al.*, 2014).

Primariamente o sítio alvo de formulações tópicas é formado pelas diferentes camadas da pele. Em geral almeja-se a modulação da permeação do ativo na pele para que o mesmo atinja uma camada específica da pele ou mesmo atinja a circulação sanguínea para ação sistêmica (Jain *et al.*, 2017). Entretanto, direcionar a entrega de substâncias veiculadas em formulações tópicas para um sítio específico é provavelmente um dos maiores desafios no desenvolvimento de um produto (Nair *et al.*, 2013). Nesta linha, os sistemas vesiculares e nanoparticulados têm sido utilizados demonstrando potencial em aumentar a

permeabilidade de moléculas tanto lipofílicas como hidrofílicas. Dentre os sistemas podem ser citados as microemulsões, lipossomas e as nanopartículas lipídicas ou poliméricas (Aulton, 2007; Riviere e Brooks, 2011; Nair *et al.*, 2013)

Devido à complexidade da matriz dérmica e as características desejadas para as formulações tópicas, existem alguns pontos importantes a serem considerados durante o desenvolvimento (Nair *et al.*, 2013). Uma formulação tópica deve permitir a combinação e o armazenamento de múltiplos compostos em um ambiente estável, deve ser esteticamente agradável, apresentar estabilidade física e química, permitir a permeação desejada na pele e apresentar pH compatível com o pH da pele (aproximadamente 5,5) (Nair *et al.*, 2013). Para atendimento desses pontos diversos excipientes podem ser necessários, o que torna as formulações de uso tópico complexas na sua maioria (Chang *et al.*, 2013).

Uma vez aplicada na pele, a formulação tópica deve interagir com a mesma de forma a influenciar na taxa de liberação dos compostos para atingir a absorção adequada. Os excipientes podem exercer papel adicional modificando fisicamente as características da pele, promovendo oclusão, hidratação ou ressecamento (Nair *et al.*, 2013).

A absorção de moléculas através da pele é influenciada por diversos fatores, dentre eles o tamanho, a lipofilicidade e a concentração do composto ativo, pH da formulação, presença de promotores de permeação, estado de hidratação da pele, variação das enzimas presentes na pele, temperatura, composição da formulação, dentre outros. Assim, tanto as propriedades do fármaco como da formulação são de equivalente importância para a disposição do ativo nas camadas da pele, que poderá ainda sofrer influência das características intrínsecas da pele do paciente (Chang *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2017).

No que diz respeito às características físico-químicas do ativo, o peso molecular afeta o coeficiente de difusão, estabelecendo uma relação inversamente proporcional com a absorção percutânea. Moléculas com tamanho superior a 500 Da possuem maior dificuldade de permeação (Bos e Meinardi, 2000). Outro fator crucial é o coeficiente de partição óleo água ($\log P$), sendo que maior permeabilidade é esperada para moléculas com $\log P \geq 1$ (Shashi *et al.*,

2012). Já a concentração da molécula solúvel leva ao aumento proporcional no fluxo e excessos de moléculas insolúveis atuam como reservatórios mantendo a concentração constante por um período maior de tempo (Shashi *et al.*, 2012).

Relacionado à formulação, o pH do veículo possui alta influência na permeabilidade de moléculas através da pele. Sendo mais indicado o uso de valores moderados de pH, e preferencialmente próximo ao ponto isoelétrico da pele (pI~ 4) (Marro *et al.*, 2001; Shashi *et al.*, 2012). Ainda em relação ao pH é importante avaliar o valor no qual o maior número de moléculas esteja na forma não ionizada, uma vez que essas difundem-se através da matriz intracelular do estrato córneo. Por outro lado, em pH fisiológico a pele possui cargas negativas sendo, portanto seletiva para permeação de cátions (Merino *et al.*, 1999; Marro *et al.*, 2001). Moléculas ionizadas, embora em menor velocidade, podem permear pela via intercelular, ou ainda tornarem-se neutras pela formação de pares com íons presentes na pele, o que a torna capaz de difundir pela barreira da pele (Smith, 2007; Nair *et al.*, 2013).

O efeito oclusivo que a formulação causa na pele previne a perda de água transepidermica, aumentando a hidratação do estrato córneo e favorecendo o transporte de fármacos. A oclusão também aumenta a temperatura do local em 2-3°C aumentando a mobilidade molecular e permeabilidade (Garnett *et al.*, 1994; Nair *et al.*, 2013). No geral a capacidade oclusiva das formulações decresce na seguinte ordem: adesivos transdérmicos > pomadas lipofílicas > emulsões A/O > emulsões O/A (Jetzer *et al.*, 1988; Nair *et al.*, 2013). A composição da formulação, incluindo o tipo de polímero utilizado influencia diretamente na liberação e permeação no estrato córneo (Aulton, 2007; Nair *et al.*, 2013). Além desses fatores, a pele possui a capacidade de metabolizar agentes químicos e fármacos, aplicados topicamente. Portanto, para a eficácia terapêutica desses compostos o metabolismo deve ser levado em consideração (Aulton, 2007).

Segundo orientações do FDA, descritas no Draft Guidance for Industry (1998), durante o desenvolvimento de um produto de uso tópico os testes clínicos devem fornecer dados não somente da estabilidade do produto, mas também da sua segurança, eficácia e biodisponibilidade. Para tanto, estudos relacionados à farmacocinética devem ser realizados (Fda, 1998). A cinética de um fármaco na

pele é comparável aos estudos de cinética no plasma ou urina (Nair *et al.*, 2013). Entretanto, deve-se ter em mente que os parâmetros farmacocinéticos envolvidos na pele não são dependentes apenas da absorção, mas também depende da liberação do fármaco da formulação, do tempo de permanência da formulação no local de aplicação e conforme já comentado das características intrínsecas da pele de cada indivíduo (Flaten *et al.*, 2015). No geral, estudos de dermofarmacocinética envolvem a quantificação do princípio ativo nas diversas camadas da pele, bem como estudos de eliminação baseado na curva de concentração do princípio ativo no estrato córneo pelo tempo. Para isso, testes *in vitro* de liberação do princípio ativo da formulação utilizando sistemas reservatórios como células do tipo Franz, e testes de permeação e retenção cutânea *ex vivo* ou *in vivo* devem ser realizados com a finalidade de caracterizar a formulação e correlacionar com possíveis efeitos *in vivo* (Chang *et al.*, 2013; Flaten *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2017).

Por fim, além de estável e eficaz, a formulação para uso tópico deve apresentar características físicas que as tornem agradáveis ao uso, sendo, portanto atrativas para o consumidor. Dessa forma, independente da indicação final do produto a escolha dos componentes da formulação é de extrema importância e se torna ainda mais complexa. Na área cosmética e cosmeceutica, existe ainda uma alta demanda por produtos inovadores, e de origem natural fazendo com que o uso de materiais novos, que levem ao incremento tecnológico do produto seja altamente requerido (Rajput, 2016).

1.4.1. Emulgel

O gel é uma forma farmacêutica semissólida muito utilizada na indústria farmacêutica principalmente para aplicações dermocosméticas e farmacológicas de uso tópico (Kumar *et al.*, 2016). Os géis basicamente são formados pelo intumescimento de polímeros sintéticos ou naturais na presença de grande quantidade de água ou de alguns solventes orgânicos específicos formando um sistema coloidal de rede polimérica (Aulton, 2007). Em sua maioria são aquosos e possuem características tixotrópicas, o que facilita sua aplicação e são facilmente removíveis (Aulton, 2007). Entretanto, dependendo do tipo de polímero utilizado pode levar a problemas de instabilidade da formulação, sendo

que os géis hidrofílicos não permitem a incorporação de fármacos insolúveis (Jeengar *et al.*, 2016; Khalil *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016). As emulsões são sistemas instáveis formados pela dispersão de duas fases imiscíveis, onde a fase dispersa encontra-se dividida em gotículas estabilizadas por um agente tensoativo. Em emulsões do tipo O/A o óleo constitui a fase dispersa enquanto que nos sistemas A/O a fase dispersa é oleosa. As emulsões permitem a incorporação de fármacos lipofílicos e possuem grande aceitação no mercado cosmético e cosmeceútico (Aulton, 2007). Porém, devido à alta concentração de emolientes e bases oleosa presentes nos cremes de aplicação tópica, levam liberação retardada de fármacos e são mais pegajosas e desagradáveis ao toque (Aulton, 2007).

Dessa forma os emulgéis são emulsões onde as finas partículas da sua fase interna são incorporadas à matriz polimérica do gel. Combinando em uma única formulação as vantagens de uma emulsão e de um gel. Funciona como um duplo sistema de liberação são menos pegajosas, de fácil aplicação e remoção e possuem boa aceitabilidade (Kumar *et al.*, 2016).

1.4.2. Viscosidade e Comportamento reológico

O termo reologia do grego *rheo* = fluxo e *logos* = ciência, foi introduzido por Bingham e Crawford no século XIX e adotado formalmente em 1929. A reologia tem a finalidade de caracterizar a deformação dos sistemas líquidos, sólidos e semissólidos. A reologia pode então, ser definida como o estudo das propriedades de fluxo e deformação da matéria (Aulton, 2007).

Na área farmacêutica e cosmética a avaliação do comportamento reológico possui diversas aplicabilidades sejam no desenvolvimento de um novo produto, avaliações de processos produtivos, desempenho de uso e estocagem, além de ser um importante parâmetro de avaliação da estabilidade (Aulton, 2007).

Diferentes propriedades relacionadas à deformação da matéria são englobadas pela reologia, dentre as quais se encontram dados importantes para aplicação na área farmacêutica e cosmética como a extrusibilidade; compressibilidade; ductibilidade; espalhabilidade; elasticidade, fluidez e viscosidade (Netz e Ortega, 2002). Possuindo fundamental importância na

avaliação de produtos cosméticos, dermocosméticos e farmacêuticos de aplicação tópica (Tadros, 1994; Netz e Ortega, 2002).

A viscosidade mede a resistência de um fluido ao fluxo e quanto maior a resistência maior a viscosidade. Para que um corpo se deforme, deve-se realizar sobre ele uma força tangencial denominada na reologia de tensão de deformação, ou também denominado tensão de cisalhamento, que gerará um gradiente de velocidade denominado gradiente de cisalhamento. Esta é dependente da resistência interna da substância, ou seja, de sua viscosidade (Massey, 2002; Lahoud e Campos, 2010).

De acordo com suas propriedades de fluidez e deformação os fluidos podem ser classificados em dois tipos, os fluidos Newtonianos e não newtonianos. Os fluidos newtonianos possuem a velocidade de cisalhamento diretamente proporcional à tensão de cisalhamento aplicada e cumprem a relação de proporcionalidade proposta por Isaac Newton descrita pela **equação 1**. Neste tipo de fluido, sua viscosidade não se alterada por variações na velocidade de cisalhamento ou tensão de cisalhamento (**Figura 7**) (Netz e Ortega, 2002; Aulton, 2007; Lahoud e Campos, 2010).

$$\eta = t / D \quad (\text{Eq.1})$$

Onde o η corresponde à viscosidade, t corresponde à tensão de cisalhamento e D corresponde à velocidade de cisalhamento.

Os fluidos não newtonianos não obedecem à equação proposta por Newton, sendo dependente de outros fatores como estrutura da substância; forma de preparo; tempo de repouso, etc. Logo, a viscosidade será influenciada por variações da velocidade e tensão de cisalhamento. Para esses fluidos não é possível determinar um valor real de viscosidade, sendo por isso determinada como um valor aparente (denominado viscosidade aparente) que está relacionado à tensão de cisalhamento aplicada no momento da medição. Esses fluidos podem ser classificados como reofluidificantes se a viscosidade diminuir ou reoessantes se a viscosidade aumentar com o aumento da velocidade de deformação. Esse tipo de comportamento reológico pode ser descrito pela

equação (2) de Ostwald-de-Waele, também conhecido por Lei da Potência (Aulton, 2007; Lahoud e Campos, 2010).

$$t = t_0 + K \cdot D^n \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde K é o índice de consistência (em Pa.sn) e n é o índice de escoamento (adimensional). Para fluidos reofluidificantes $n < 1$ e para reoespessantes $n > 1$. Nos casos fluidos newtonianos $n = 1$ e $K = \eta$.

Determina-se como comportamento reológico a maneira como o fluido se comporta em relação a essas variações, que pode ser classificado em três tipos principais: Pseudoplástico; plástico; e dilatantes. A maioria dos fluidos farmacêuticos são não newtonianos, pois não são formas simples, como a água e xaropes, mas sim sistemas coloidais ou dispersos, incluindo emulsões, suspensões, géis e xampus (Aulton, 2007).

Sistemas com comportamento pseudoplástico formam um reograma onde a curva tem como origem o zero, assim como os fluidos newtonianos, porém a relação entre a tensão e a velocidade de cisalhamento não é linear em qualquer parte da curva (**Figura 7**). A viscosidade diminui com o aumento do cisalhamento aplicado e tende à linearidade quando submetidas a tensão de cisalhamento elevadas indicando que um valor de viscosidade mínimo foi atingido (Massey, 2002; Netz e Ortega, 2002; Lahoud e Campos, 2010).

Em um comportamento plástico as curvas de fluxo não se intersectam na origem dos eixos, o qual requer uma tensão de corte mínima denominada tensão crítico ou tensão de cedência para o início do fluxo. Em valores acima desta força prévia os sistemas plásticos passam a ter comportamento linear ou quase linear, enquanto que abaixo deste ponto, apresenta um comportamento elástico, reversível (**Figura 7**). O comportamento plástico é encontrado em suspensões concentradas, especialmente se a fase continua for de alta viscosidade, ou se as partículas estiverem floculadas (Netz e Ortega, 2002; Aulton, 2007). Alguns géis unguentos e cremes concentrados também são exemplos de substâncias que apresentam comportamento plástico (Lahoud e Campos, 2010).

O comportamento reológico do tipo dilatante é do tipo reoespessante onde ocorre o aumento da viscosidade em função do aumento da tensão de

cisalhamento (**Figura 7**). Esse comportamento é típico de pastas e suspensões contendo grandes quantidades de sólidos insolúveis suspensos (Netz e Ortega, 2002; Aulton, 2007).

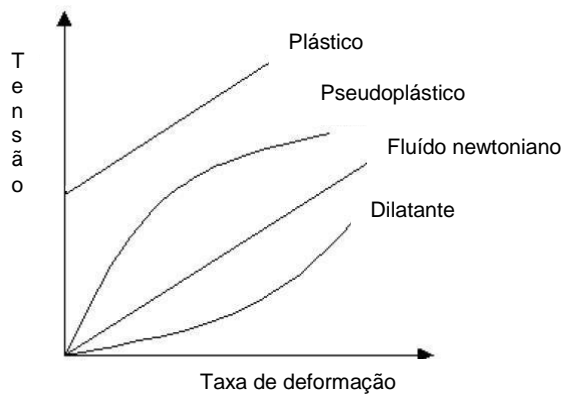


Figura 7 - Curvas exemplo para comportamentos de fluxo para fluidos newtoniano e não newtonianos (plástico, pseudoplástico e dilatante).

Os fluidos não newtonianos podem ainda ser classificados segundo a alteração da viscosidade em função do tempo, podendo ser classificados como tixotrópicos ou antitixotrópicos ou reopéticos (Lahoud e Campos, 2010). A tixotropia descreve fluidos cuja viscosidade diminui em função do tempo durante a deformação, e volta à viscosidade inicial quando a tensão aplicada é cessada. Esse fenômeno é observado quando em um reograma a curva de volta, a descendente, encontra-se deslocada em um plano inferior à curva ascendente e está associado a perda da viscosidade. Que está associado a uma recuperação lenta da consistência e organização do material, perdas durante o cisalhamento (**Figura 8**). O fenômeno contrário, ou seja, quando a curva descendente encontra-se deslocada em um plano superior à curva ascendente, é conhecido como reopético (**Figura 8**) (Massey, 2002; Netz e Ortega, 2002; Aulton, 2007).

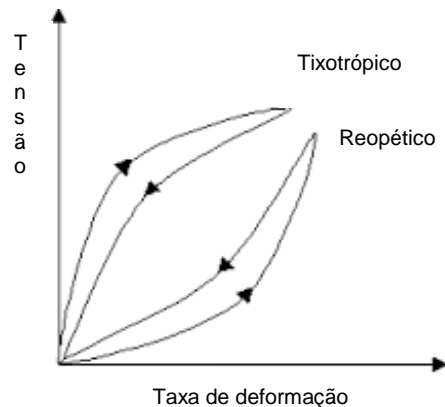


Figura 8 - Curvas de fluxo características de fluidos tixotrópicos e reopéticos.

1.4.3. Avaliação do perfil de liberação para formulações tópicas

O teste de liberação visa garantir que quantidade suficiente dos ativos sejam liberados da formulação e alcance o local de atividade para que ocorra o efeito biológico desejado. Dessa forma, estudos *in vitro* de liberação são utilizados para caracterizar a formulação quanto sua performance, não somente durante o desenvolvimento do produto, mas também nas etapas de *scale up*, controle de qualidade e alterações pós registro (FDA, 1998; Shah *et al.*, 1999; Goebel *et al.*, 2013).

O uso de células de difusão do tipo Franz é um dos testes amplamente utilizados (Shah *et al.*, 1999). É composto por compartimento doador onde se coloca a formulação de estudo, e um compartimento receptor que deve ser preenchido por solução tampão ou outro sistema que seja capaz de manter a condição *sink* de solubilidade do ativo. Permitindo que esse difunda entre os compartimentos através de uma membrana sintética (acetato de celulose, polietersulfona, politetrafluoroetileno, etc) utilizada para separar os compartimentos (OECD, 2004). O teste geralmente é realizado a 32°C para refletir a temperatura normal da pele (Shah *et al.*, 1999; Siewert *et al.*, 2003). A quantidade de ativo liberado é quantificada em diferentes intervalos e tempo e a equação da reta obtida pela curva da liberação relação ao tempo representa a taxa de liberação cinética do ativo (Nair *et al.*, 2013). Diversos modelos matemáticos podem ser utilizados para avaliar a relação cinética para liberação de fármacos (Costa *et al.*, 2001).

O modelo de ordem zero relaciona a massa de ativo difundida de forma acumulada pela área de permeação da membrana em função do tempo. Em uma

cinética de ordem zero, a taxa de liberação é influenciada apenas pelo tempo e a concentração do ativo não interfere na liberação. O modelo matemático de ordem zero é representado pela **equação 3**. Sistemas reservatórios de fármacos geralmente apresentam cinética de liberação de ordem zero, como por exemplo, adesivos transdérmicos e comprimidos orais com sistemas de liberação matriciais ou por bombas osmóticas (Dash *et al.*, 2010; Marcos, 2015).

$$C_t = C_0 + K_0t \quad (\text{Eq 3})$$

Onde, C_t é a concentração de ativo liberado durante o tempo t ; C_0 é a concentração inicial de ativo liberada (geralmente é 0) e K é a constante de ordem zero.

Na cinética de liberação de primeira ordem a velocidade de liberação é dependente da concentração. O veículo utilizado na formulação funciona controlando a velocidade de cedência, sendo a liberação do componente ativo da formulação a etapa limitante para sua absorção. Esse modelo é aplicado em estudos de dissolução, absorção e eliminação de fármacos. Esse modelo é representado pelo logaritmo da concentração liberada acumulada em função do tempo e expresso pela **equação 4** (Dash *et al.*, 2010; Marcos, 2015).

$$\log C_t = \log C_0 + K_1t \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde, C_t é a concentração de ativo liberado durante o tempo t ; C_0 é a concentração inicial de ativo liberada (geralmente é 0) e K_1 é a constante de liberação de primeira ordem.

A ordem de cinética de liberação de Higuchi, ou pseudo primeira ordem, relaciona a concentração em massa de ativo liberada em função da raiz quadrada do tempo em uma função linear (Dash *et al.*, 2010). É provavelmente o mais famoso e mais utilizado modelo matemático utilizado para equacionar a taxa de liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais (Marcos, 2015). Este modelo pode ser utilizado para fármacos solúveis e insolúveis contidos na maioria das matrizes sólidas ou semissólidas (Marcos, 2015). A relação matemática de Higuchi correlaciona partículas de ativos que estão dispersas em

uma matriz homogênea submetida a um meio de difusão e é descrita pela **equação 5**. A partir do modelo de Higuchi outros modelos matemáticos foram desenvolvidos como, por exemplo, o modelo de Korsmeyer-Peppas e modificações propostas por Massaro e Zhu (Peppas e Narasimhan, 2014; Marcos, 2015).

$$C_t = K_H \cdot \sqrt{t} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde, C_t é a concentração de ativo liberado durante o tempo t ; K_H a constante de liberação de primeira ordem.

1.4.4. Avaliação da permeabilidade de ativos incorporados em formulações tópicas

A permeação cutânea através do estrato córneo ocorre devido ao coeficiente de permeabilidade (K_p) da substância ativa, fator principal que rege a difusão da substância através da membrana quando se supõe um estado estacionário e é traduzido pela lei de Fick, expressa pela **equação 6**, (Souto e Lopes, 2011; Jain *et al.*, 2017).

$$J = \frac{D \cdot K}{H} (C_d - C_r) \quad (\text{Eq. 6})$$

O K_p é compreendido pela difusão efetiva da molécula no estrato córneo (D), o coeficiente de partição entre a formulação e a pele ($P_{p/f}$), e a extensão da difusão (h) através da barreira da pele. Sendo que o fluxo (J) é o K_p multiplicado pela concentração de fármaco (C) na formulação doadora. C_d é a concentração de fármaco na formulação doadora e C_r na solução receptora (Jain *et al.*, 2017). Diversos fatores influenciam na difusão de moléculas através da pele, dentre as quais as características físico-químicas do fármaco e do veículo, as condições da pele e a presença de promotores de permeação (Nair *et al.*, 2013).

Estudos de permeação e retenção cutânea são realizados para garantir que o componente ativo da formulação será liberado da formulação e permeado no tecido da pele para atingir seu local de ação terapêutica ou cosmética. Uma formulação com características de permeabilidade otimizadas é mais eficiente e

pode utilizar menores concentrações de ativo reduzindo custos de produção, resultando em um ganho para a indústria. Além disso, resulta em produtos com menor potencial de irritação e máximo efeito clínico sendo, portanto, uma vantagem também para o paciente/ consumidor (Jain *et al.*, 2017; Leal *et al.*, 2017).

Assim como para os testes de liberação o uso de células de difusão do tipo Franz é um dos testes amplamente utilizados para conduzir os testes de permeação dérmica (FDA, 1998; Shah *et al.*, 1998; Leal *et al.*, 2017). Para esse experimento as membranas sintéticas são substituídas por pele humana obtida de cirurgias eletivas, caracterizando o teste *ex vivo* (Leal *et al.*, 2017). A pele humana pode ser substituída por pele de animais como roedores, cobras, bovino ou suíno ou modelos artificiais. A pele obtida da orelha de suínos é de fácil obtenção e reconhecida por ser o modelo animal mais apropriado devido a maior similaridade anatômica, histológica e fisiológica com a pele humana (Flaten *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2017).

Segundo Draft Guidance for Industry (FDA, 1998), os estudos de permeação podem ser oclusivos ou não oclusivos de forma a evitar ou não a perda de água de hidratação. Existem dois modelos de dose, o modelo de dose finita é utilizado quando se pretende avaliar os efeitos de uma concentração específica de ativo e sua eliminação ou toxicidade ocupacional. O modelo de dose infinita tem como objetivo atingir o estado estacionário de fluxo do ativo através da pele, sendo utilizado quando se quer avaliar as características de permeação de uma substância ou a influência da formulação (Souto e Lopes, 2011).

Conclusões

2. CONCLUSÕES

O estudo químico da amostra de trabalho de curcumina foi realizado com sucesso por meio do isolamento e da identificação dos curcuminóides presentes na amostra. Pelo isolamento foi possível obter curcumina e demetoxicurcumina com pureza analítica necessária para serem utilizados como padrão na validação analítica. As concentrações de curcumina e seus derivados demetoxilados na amostra de trabalho foram determinadas com exatidão.

O método analítico desenvolvido por CLAE-DAD para quantificação de timol e curcuminóides foi desenvolvido e validado conforme guias vigentes, demonstrando ser robusto, preciso e exato dentro da faixa de trabalho estabelecida pelo método analítico.

Os carreadores lipídicos nanoestruturados desenvolvidos e otimizados pelo DoE de Box-Behnken apresentaram características físico-químicas que os tornam interessantes para uso tópico em um medicamento, dermocosmético ou cosmético.

Partículas com diâmetros muito pequenos como o CLN OTM 2, próximo de 30nm) possuem potencial aplicação em produtos capilares e podem ser alvos de trabalhos futuros.

O CLN OTM 3, foco do estudo nesse projeto, apresentou diâmetro médio próximo de 130 nm e o índice de polidispersão (Pdl) foi abaixo de 0,220, indicando formulações com baixa polidispersão. O pH das dispersões foi próximo ao pH da pele permanecendo entre 4,5-6 sendo, portanto, consideradas adequadas para uso tópico. As formulações permaneceram estáveis em relação ao diâmetro, Pdl e potencial zeta, pelo tempo estudado (180 dias). O potencial zeta das partículas apresentaram valores negativos perto de -20 mV. O valor negativo da carga superficial das partículas aliado a estabilização por impedimento estérico dos tensoativos conferiu as partículas alta estabilidade.

O co-encapsulamento de timol e curcuminóides foi possível para todos os CLNs estudados. Através da otimização realizada para o CLN OTM 3 obteve-se alta eficiência de encapsulação (EE%) após a inclusão de um solvente orgânico (etanol) na produção dos CLNs, que facilitou a solubilização dos ativos no meio

lipídico e não influenciou significativamente as características físico-químicas e de estabilidade.

O CLN OTM 3 apresentou formato esférico por análise de AFM e o baixo índice de recristalização observado a partir dos dados de DSC reforçam os resultados obtidos de alta EE e estabilidade da formulação.

O CLN OTM 3 sem ativos e co-encapsulados não foram citotóxicos para células HaCaT sendo que a viabilidade celular avaliada ficou acima de 80% na máxima concentração avaliada ($1,48 \times 10^{12}$ partículas/ml, que corresponde a 0,8 µg/ml de ECUR e TML co-encapsulados).

A avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* demonstrou alta atividade para ECUR/TML livre e co-encapsulados, tanto para o teste de quimioluminescência como para inibição da auto-oxidação do pirogallol. Estes resultados indicam a potente capacidade inibidora para SOD dos ativos livre e co-encapsulados.

A incorporação do CLN OTM 3 no emulgel cosmético foi possível. As características físicas da formulação mantiveram-se estáveis durante os 3 meses de estudo de estabilidade. O valor de pH manteve-se próximo a 5 que é compatível com o pH da pele, a condutividade eletrolítica próxima a 120 mV, aparência e perfil reológico inalteradas. O perfil reológico do emulgel é compatível e desejável para formulações cosméticas e indica a alta estabilidade física da formulação.

O perfil de liberação dos ativos livres e co-encapsulados após incorporação no emulgel sugeriu que o timol é liberado mais lentamente quando encapsulado e a CUR apresentou um *burst* de liberação inicial seguido de uma liberação sustentada com perfil cinético compatível com modelo matemático de Higuchi.

O teste de permeação de ECUR e TML da formulação forneceu dados iniciais interessantes a respeito da maior permeabilidade dérmica dos curcuminóides demetoxilados em relação a curcumina, bem como da possível metabolização da CUR pela matriz biológica. Os dados de permeação sugerem que os ativos possam permear na pele. A extensão e a intensidade da permeabilidade dos ativos promovida pelo CLN determinarão a aplicabilidade da

formulação que poderá ser interessante para o desenvolvimento de um produto cosmético, dermocosmético, ou mesmo para um medicamento transdérmico.

Em resumo, o co-encapsulamento de ECUR e TML em CLNs estáveis foi obtido. O carreador desenvolvido apresentou características físicas, químicas e biológicas que o torna interessante para aplicações cosméticas ou farmacêuticas. Os mesmos foram incorporados em elegante formulação de emulgel que apresentou alta estabilidade física e pH compatível com a aplicação tópica. Os estudos iniciais de liberação e permeação dérmica dos ativos encapsulados e incorporados no emulgel demonstraram controle na liberação dos ativos encapsulados com potencial aumento da permeabilidade e diminuição da toxicidade. E, portanto, os resultados apresentados confirmam o incremento tecnológico esperado com o uso da nanotecnologia e reforçam a potencial aplicabilidade do CLN desenvolvido em um produto de uso tópico.

Referências Bibliográficas

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD GANI, S. S. et al. Characterization and Effect on Skin Hydration of Engkabang-Based Emulsions. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, n. 6, p. 1188-1193, Jun 2010.
- ABD GANI, S. S. et al. Engkabang Fat Esters for Cosmeceutical Formulation. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 14, n. 2, p. 227-233, Apr 2011.
- AGRAWAL, R.; KAUR, I. P. Inhibitory Effect of Encapsulated Curcumin on Ultraviolet-Induced Photoaging in Mice. **Rejuvenation Research**, v. 13, n. 4, p. 397-410, Aug 2010.
- AKBARI, J. et al. The design of naproxen solid lipid nanoparticles to target skin layers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 626 - 633, 2016.
- ALVAREZ-ROMAN, R. et al. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 301-316, 2004.
- AMIRI, H. Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three Thymus Species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.
- ANANTACHAISILP, S. et al. Chemical and structural investigation of lipid nanoparticles: drug-lipid interaction and molecular distribution. **Nanotechnology**, v. 21, n. 12, Mar 2010.
- ANTIGNAC, E. et al. Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 324-341, Feb 2011.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos - Uma Abordagem sobre os Ensaios Físicos e Químicos**, Brasília, DF, 2007. 127p.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Séries Temáticas. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, Brasília, DF, v.1, 2004. 52p.
- ARANA, L. et al. Solid lipid nanoparticles for delivery of Calendula officinalis extract. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 135, p. 18-26, Nov 1 2015.
- AULTON, M. E. The design and manufacture of medicines. Ed. 3. Edinburgh, New York: Churchill Livingstone Elsevier, 2007.
- AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2a edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BAGHIZADEH, A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. **Journal of Molecular Liquids**, v. 207, p. 159-163, Jul 2015.

BAN, C. et al. Enhancing the Stability of Lipid Nanoparticle Systems by Sonication during the Cooling Step and Controlling the Liquid Oil Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 47, p. 11557-11567, 2014.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257-262, May-Jun 2012. ISSN 0738-081X.

BAUMGART, B. R. et al. D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate-containing vehicles provide no detectable chemoprotection from oxidative damage. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 7, p. 791-798, 2015.

BELOQUI, A. et al. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143 - 161, 2016.

BERENDSEN, D. et al. Crystal identification of synovial fluid aspiration by polarized light microscopy. An online test suggesting that our traditional rheumatologic competence needs renewed attention and training. **Clinical Rheumatology**, v. 36, n. 3, p. 641-647, 2017.

BERMEJO, D. V. et al. Extraction of thymol from different varieties of thyme plants using green solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 14, p. 2901-2907, 2015.

BONACUCINA, G.; CESPI, M.; PALMIERI, G. F. Characterization and Stability of Emulsion Gels Based on Acrylamide/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer. **Aaps Pharmscitech**, v. 10, n. 2, p. 368-375, 2009.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays (HTD/NR-90). **J. Tissue Cult. Meth.**, v. 9, p. 7-9, 1985.

BOS, J. D.; MEINARDI, M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. **Experimental Dermatology**, v. 9, n. 3, p. 165-169, 2000.

BRAGA, P. C. et al. Anti-inflammatory activity of thymol: Inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. **Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 130-136, 2006.

BRASIL-ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União. Brasília, 2003.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, Jul 2011. ISSN 1541-4337.

CHANDRASEKARAN, A.; IDELCHIK, M. D. S.; MELENDEZ, J. A. Redox control of senescence and age-related disease. **Redox Biology**, v. 11, p. 91-102, 2017.

CHANG, R. K. et al. Generic Development of Topical Dermatologic Products: Formulation Development, Process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products. **Aaps Journal**, v. 15, n. 1, p. 41-52, 2013.

CHEN, J. et al. Natural Terpenes as Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery. **Molecules**, v. 21, n. 12, Dec 2016.

CORNAGHI, L. et al. Effects of UV Rays and Thymol/Thymus vulgaris L. Extract in an ex vivo Human Skin Model: Morphological and Genotoxicological Assessment. **Cells Tissues Organs**, v. 201, n. 3, p. 180-192, 2015.

CORREA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm. [online]**, v. 41, n. 1, p. 73-78, 2005.

COSTA, P.; MANUEL, J.; LOBO, S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

COSTA, R.; SANTOS, L. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. **Powder Technology**, v. 322, p. 402-416, Dec 2017.

COSTANZO, A. et al. Programmed cell death in the skin. **International Journal of Developmental Biology**, v. 59, n. 1-3, p. 73-78, 2015.

CRAN, M. J. et al. Release of Naturally Derived Antimicrobial Agents from LDPE Films. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, p. E126-E133, 2010.

CUI, L. et al. Advancements in the maintenance of skin barrier/skin lipid composition and the involvement of metabolic enzymes. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 15, n. 4, p. 549-558, Dec 2016.

DA ROSA, C. G. et al. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 337-344, 2015.

DASH, S. et al. KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217-223, 2010.

DENG, L. et al. Phase behavior, microstructural transition, antimicrobial and antioxidant activities of a water-dilutable thymol microemulsion. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 136, p. 859-866, 2015.

DEPIERI, L. V. et al. Advances in the bioanalytical study of drug delivery across the skin. **Therapeutic Delivery**, v. 6, n. 5, p. 571-594, 2015.

DIZAJ, S. M. et al. Application of Box-Behnken design to prepare gentamicin-loaded calcium carbonate nanoparticles. **Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 1475-1481, 2016.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; SILVA, A. M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - A systematic review of in vitro data. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 1, p. 1-18, 2014.

DUONG, Q.; PURGIANTO, A.; MALEKY, F. Dynamics of moisture diffusivity in solid triacylglycerol matrices. **Food Research International**, v. 75, p. 131-139, 2015.

MIYAZAKI, C. and RIUL, A. **Sistemas de baixa dimensionalidade: nanopartículas**. in: DURAN, N.; MORAIS, P. C. D.; MATTOSO, L. H. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo.: 2006.

ECKHART, L. et al. Cell death by cornification. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3471-3480, Dec 2013.

FARIZA, N.; RAHMAN, A.; BASRI, M. **Interactive Effects of Impeller Speed and Substrate Molar Ratio on Synthesis of Engkabang Fat Esters**: International Journal of Chemical, Environmental & Biological sciences (IJCEBS). 1: 528-530 p. 2013.

FDA. **Guidance for Industry: Topical Dermatological Drug Product NDAs and ANDAs - In Vivo Bioavailability, Bioequivalence, In Vitro Release, and Associated Studies**. U.S. Department of Health and Human Services. Rockville: Food and drug administration: 1-19 p. 1998.

FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796-810, 2010.

FLATEN, G. E. et al. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, p. 10-24, 2015.

FONSECA, Y. M. et al. Protective effect of Calendula officinalis extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 3, p. 596-601, 2010.

FRIEDRICH, R. B. et al. Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 204-213, 2015.

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 3, p. 199-209, Mar 2002.

GAJRA, B.; PATEL, R. R.; DALWADI, C. Formulation, optimization and characterization of cationic polymeric nanoparticles of mast cell stabilizing agent using the Box-Behnken experimental design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 5, p. 747-757, 2016.

GAO, S.; SINGH, J. Mechanism of transdermal transport of 5-fluorouracil by terpenes: Carvone, 1,8-cineole and thymol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, n. 1, p. 67-77, 1997.

GAO, S.; SINGH, J. In vitro percutaneous absorption enhancement of a lipophilic drug tamoxifen by terpenes. **Journal of Controlled Release**, v. 51, n. 2-3, p. 193-199, 1998.

GARNETT, A.; HOTCHKISS, S. A. M.; CALDWELL, J. Percutaneous-absorption of benzyl acetate through rat skin in-vitro .3. A comparison with human skin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 11, p. 1061-1065, 1994.

GESZKE-MORITZ, M.; MORITZ, M. I. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. **Materials Science and Engineering C-Materials for Biological Applications**. 2016.

GIROTTI, S. et al. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, v. 51, n. 4, p. 685-692, 2000.

GOEBEL, K. et al. In vitro release of diclofenac diethylamine from gels: evaluation of generic semisolid drug products in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 211-219, 2013.

GUO, C. Y. et al. Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1-2, p. 292-298, 2012.

GUO, Y. et al. The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 175-186, 2013.

GUPTA, N. K.; DIXIT, V. K. Development and evaluation of vesicular system for curcumin delivery. **Archives of Dermatological Research**, v. 303, n. 2, p. 89-101, 2011.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 1-18, 2001.

HASANUDDIN H. A. B. , M. M. M. A., SALAMA M, TRIPATHY M. Micellization of D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS 1000): Thermodynamics and related Solute solvent interactions. **Orient J Chem**. 3: 30 p. 2014.

HECK, R. et al. Film-forming formulations containing porous silica for the sustained delivery of actives to the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 1-8, 2016.

HENG, M. C. Y. et al. Drug-induced suppression of phosphorylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by clinical, histological and immunohistochemical parameters. **British Journal of Dermatology**, v. 143, n. 5, p. 937-949, Nov 2000.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 473-485, 2015.

HOHN, A. et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. **Redox Biology**, v. 11, p. 482-501, Apr 2017.

IBRAHIM, W. M.; ALOMRANI, A. H.; YASSIN, A. E. B. Novel sulphur-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced intestinal permeability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 129-144, 2014.

ICH, Topic Q2 (R1). **Validation of analytical procedures: text and methodology**. 2014.

INSUMOS.COM.BR/COSMETICOS_E_PERFUMES – Guia Conservantes. http://insumos.com.br/cosmeticos_e_perfumes/artigos/conservantes_n%2044.pdf. Acesso em: 10/07/2017.

International Organization for Standardization. International Standard ISO13321 Methods for Determination of Particle Size Distribution Part 8: Photon Correlation Spectroscopy, International Organisation for Standardisation (ISO) 1996.

International Organization for Standardization. International standard ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices. 1992. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva (SH): 1992.

ISTRATI, D. et al. Phyto-mediated nanostructured carriers based on dual vegetable actives involved in the prevention of cellular damage. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 64, p. 249-259, 2016.

JAIN, S. et al. Recent Advances in Lipid-Based Vesicles and Particulate Carriers for Topical and Transdermal Application. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 2, p. 423-445, 2017.

JANG, S. et al. Inhibitory effects of curcuminoids from *Curcuma longa* on matrix metalloproteinase-1 expression in keratinocytes and fibroblasts. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 42, n. 1, p. 33-39, 2012.

JAVAN, A. J.; JAVAN, M. J. Electronic structure of some thymol derivatives correlated with the radical scavenging activity: Theoretical study. **Food Chemistry**, v. 165, p. 451-459, 2014.

JEENGAR, M. K. et al. Emu oil based nano-emulgel for topical delivery of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 506, n. 1-2, p. 222-236, 2016.

JETZER, W. E. et al. TEMPERATURE DEPENDENCY OF SKIN PERMEATION OF WATERBORNE ORGANIC-COMPOUNDS. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 63, n. 7, p. 197-201, 1988.

JIN, C. et al. Development and validation of UPLC method for quality control of *Curcuma longa* Linn.: Fast simultaneous quantitation of three curcuminoids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 1, p. 43-49, 2010.

JOHNSON, B. M.; CHARMAN, W. N.; PORTER, C. J. H. An in vitro examination of the impact of polyethylene glycol 400, Pluronic P85, and vitamin E d-a-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate on P-glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine. **Aaps Pharmsci**, v. 4, n. 4, 2002.

JOSHI, M.; BUTOLA, B. S.; SAHA, K. Advances in Topical Drug Delivery System: Micro to Nanofibrous Structures. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 853-867, 2014.

KANG, S. C.; JAKHAR, R.; PAUL, S. Thymol induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 247, 2014.

KHALIL, E. A. et al. Physicochemical characterization of emulgel formulated with SepineoP 600, SepineoSE 68 and cosolvent mixtures. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 21, n. 5, p. 519-527, 2016.

KIUCHI, F. et al. NEMATOCIDAL ACTIVITY OF TURMERIC - SYNERGISTIC ACTION OF CURCUMINOIDS. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 9, p. 1640-1643, 1993.

KUMAR, D. et al. EMULGEL-NOVEL TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEM-A COMPREHENSIVE REVIEW. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 12, p. 4733-4742, 2016.

LACHMAN, L.; KANIG, J. L.; LIEBERMAN, H. H. **Teoria e prática na indústria farmacêutica** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LAHOUD, M. H.; CAMPOS, R. **ASPECTOS TEÓRICOS RELACIONADOS À REOLOGIA FARMACÊUTICA**. Curitiba: Visão Acadêmica. 11 2010.

LAMM, M. S. et al. Assessing Mixing Quality of a Copovidone-TPGS Hot Melt Extrusion Process with Atomic Force Microscopy and Differential Scanning Calorimetry. **Aaps Pharmscitech**, v. 17, n. 1, p. 89-98, 2016.

LEAL, L. B. et al. Bioequivalence Methodologies for Topical Drug Products: In Vitro and Ex Vivo Studies with a Corticosteroid and an Anti-Fungal Drug. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 4, p. 730-737, 2017.

LEE, J.-Y. et al. Soluplus (R)/TPGS-based solid dispersions prepared by hot-melt extrusion equipped with twin-screw systems for enhancing oral bioavailability of valsartan. **Drug Design Development and Therapy**, v. 9, p. 2745-2756, 2015.

LI, X. C. Improved Pyrogallol Autoxidation Method: A Reliable and Cheap Superoxide-Scavenging Assay Suitable for All Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 25, p. 6418-6424, 2012.

LIMA, C. F.; PEREIRA-WILSON, C.; RATTAN, S. I. S. Curcumin induces heme oxygenase-1 in normal human skin fibroblasts through redox signaling: Relevance for anti-aging intervention. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 3, p. 430-442, 2011.

LIN, T. K.; ZHONG, L. L.; SANTIAGO, J. L. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, Jan 2018.

LORENCINI, M. et al. Active ingredients against human epidermal aging. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 100-115, May 2014.

MAIA DE OLIVEIRA, M. L. et al. Topical continuous use of Lippia sidoides Cham. essential oil induces cutaneous inflammatory response, but does not delay wound healing process. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 283-289, 2014.

MALVERN Instruments Ltd. Zeta Sizer Nano Series- User Manual. Reino Unido 2003, 2004.

MALVERN Instruments Ltd. NanoSight: Nanoparticle Tracking Analysis. Material relationships. Reino Unido. 2014.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**. < <https://www.revistas.ufg.br/REF/article/view/6545/4804> >. 6 (2) 2009.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402-414, 2016.

MARCOS, B. Mathematical Model of Drug Release. In: (Ed.). **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. 1: Woodhead Publishing, 2015. cap. 5, p.208.

MARRO, D.; GUY, R. H.; DELGADO-CHARRO, M. B. Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 213-217, 2001.

MARWAH, H. et al. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 2, p. 564-578, Feb 2016.

MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. **Journal of Dermatological Science**, v. 58, n. 2, p. 85-90, 2010.

MASSEY, B. S. **Mecânica dos fluídos**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian: 998 p. 2002.

MAUPAS, C. et al. Surfactant dependent toxicity of lipid nanocapsules in HaCaT cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1-2, p. 136-141, 2011.

MENG, J. et al. The decay of Redox-stress Response Capacity is a substantive characteristic of aging: Revising the redox theory of aging. **Redox Biology**, v. 11, p. 365-374, 2017.

MERINO, V. et al. Electrorepulsion versus electroosmosis: Effect of pH on the iontophoretic flux of 5-fluorouracil. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 5, p. 758-761, 1999.

MIQUEL, J. et al. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 34, n. 1, p. 37-46, 2002.

MITRI, K. et al. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1-2, p. 267-275, 2011.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. Rio de Janeiro. 84: 263-269 p. 2009.

MONTENEGRO, L. et al. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 100-112, 2016.

MORAIS, A. S. Caracterização farmacêutica de nanocapsulas de timol e avaliação da permeação cutânea e da atividade repelente contra *Aedes aegypti*, Ceará. 2015. 93f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza.

MÜLLER R.H., MÄDER K., GOHLA S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 50, S161–S177, 2000.

MÜLLER R.H., RADTKE M., WISSING S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews** 54 Suppl. 1 S131–S155, 2002.

NA, R. H. et al. Autofluorescence spectrum of skin: component bands and body site variations. **Skin Research and Technology**, v. 6, n. 3, p. 112-117, 2000.

NAIK, A.; KALIA, Y. O. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 9, p. 318 - 326, 2000.

NAIR, A. et al. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 423-434, 2013.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed: 299 p. 2002.

NGUYEN, H. N. et al. Curcumin as fluorescent probe for directly monitoring in vitro uptake of curcumin combined paclitaxel loaded PLA-TPGS nanoparticles. **Advances in Natural Sciences-Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 2, 2016.

NIEDDU, M. et al. Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: In vitro and in vivo studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 393-399, 2014.

OECD. Environment Directorate, Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. **Guidance for the conduct of skin absorption studies**, n.28, 2004. Series on testing and assessment.

PAN, K. et al. Thymol Nanoencapsulated by Sodium Caseinate: Physical and Antilisterial Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 1649-1657, 2014.

PANCHATCHARAM, M. et al. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 290, n. 1-2, p. 87-96, 2006.

PAPAS, K.; KALBFLEISCH, J.; MOHON, R. Bioavailability of a novel, water-soluble vitamin E formulation in malabsorbing patients. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 2, p. 347-352, 2007.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MULLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1-2, p. 170-184, 2009.

PARENTE, L. M. L. et al. Healing effect and antibacterial activity of Calendula officinalis L. cultivated in Brazil Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da Calendula officinalis L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 383-391, 2009.

PARFITT, N. R. et al. Bioequivalence of Topical Clotrimazole Formulations: An Improved Tape Stripping Method. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 3, p. 347-357, 2011.

PELLETT, M. A.; ROBERTS, M. S.; HADGRAFT, J. Supersaturated solutions evaluated with an in vitro stratum corneum tape stripping technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, n. 1, p. 91-98, 1997.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75-81, 2014.

PRIYADARSINI, K. I. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091-20112, 2014.

RAHMAN, N. F. A. et al. High yield lipase-catalyzed synthesis of Engkabang fat esters for the cosmetic industry. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2168-2176, 2011.

RAJPUT, N. Cosmetics market by category (skin & sun care products, hair care products, deodorants, makeup & color cosmetics, fragrances) and by distribution channel (general departmental store, supermarkets, drug stores, brand outlets) - **global opportunity analysis and industry forecast, 2014-2022**. 2016.

RAMIREZ-TORTOSA, M. C. et al. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 147, n. 2, p. 371-378, Dec 1999. ISSN 0021-9150.

RASSU, G. et al. Encapsulation and modified-release of thymol from oral microparticles as adjuvant or substitute to current medications. **Phytomedicine**, v. 21, n. 12, p. 1627-1632, 2014.

RATZ-LYKO, A. et al. Influence of Polyphenols on the Physiological Processes in the Skin. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 4, p. 509-517, 2015.

RAVANFAR, R. et al. Preservation of anthocyanins in solid lipid nanoparticles: Optimization of a microemulsion dilution method using the Plackett-Burman and Box-Behnken designs. **Food Chemistry**, v. 199, p. 573-580, 2016.

RAVI, P. R. et al. A hybrid design to optimize preparation of lopinavir loaded solid lipid nanoparticles and comparative pharmacokinetic evaluation with marketed lopinavir/ritonavir coformulation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 7, p. 912-926, 2014.

REINTJES, T. Solubility Enhancement with BASF Pharma Polymers. **Solubilizer Compendium (October 2011)**, 2011.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008.

RIELLA, K. R. et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656-663, 2012.

RIVIERE, J. E.; BROOKS, J. D. Predicting Skin Permeability from Complex Chemical Mixtures: Dependency of Quantitative Structure Permeation Relationships on Biology of Skin Model Used. **Toxicological Sciences**, v. 119, n. 1, p. 224-232, 2011.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 2006.

SAADATI, R.; DADASHZADEH, S. Marked effects of combined TPGS and PVA emulsifiers in the fabrication of etoposide-loaded PLGA-PEG nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 464, n. 1-2, p. 135-144, 2014.

SHAH, M.; PATHAK, K. Development and Statistical Optimization of Solid Lipid Nanoparticles of Simvastatin by Using 2(3) Full-Factorial Design. **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 2, p. 489-496, 2010.

SHAH, V. P.; ELKINS, J. S.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 4, n. 3, p. 377-385, 1999.

SHAH, V. P. et al. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms - Methods of evaluation of bioequivalence. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 2, p. 167-171, 1998.

SHASHI, P. et al. Skin kinetics and dermal clearance. **INTERNATIONAL RESEARCH JOURNAL OF PHARMACY**. 3: 14-21 p. 2012.

SIEWERT, M. et al. **Guidelines for dissolution / in vitro release testing of novel / special dosage forms**: Dissolution Technologies: 6-15 p. 2003.

SMITH, N. B. Perspectives on transdermal ultrasound mediated drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 585-594, 2007.

SOUTO, E. B.; LOPES, C. M. **Novas Formas Farmacêuticas Para Administração de Fármacos**. Porto: 2011.

SYEDL, H. K. et al. Stability indicating HPLC-UV method for detection of curcumin in Curcuma longa extract and emulsion formulation. **Food Chemistry**, v. 170, p. 321-326, 2015.

TADROS, T. F. FUNDAMENTAL PRINCIPLES OF EMULSION RHEOLOGY AND THEIR APPLICATIONS. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 91, p. 39-55, 1994.

TANOJO, H. et al. New design of a flow-through permeation cell for studying in vitro permeation studies across biological membranes. **Journal of Controlled Release**, v. 45, n. 1, p. 41-47, 1997.

TARNOWSKI, B. I.; SPINALE, F. G.; NICHOLSON, J. H. DAPI AS A USEFUL STAIN FOR NUCLEAR QUANTITATION. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 66, n. 6, p. 296-302, 1991.

TAVANO, L. et al. Co-encapsulation of lipophilic antioxidants into niosomal carriers: Percutaneous permeation studies for cosmeceutical applications. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 114, p. 144-149, 2014.

TEERANACHAIDEEKUL, V. et al. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 2, p. 134-141, 2008.

TEITEN, M.-H.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Hybrid Curcumin Compounds: A New Strategy for Cancer Treatment. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20839-20863, 2014.

TONNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids .6. Kinetics of curcumin degradation in aqueous-solution. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung**, v. 180, n. 5, p. 402-404, 1985.

TUNDIS, R. et al. Potential Role of Natural Compounds Against Skin Aging. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 1515-1538, 2015.

ULMANN, L. et al. Trophic effects of keratinocytes on the axonal development of sensory neurons in a coculture model. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 113-125, Jul 2007.

UNER, M. et al. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of Celecoxib for Topical Application - Preparation, Characterization and Drug Penetration Through Rat Skin. **Current Nanoscience**, v. 10, n. 4, p. 532-542, 2014.

UPRIT, S. et al. Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 4, p. 379-385, 2013.

VANDER HEYDEN, Y. et al. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 5-6, p. 723-753, 2001.

WALTER, J. R.; XU, S. Therapeutic transdermal drug innovation from 2000 to 2014: current status and outlook. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 11, p. 1293 - 1299, 2015.

WANG, H. B. et al. Excitation-Emission Fluorescence Characterization Study of the Three Phenolic Compounds. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, v. 30, n. 5, p. 1271-1274, 2010.

WANG, Y. et al. Enhanced Tumor Delivery of Gemcitabine via PEG-DSPE/TPGS Mixed Micelles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 1140-1150, 2014.

WATTANASATCHA, A.; RENGPIPAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1-2, p. 360-365, 2012.

WU, W. T. et al. Dispersion Method for Safety Research on Manufactured Nanomaterials. **Industrial Health**, v. 52, n. 1, p. 54-65, 2014.

YAN, A. et al. Tocopheryl polyethylene glycol succinate as a safe, antioxidant surfactant for processing carbon nanotubes and fullerenes. **Carbon**, v. 45, n. 13, p. 2463-2470, 2007.

YORDANOV, G.; SKROBANSKA, R.; PETKOVA, M. Poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilised with poloxamer 188: particle size control and cytotoxic effects in cervical carcinoma (HeLa) cells. **Chemical Papers**, v. 70, n. 3, p. 365-374, 2016.

ZAMARIOLI, C. M. et al. Nanoparticles containing curcuminoids (*Curcuma longa*): development of topical delivery formulation. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 1, p. 53-60, 2015.

ZHANG, Y. Q. et al. A new role for oxidative stress in aging: The accelerated aging phenotype in *Sod1(-/-)* mice is correlated to increased cellular senescence. **Redox Biology**, v. 11, p. 30-37, 2017.