

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO O
FLAVONOIDE *PHLORETIN*: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO E
ESTUDO DO SEU EFEITO ANTITUMORAL *IN VITRO* NO MELANOMA

TAINARA BENIN

PORTO ALEGRE
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO O
FLAVONOIDE *PHLORETIN*: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO E
ESTUDO DO SEU EFEITO ANTITUMORAL *IN VITRO* NO MELANOMA

TAINARA BENIN

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Stanisçuaski Guterres

Coorientadora: Dra. Luiza Abrahão Frank

PORTO ALEGRE
2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer meus pais, Sergio e Mara por todo o apoio e paciência durante esses 6 anos de graduação. Pai, obrigada por ser o cara que sempre me incentivou a estudar e por ser essa pessoa que eu tenho orgulho de chamar de pai. E mãe obrigada pelos almoços, bolos, pães e todas as coisas gostosas que tu fazias quando eu estava estudando. Agradeço, também, minha irmã Taiane pela amizade e por ser meu maior orgulho.

Agradeço as profissionais farmacêuticas, Dra. Gabriela Lucas Partos, por ter sido a minha primeira inspiração a ingressar no curso de farmácia. E a Mestre Bianca Leonardi, que durante 3 anos de pesquisa no laboratório fitoquímica da UFRGS, não somente foi uma mestranda na qual eu trabalhei, mas sim uma grande amiga que eu tenho muita gratidão de ter trabalhando junto.

Agradeço as minhas amigas de graduação: Thabata, Kiany, Karina, Renata Brito, Naiany e Mariana pela amizade, por serem as melhores companhias de cafés, risadas e estudos. Agradeço, também, a Maria Luisa, pela nossa amizade do início da graduação.

Agradeço as minhas colegas Laura Olivo e Leticia Mezzomo, por nos últimos anos da graduação terem me “adotado” e terem sido amigas essenciais. Agradeço também, em especial, minha amiga, colega de graduação Renata Neves que foi e ainda é uma grande amiga, parceira, ouvinte, que nunca mediu esforços para escutar quem estava ao seu lado.

Agradeço ao meu namorado Bruno Gonçalves, por nesses meses de pandemia ter sido essencial na minha vida. Agradeço pelo apoio e pelo incentivo

Agradeço meus colegas de laboratório 405 em especial ao Andrey e a Rafaela Gazzì pela parceria e amizade, cafés e cookies, por sempre ter me ajudado desde quando entrei no laboratório. Agradeço, também minha colega da graduação e colega de laboratório Rafaela Oliveira por sempre me ajudar, me aconselhar e ser uma amiga querida.

Agradeço a Dra. Talita Casarini por me ensinar a parte laboratorial, por ter me permitido a participar do projeto de doutorado que hoje tornou meu trabalho de TCC. Agradeço também a pós Doc. Giovana Onzi pelos experimentos nesse trabalho e pela amizade.

Quero agradecer, em especial, a minha co-orientadora, Dra. Luiza Frank, um exemplo de co-orientadora, pesquisadora, amiga, ouvinte, mãe, mas principalmente incentivadora. Uma mulher que te coloca para cima, que consegue enxergar o profissional que está a sua volta. Obrigada por tudo, eu nem consigo expressar a minha gratidão por tudo que tu fizeste e ainda faz por mim e por todos que tu co-orienta. E por fim, agradeço a professora Silvia Guterres, um exemplo de profissional farmacêutica, por ter me orientado, por me permitir fazer parte do laboratório 405 e por me inspirar cada vez mais na pesquisa.

RESUMO

As aplicações dermatológicas do *phloretin* são restringidas por sua baixa solubilidade em água. Essa biomolécula, encontrada principalmente em frutas cítricas, apresenta recentes e importantes aplicações biológicas. A nanotecnologia tem sido utilizada como estratégia para aumentar a solubilidade aparente de fármacos e biofármacos lipofílicos em meio aquoso e melhorar seu efeito biológico. Sendo assim, este trabalho visou desenvolver, caracterizar, avaliar a segurança e os efeitos citotóxicos de nanocápsulas poliméricas contendo *phloretin* (NC-Phl). Além disso, incorporar NC-Phl em uma formulação semissólida inovadora a partir do polímero Lecigel® (HG-NC-Phl). O método analítico foi validado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC –UV). Todos os parâmetros avaliados foram considerados adequados segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 166 de 24 de julho de 2017. A linearidade, com intervalo de 0,5 a 15 µg/mL, apresentou um $R^2 = 0,999$. O desvio padrão relativo da precisão intra e inter dia foi de 1,67; 2,39, respectivamente. A exatidão apresentou um desvio padrão relativo menor que 4,7% e o fármaco apresentou adequada porcentagem de recuperação (95,8% - 103,7%). NC-Phl foi preparada pelo método de nanoprecipitação e a avaliação da qualidade foi realizada através da medida de tamanho, pH, potencial zeta, teor do fármaco e eficiência de encapsulação. Os efeitos citotóxicos foram avaliados em células MRC5 (linhagem celular de fibroblastos) HaCaT (linhagem celular de queratinócitos) e SK-Mel-28 (linhagem celular tumoral). Foi observado que NC-Phl podem ser consideradas seguras em linhagens de fibroblastos e queratinócitos e, ao mesmo tempo, apresentou efeito citotóxico em linhagem celular SK-Mel-28 após exposição por 72h. HG-NC-Phl foram caracterizados em relação a suas propriedades físico-química, pH e teor do fármaco. HG-NC-Phl apresentou comportamento pseudoplástico. Verificou-se através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) a presença de NC-Phl incorporadas no Lecigel®. Portanto, foi desenvolvido e validado um método analítico adequado para quantificação de NC-Phl. Foram produzidas suspensões de nanocápsulas contendo *phloretin* em baixa concentração, as quais foram seguras e com efeito citotóxico em cultura de células SK-MEL-28. Além disso, o hidrogel inovador proposto apresentou interessantes características para futuras aplicações dermatológicas versáteis tanto para cosmeceutica, como efeitos antioxidantes, quanto para terapia de melanoma.

PALAVRAS-CHAVE: *Phloretin*; HPLC-UV; nanotecnologia; avaliação da qualidade; melanoma

ABSTRACT

Dermatological applications of phloretin are restricted by its low water solubility. This biomolecule, found mainly in citrus fruits, has recent and important biological applications. Nanotechnology has been used as a strategy to increase the apparent solubility of lipophilic drugs and biopharmaceuticals in aqueous media and improve their biological effect. Therefore, this work aimed to develop, characterize, evaluate the safety and cytotoxic effects of polymeric nanocapsules loaded phloretin (NC-Phl). Also, to incorporate NC-Phl in an innovative semi-solid formulation from Lecigel® polymer (HG-NC-Phl). The analytical method was validated by high performance liquid chromatography (HPLC –UV). All parameters evaluated were considered adequate according to the Resolution of the Collegiate Board (RDC) 166 of July 24, 2017. The linearity, with an interval of 0.5 to 15 µg / mL, presented an $R^2 = 0.999$. The relative standard deviation of intra- and inter-day precision was 1.67; 2.39, respectively. The accuracy showed a relative standard deviation of less than 4.7% and the drug showed an adequate percentage of recovery (95.8% - 103.7%). NC-Phl was prepared by the nanoprecipitation method and the quality assessment was carried out by measuring size, pH, zeta potential, drug content and encapsulation efficiency. The cytotoxic effects were evaluated in MRC5 cells (fibroblast cell line) HaCaT (keratinocyte cell line) and SK-Mel-28 (tumor cell line). It was observed that NC-Phl can be considered safe in fibroblast and keratinocyte strains and, at the same time, it presented a cytotoxic effect in SK-Mel-28 cell line after 72h exposure. HG-NC-Phl were characterized in relation to their physicochemical properties, pH and drug content. HG-NC-Phl showed pseudoplastic behavior. The presence of NC-Phl incorporated in Lecigel® was verified through scanning electron microscopy (SEM). Therefore, an adequate analytical method for the quantification of NC-Phl was developed and validated. Suspensions of nanocapsules loaded phloretin in low concentration were produced, which were safe and with a cytotoxic effect in SK-MEL-28 cell culture. Also, the proposed innovative hydrogel presented interesting characteristics for future versatile dermatological applications, both for cosmeceuticals, as antioxidant effects, and for melanoma therapy.

KEYWORDS: Phloretin; HPLC-UV; nanotechnology; quality assessment; melanoma

SUMÁRIO

1.0 Introdução	10
2.0 Revisão bibliográfica	12
2.1 Pele	12
2.2 Melanoma	12
2.2.1 Carcinoma basocelular (CBC):	13
2.2.2 Carcinoma espinocelular (CEC):	13
2.2.3 Melanoma:	13
2.3 Phoretin	14
2.3.1 Efeito Antienvhecimento e Antitumoral do <i>Phloretin</i>	16
2.4 Nanotecnologia	17
2.4.1 Avaliação da qualidade de sistemas nanotecnológicos	18
2.5 Lecigel®	18
3.0 Objetivo	19
3.1 Objetivo específico	19
4.0 Materiais e Métodos	20
4.1 Materiais	20
4.2 Equipamentos:	20
4.3 Métodos	20
4.3.1 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de Phl por HPLC-UV	20
4.3.2 Desenvolvimento de nanocápsulas contendo <i>Phloretin</i>	21
4.3.2 Caracterização de NC-Phl	21
4.6 Avaliação <i>in vitro</i> em cultura de células	22
4.6.1 Ensaio de brometo de 3- (4,5 dimetiltiazol-2-tiazil) -2,5-difenil-tetrazólio (MTT)	22
4.6.2 Ensaio <i>Comulative population doubling</i> (cPD)	23
4.6.3 Análise morfométrica nuclear (NMA)	23
4.8 Produção do hidrogel contendo NC-Phl	24
4.8.1 Caracterização de hidrogéis	24
4.8.2 Análise morfológica dos hidrogéis	24
4.9 Análise estatística	24
5.0 Resultados e discussão	25
5.1 Validação de método analítico	25
5.2 Avaliação da qualidade de NC-Phl	26
5.3 Efeitos citotóxicos de NC-Phl em cultura de células	29
5.4 Hidrogel: características físico-químicas e reologia	33

5.5 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
6.0 Conclusão	36
Referências:	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Linearidade e curva de calibração. Utilizando uma concentração da solução mãe de 50 µg/mL	25
Figura 2: Especificidade do Phl. Utilizando 100µL de NC-Br.	26
Figura 3: Análise de viabilidade celular para linhas celulares (a) MRC5 e (b) HaCaT.	30
Figura 4: Efeitos de NC-Phl em células de melanoma SK-MEL-28	32
Figura 5: Perfil de distribuição de tamanho de partícula de NC-Phl (nanocápsulas poliméricas com <i>phloretin</i>) HG-NC-Phl (formulação semissólida de NC-Phl) e HG-Phl (formulação semissólida de NC-Phl).	34
Figura 6: Viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento de hidrogéis contendo nanocápsulas carregadas com Phl (HG-NC-Phl) e de hidrogéis contendo Phl não encapsulado (HG-Phl)...	35
Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura de HG-NC-Phl (A) e HG-Phl (B).....	36

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Exatidão: 3 pontos da curva de calibração 0,7µg/mL; 3,0 µg/mL e 14 µg/mL	26
Tabela 2: Características físico-químicas de NC-Phl e NC-Br	28
Tabela 3: Índice de consistência, índice de fluxo e confiança de ajuste de formulações de hidrogel.....	34

1.0 Introdução

O flavonoide *phloretin* (Phl) é encontrado, principalmente, nas maçãs e frutas cítricas e faz parte da classe química da di-hidrochalcona, possui importantes atividades antioxidante e anti-inflamatória (WANG *et al.*, 2014). As propriedades biológicas do Phl foram avaliadas em linhagem do câncer gástrico (XU *et al.*, 2018), no câncer de mama humano (WU *et al.*, 2018), células (EC-109) cancerígenas do esôfago (DUAN *et al.*, 2017) e células do câncer do cólon humano HT-29 (PARK *et al.*, 2007). Paralelamente foi avaliada a segurança em linhagens celular não tumorais como células do pulmão A549 (MIN *et al.*, 2015), e células epiteliais da mama (KIM *et al.*, 2009).

Trabalhos anteriores já demonstraram que quando aplicado sobre a pele, essa biomolécula inibe atividade da elastase e da matriz metaloproteinase-1 (MMP-1) (LEU *et al.*, 2006), e também reduz a atividade da tirosinase celular e o conteúdo da melanina (LIN *et al.*, 2007). Além disso, induz apoptose em células do melanoma 4A5 de camundongos B16 (LIN *et al.*, 2007). Em um estudo foi notado que o Phl quando combinando com o ácido ascórbico e o ácido ferúlico são capazes de reduzir a formação de dímeros induzidos por UV e expressão de MMP-3 e p53 em pacientes (ORESJO *et al.*, 2008). Também foi estudado o efeito antiacne do Phl na pele de voluntários e observou-se a redução de comedões e a produção de sebo (KUM *et al.*, 2016).

Sendo assim, diferentes autores demonstram o potencial terapêutico dessa biomolécula, o que justifica o crescente interesse no seu uso em novas formulações dermocosméticas e estudos na área da pesquisa utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* a fim de consolidar essas importantes aplicações.

Apesar dos benefícios apresentados pelo Phl este tem sua aplicação clínica limitada em razão da sua baixa solubilidade em água o que dificulta a incorporação em formulações tópicas. A solubilidade de Phl estudada por Li e colaboradores (2011) foi verificada em álcoois especialmente metanol e etanol (Li *et al.*, 2011). Diante disso, uma possibilidade é a incorporação dessa biomolécula em sistemas inovadores capazes de encapsular fármacos hidrofóbicos conhecidos como sistemas carreadores nanoestruturados dentre os quais as nanocápsulas poliméricas são seus representantes (CONTRI *et al.*, 2016; CHAVES *et al.*, 2017; FRANK *et al.*, 2017). As nanocápsulas poliméricas têm a capacidade de contornar problemas relacionados ao fármaco, ou seja, podem proteger o ativo contra a degradação da luz ultravioleta aumentar o direcionamento celular, liberar o fármaco de forma controlada e ainda reduzir efeitos adversos relacionados aos fármacos (WEISS-ANGELI *et al.*, 2008; DETONI *et al.*, 2012; FRANK *et al.*, 2015). Na aplicação tópica as nanocápsulas podem atuar como

reservatório de medicamentos lipofílicos, modular sua penetração, permeação através da pele, controlando o contato das substâncias com o estrato córneo (CONTRI *et al.*, 2014).

Os sistemas nanoestruturados apresentam tamanho de partícula inferior a 1µm. As nanocápsulas poliméricas são constituídas por uma capa organizado ao redor de um núcleo oleoso, a substância ativa pode estar dissolvida no núcleo oleoso ou adsorvida na parede polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). É importante salientar que esse tipo de nanopartícula são capazes de encapsular até 100% do ativo (BILATI *et al.*, 2005).

As nanocápsulas poliméricas são obtidas na forma de suspensões aquosas, sendo de difícil aplicação na superfície da pele. Nesse sentido, autores têm proposto sua incorporação em veículos semissólidos a fim de melhorar ou tornar essa aplicação possível (CONTRI *et al.*, 2014; FRANK *et al.*; 2017). Um interessante polímero é o Lecigel®, uma matéria-prima destinada a produzir géis constituídos de copolímero de acrilato de sódio e lecitina. Este polímero tem sido utilizado em produtos comerciais como por exemplo em sérum da UnderSkin®, um gel redutor da Pharmapele, e base facial hidratante da Biozenthil entre outros. Embora existam linhas com o Lecigel® o desenvolvimento com nanopartículas incorporadas não é citado na literatura no momento. Sendo assim, este trabalho é inovador, pois combina as vantagens que a nanotecnologia pode agregar ao encapsulamento de um fármaco e ainda é capaz de aplicar esse sistema a um polímero que ainda não foi estudado para veicular nanocápsulas poliméricas, desenvolvendo uma formulação nanotecnológica com potencial aplicação terapêutica.

Na literatura, o uso do Phl vem sendo proposto para tratamento ou prevenção de certas condições da pele, como fotoenvelhecimento, acne, distúrbios pigmentares e o câncer de pele. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nanocápsulas poliméricas inovadoras contendo Phl, bem como produzir um hidrogel como formulação dermatológica para possibilitar sua aplicação terapêutica.

2.0 Revisão bibliográfica

2.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano envolvendo uma área de superfície de aproximadamente 1,5 - 2,0m que protege os órgãos internos do corpo atuando como uma barreira contra efeitos externos. Um exemplo desse efeito é a radiação solar que está relacionada a alterações cutâneas, tais como a formação de rugas, descamação, ressecamento, anormalidades na pigmentação (hipopigmentação ou hiperpigmentação) e do câncer de pele (NICHOLS e KATIYAR, 2010).

A pele apresenta duas camadas principais; epiderme e derme. A epiderme é a camada superior da pele, apresentando uma espessura de apenas 0,1 a 0,2 mm. Ela é constituída por células chamadas queratinócitos, que se diferenciam a partir da camada basal. À medida que são deslocados para a parte superior da pele, esses queratinócitos vão se estratificando, perdendo seus núcleos e eventualmente formando um aglomerado de queratina, conhecidos como corneócitos. Essa camada queratinizada superior forma a barreira cutânea, cuja função é proteger a pele contra a entrada de bactérias e prevenir a perda de fluidos e eletrólitos. É na camada basal que estão presentes os melanócitos, células dendríticas que produzem o pigmento melanina, com a função de proteção da pele contra a radiação ultravioleta (MACNEIL, 2007; LEE *et al.*, 2013).

A derme é a camada inferior, com espessura maior em relação a epiderme, 1 a 4 mm e está conectada à membrana basal. Consiste de diferentes tipos de fibras colágenas, principalmente o tipo I, ela é bem vascularizada e contém receptores sensíveis ao toque, temperatura e dor. Além disso, folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas estão presentes na derme e se estendem até a epiderme (MACNEIL, 2007).

2.2 Melanoma

Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer), no Brasil, o câncer de pele ocupa a primeira posição, correspondendo a 30% de todos os tumores malignos registrados no país (INCA, 2020). O melanoma é considerado o tipo de câncer mais agressivo entre os cânceres de pele com surgimento nos melanócitos (células que produzem pigmento na pele) (MASSI *et al.*, 2020).

Existem três tipos principais de câncer de pele Carcinoma basocelular (CBC), Carcinoma espinocelular (CEC) e o Melanoma que apresentam etiologia e progressão diferentes, porém,

sabe-se que compartilham uma característica importante: todos podem se originar a partir da exposição exacerbada à radiação ultravioleta.

2.2.1 Carcinoma basocelular (CBC):

É o mais prevalente dentre todos os tipos de câncer. O CBC surge nas células basais, que se encontram na camada mais profunda da epiderme. Está presente com mais frequência nas regiões mais expostas ao sol, como face, orelhas, pescoço, couro cabeludo, ombros e costas.

2.2.2 Carcinoma espinocelular (CEC):

Este é o segundo mais prevalente entre todos os tipos de câncer de pele. Manifesta-se nas células escamosas, que constituem a maior parte das camadas superiores da pele. Pode se desenvolver em todas as partes do corpo, embora seja mais comum nas áreas expostas ao sol, como orelhas, rosto, couro cabeludo e pescoço.

2.2.3 Melanoma:

Este tipo se inicia nos melanócitos, são constituídos por dendritos que se estendem para os queratinócitos. Estão presentes na membrana basal e são responsáveis pela produção de melanina.

A taxa de incidência do câncer do tipo melanoma é cerca de 1/10 dos casos de câncer do tipo não melanoma, porém, a taxa de morte é de aproximadamente 8 vezes superior ao tipo não melanoma (LIU-SMITH *et al.*, 2017). Anualmente, no Brasil, é realizada uma estimativa de novos casos, e neste ano a estimativa foi de 8.450 sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres. Já o número de mortes é de 1.794, sendo 1.012 homens e 782 mulheres (INCA, 2020).

Esta doença é a forma mais perigosa do tumor de pele e é capaz de causar 90% da mortalidade do câncer de pele sendo a recidiva ou a recorrência do melanoma uma falha comum no tratamento. A classificação é baseada no sistema de estadiamento tumor-nódulo metástase (TNM) cuja classificação é baseada nas características do próprio tumor sendo esse sistema importante para avaliação médica do tumor (ANDRADE e JUDICE, 2010). O diagnóstico é realizado clinicamente por dermatoscopia e o estadiamento é realizado segundo a American Joint Commission on Cancer (AJCC) (GARBE *et al.*, 2016).

Um dos fatores que contribui para esse tipo de tumor é a radiação UVB pois esse estímulo é capaz de iniciar a melanogênese, via processo dependente da inflamação aguda. A radiação UVB é a mais energética e que pode induzir danos no DNA. É descrito que a radiação ultravioleta seja o fator etiológico ambiental mais importante para o desenvolvimento do

melanoma, pois promove mutações em oncogênese e supressão da resposta imune. Já a radiação UVA produz espécies reativas de oxigênio capazes de causar danos secundários ao DNA, e, portanto, induzir ao câncer de pele (LIU-SMITH *et al.*, 2017).

Entre os tratamentos, o primeiro quimioterápico aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) foi a dacarbazina em 1975, que alquila o DNA e impede a divisão celular. Embora amplamente utilizado tanto isolado como em associações, a dacarbazina exibe eficácia moderada, apresentando taxa de resposta completa em apenas 5% dos casos (MISHRA *et al.*, 2018). Em 2011, um anticorpo conhecido como ipilimumab (Yervoy) também foi aprovado pelo FDA, resultado de um estudo que mostrou o bloqueio e o envolvimento do antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), essa terapia foi capaz de promover taxas de sobrevivência significativas em melanoma metastático maligno resultando em uma importante descoberta relacionada ao papel do sistema imunológico na luta contra o câncer (CALLAHAN *et al.*, 2013).

Além dos medicamentos já apresentados, plantas medicinais podem oferecer alternativas interessantes para o tratamento desta doença (GARBE *et al.*, 2016). Os chamados fitoquímicos são compostos biologicamente ativos derivados de plantas com atividades relevantes tanto na prevenção quanto no tratamento do melanoma, pois têm propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antiproliferativas e antiangiogênicas, amplamente disponíveis e de baixo custo. Entre os fitoquímicos já avaliados e com aplicações promissoras do melanoma, estão a capsaicina, curcumina, epigallocatequina-3-galato, genisteína, resveratrol, indol-3-carbinol, compostos organossulfurados (dialil trissulfeto), entre outros (NG *et al.*, 2018). Sendo assim, o melanoma é uma doença de natureza agressiva e resistente, cujos tratamentos atuais apresentam uma série de desvantagens como a baixa especificidade, alta toxicidade e baixa taxa de resposta completa (MISHRA *et al.*, 2018). Portanto, visto que o flavonoide Phl apresenta evidências positivas no tratamento do melanoma, este foi escolhido visto que seja promissor no desafio de se obter melhores prognósticos para os pacientes acometidos pelo melanoma.

2.3 Phloretin

O Phl é um flavonoide encontrado especialmente nas frutas cítricas, folhas e raízes da macieira (*Malus domestica*), e também está presente no seu suco. É conhecido por suas importantes propriedades biológicas como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (SHIN, 2014; DE OLIVEIRA, 2016). É considerado um fitocomposto antioxidante poderoso que pode proteger sistemas biológicos contra o estresse oxidativo, podendo ser utilizado como

um suplemento natural para prevenção de doenças relacionadas aos radicais livres (NITHIYA e UDAYAKUMAR, 2016), bem como em formulações farmacêuticas dermatológicas (CAMARA, 2019). Estudos mostram que a atividade antioxidante de 100 g de maçã fresca possui o equivalente a 1.500 mg de vitamina C (EBERHARDT *et al.*, 2000). Isso demonstra um elevado potencial antioxidante favorável de Phl pois, segundo a Organização Mundial da saúde (OMS), a indicação da vitamina C para um indivíduo adulto é de 45 mg/dia.

Um artigo de revisão da literatura publicado recentemente aborda as principais aplicações dermatológicas do Phl (CASARINI *et al.*, 2020). Nesse artigo, os autores relataram suas principais aplicações na pele em utilização no melasma, proteção contra o fotoenvelhecimento, antiacne e o tratamento do melanoma. As concentrações utilizadas em cada doença de pele são variadas normalmente entre 10 a 200 μM , sendo as maiores concentrações utilizadas para o tratamento do melanoma e as mais baixas como prevenção ao fotoenvelhecimento. Os experimentos realizados *in vitro* consideram cultura de células na linhagem HaCaT (queratinócitos). Além disso, alguns autores avaliam a permeação e penetração desse biocomposto em pele de orelha de porco, em célula de Franz. A primeira nanopartícula contendo Phl foi proposta por Lee e Cho usando poli (ácido lático-co-glicólico) funcionalizadas com amina. A partir desse ano existem somente 4 trabalhos na literatura que propõe encapsular o Phl, sendo os citados: nanofibra de poli (álcool vinílico) e succinato de Da-tocoferil polietilenoglicol contendo Phl (NAM *et al.*, 2017), nanopartículas de ouro conjugada com Phl (PAYNE *et al.*, 2018), nanopartículas de quitosana carregadas com Phl (MARIADOSS *et al.*, 2019) e nanopartículas de poli (D, L-lactídeo-co-glicolídeo) revestidas com quitosana (LEE *et al.*, 2019) sendo que nenhum destes trabalhos envolve o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas. Ainda, o trabalho aponta que existem produtos contendo Phl disponíveis comercialmente, todos com o Phl na forma não encapsulada e a maioria desses produtos possuem efeitos antienvelhecimentos e antirrugas sendo classificados como cosméticos ou cosmeceúticos (CASARINI *et al.*, 2020).

O Phl tem como aspecto em pó branco amarelado à bege com baixa solubilidade em água ($0,040 \pm 0,002$ mg/mL), solúvel em álcoois, especialmente metanol e etanol, seu armazenamento deve ser protegido da luz pois pode se oxidar (LI *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2017). Essas características, aliada aos recentes trabalhos que demonstram o potencial terapêutico dessa biomolécula tornam o Phl um interessante candidato ao encapsulamento em nanocápsulas poliméricas.

2.3.1 Efeito antienvhecimento e antitumoral do *Phloretin*

A importância que os cosméticos têm, hoje em dia, é inegável. O efeito dermatológico do Phl estudado por Oresajo e colaboradores (2008) demonstrou o efeito fotoprotetor de Phl sendo este associado à vitamina C e ácido ferúlico em uma formulação tópica. Neste estudo, 10 voluntários (18 a 60) anos de idade, Fitzpatrick tipos (II e III), foram tratados com a formulação antioxidante ou com veículo controle durante 4 dias consecutivos. Os resultados mostraram que a aplicação da formulação antioxidante atenuou os danos causados pela radiação UV. Por esse motivo, os autores sugerem que além do efeito antioxidante, a associação de Phl e vitamina C apresentam potencial de ser utilizada no tratamento do câncer de pele não melanoma visto que ela age em um dos principais fatores associados ao aparecimento da doença, a lesão ao DNA, (ORESajo *et al.*, 2008). Como a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio estão envolvidas em uma série de doenças humanas, incluindo o câncer, a atividade antioxidante de Phl deve ser uma das responsáveis pelo seu efeito protetor e terapêutico, justificando a associação dessas biomoléculas pelos autores.

Qin e colaboradores (2015), demonstraram que o Phl, em concentrações de até 200 $\mu\text{mol/mL}$, apresentam atividade anticâncer contra diferentes linhagens celulares, incluindo células humanas de câncer de pulmão (A549), células de câncer hepático (Bel7402), câncer ileocecal humano (HepG2), e câncer de cólon humano em linhagem celular (HT-29) (QIN *et al.*, 2015). Abkin e colaboradores (2016) estudaram os efeitos do Phl no melanoma, e observaram que o Phl aumentou a eficácia da penetração de HSP70 em células de melanoma de camundongo B16 e eritroblastos humanos K-562. Além disso, a incubação com Phl 20 μM também estimulou um aumento do rompimento das células comparando com as células não tratadas (Abkin *et al.*, 2016).

Sendo assim, é possível observar que há indicativos de que o efeito antienvhecimento e antitumoral estejam relacionados, uma vez que as espécies reativas de oxigênio estão associadas à exposição UV e são responsáveis pelo processo de envelhecimento e também estão relacionadas em diferentes vias de sinalização celular (SANCHES, *et al.*, 2017). Contudo, como se trata de pesquisas recentes ainda é necessário que novos estudos estabeleçam o mecanismo desse efeito.

2.4 Nanotecnologia

O termo nanopartícula inclui nanocápsulas poliméricas, nanoesfera e nanoemulsão que diferem entre si pela composição e a organização estrutural (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Essas partículas apresentam um tamanho inferior a 1µm. As nanocápsulas poliméricas são constituídas por uma camada polimérica organizado ao redor de um núcleo oleoso, a substância ativa pode estar dissolvida no núcleo oleoso ou adsorvida na parede polimérica. As nanoesferas não possuem óleo na sua composição e são formados por uma matriz polimérica podendo o fármaco ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanoemulsões são caracterizadas por não apresentar uma parede polimérica e pelo modo descrito de preparação que envolve aplicação de energia cinética entre óleo e água (SARHEED *et al.*, 2020). Além disso, dependendo das características físico-químicas e as características da partícula é possível obter uma eficiência de encapsulação em torno de 100% (BILATI *et al.*, 2005).

As nanopartículas são estudadas em diversas áreas, e apresentam grande interesse na área da farmácia, podendo serem usadas para diversas rotas de administração como oral, nasal, parenteral, intra-ocular e na pele (MOHANRAJ e CHEN, 2007). Os sistemas nanotecnológicos têm recebido muita atenção na última década e demonstram grande potencial na área farmacêutica sendo possível o aumento da solubilidade aparente e a penetração de várias substâncias ativas em tecidos e mucosas (FRANK *et al.*, 2015; YINGNGAM *et al.*, 2019). Além disso, Mathes e colaboradores (2016) estudaram o uso de nanocarreadores a fim de aumentar a captação celular sendo possível diminuir os efeitos adversos (MATHES *et al.*, 2016). Contri e colaboradores (2014) mostraram que esses sistemas apresentam capacidade diminuir a irritabilidade na pele (CONTRI *et al.*, 2014) e ainda Frank e colaboradores (2017) estudaram a capacidade de transpor barreiras de mucosa (FRANK *et al.*, 2017).

Esses sistemas possuem diversas técnicas descritas no preparo, umas delas é a nanoprecipitação que é uma técnica promissora em escala industrial pois há uma facilidade nessa produção, uma alta eficiência de encapsulamento e alta reprodutibilidade (YINGNGAM *et al.*, 2019). Essa técnica, no entanto, é ideal para fármacos com propriedades lipofílicas que apresentam solubilidade baixa em água (BILATI *et al.*, 2005). É importante ressaltar que as preparações das nanocápsulas poliméricas são suspensões aquosas e que para administrá-las pela via cutânea se faz necessário veicular em formulações com adequada viscosidade, como por exemplo formulações semissólidas como hidrogéis de modo que aumente o tempo de contato da formulação com a pele.

2.4.1 Avaliação da qualidade de sistemas nanotecnológicos

O estudo das interações entre materiais nanoengenharia e sistemas biológicos desempenha um papel vital no desenvolvimento de aplicações biológicas da nanotecnologia e o aprimoramento da compreensão é fundamental na interface bio-nano (FARIA *et al.*, 2018).

A manipulação de um produto em escala nanométrica é um dos principais focos das pesquisas em desenvolvimento tecnológico do momento (MARTINS, 2016). Diversas são as aplicações e as vantagens que o sistema nanotecnológicos podem proporcionar, como por exemplo, aumento da estabilidade do medicamento devido à proteção contra degradação química, aumento da interação com tecidos e células, direcionamento do medicamento e, aumento da eficácia e diminuição dos efeitos adversos do medicamento (FRANK *et al.*, 2015).

Os sistemas nanotecnológicos são sistemas já bem consolidados. Primeiramente, foram produzidos os lipossomas, em 1960, que foram desenvolvidos para aumentar a variedade de ferramentas disponíveis no âmbito farmacêutico. Atualmente, além dos lipossomas, são desenvolvidos diferentes tipos de sistemas carreadores como as nanopartículas. Esses sistemas permitem um tempo de circulação maior no organismo, além disso, existem moléculas sinalizadoras na superfície desses sistemas com a finalidade de direcionamento para células alvos.

Marques e colaboradores (2009) caracterizaram esses nanosistemas avaliando a morfologia, distribuição do tamanho de partícula determinação do potencial zeta, pH, quantidade do fármaco, cinética de liberação e estabilidade em função do tempo de armazenamento. (MARQUES *et al.*, 2009). Em outro estudo, Faria e colaboradores (2018) trouxeram informações importantes quanto o uso de diferentes nanomateriais e suas importantes caracterizações mostrando como cada caracterização reflete em diferentes meios biológicos. Por exemplo, o potencial zeta reflete na carga de superfície afetando a biodistribuição, a densidade, especialmente na cultura celular, que podem ter um grande efeito na dose celular de nanomateriais projetados durante a experimentação. O carregamento e a liberação de fármacos também são uma etapa de caracterização importante já que alguns sistemas são direcionados especialmente para o local de ação (FARIA *et al.*, 2018; FDA, 2015).

2.5 Lecigel®

Lecigel®, é um copolímero de acrilato de sódio constituído de lecitina, é um exemplo de matéria-prima desenvolvida para produzir géis de maneira rápida e simples. Esse polímero apresenta propriedades emulsionantes, compatíveis com a maioria dos compostos podendo ser

incorporado em fase oleosa ou aquosa, também é estável em ampla faixa de pH, 4-8 (LUCAS MEYER COSMÉTICOS). Lecigel[®] tem sido usado em produtos comerciais, porém o desenvolvimento concomitante com nanocápsulas poliméricas não está citado na literatura até o momento. Sendo assim, este trabalho é o primeiro a propor a veiculação desse polímero em nanocápsulas poliméricas visando o tratamento para o melanoma.

São exemplos de produtos comerciais que usam o Lecigel[®] como base nas formulações: gel micelar antipoluição, creme nutritivo antienvhecimento, gel creme refrigerante, entre outros. As concentrações desses produtos dependem da textura do produto final manipulado, podendo variar de 1% a 4%. (LUCAS MEYER COSMÉTICOS).

A incorporação de nanocápsulas poliméricas tem sido uma estratégia interessante para aumentar a adesão das partículas à pele e à mucosas (CONTRI et al., 2014; FRANK et al., 2017). Alguns trabalhos utilizam diferentes polímeros como veículo das nanocápsulas poliméricas, como por exemplo hidrogel de quitosana (CONTRI et al., 2014; FRANK *et al.*, 2017; CARDOSO et al., 2019), ou também de hidroxietilcelulose (HEC) (FRANK *et al.*, 2017). O desenvolvimento dessas formulações usando quitosana, carbômero, HEC, entre outros permitem o aumento da viscosidade da formulação e, conseqüentemente, o contato adequado com a superfície cutânea (CONTRI *et al.*, 2010).

3.0 Objetivo

Desenvolver e avaliar a qualidade das nanocápsulas poliméricas contendo PhI, bem como viabilizar sua aplicação tópica, através da obtenção de um hidrogel inovador, a fim de propor uma nova formulação nanotecnológica para o tratamento do melanoma.

3.1 Objetivo específico

- a) Desenvolver um método analítico por cromatografia líquida alta eficiência (HPLC-UV) para quantificação de PhI;
- b) Desenvolver e caracterizar suspensões aquosas de NC-PhI;
- c) Avaliar o efeito do PhI *in vitro* nas linhagens celular MRC5, HaCAT e SK-Mel-28;
- d) Desenvolver um hidrogel contendo as nanocápsulas poliméricas de PhI e caracterizá-lo quanto à distribuição de tamanho, pH, teor e reologia;

4.0 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

O Phl foi obtido da Fagron (Brasil) e Enzo Life Sciences (Estados Unidos) Poli (ϵ -caprolactona) (PCL 80Mn kg/mol) foi obtido da Aldrich (Lesquin, France). Lecigel[®] foi obtido da farmácia de manipulação Dermogral Moinhos (Porto Alegre, Brasil). Polissorbato 80 (tween 80), óleo de copaíba e monoestearato de sorbitano (Span 60) foram obtidos de Delaware (Porto Alegre, Brasil). Os solventes acetonitrila e metanol foram usados para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e foram obtidos da Tedia (Rio de Janeiro, Brasil). Os materiais para a cultura de células foram obtidos da Gibco[®] (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). A linhagem celular para o melanoma SK-MEL-28 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, #0289) (Rio de Janeiro, Brasil).

4.2 Equipamentos:

Os equipamentos utilizados foram: HPLC-UV (SHIMADZU), Potenciômetro (B474 Micronal), Mastersizer (2000 Malvern), rotaevaporador (Brushi), viscosímetro (LVLD-II + Brookfield), ultrassom (modelo USC-2850A, Unique, 25kHz, 220 W; Indaiatuba, São Paulo, Brasil) Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instrument), NanoSight (NanoSight LM 10 & NTA 2.2 Analytical Software, Nanosight Ltd., Amesbury, Reino Unido), microscopia eletrônica de varredura (MEV) (microscópio de varredura Jeol-JSM-5800) e citometria de fluxo (Guava Technologies) e espectrofotômetro (EnVision 2103 PerkinElmer[®]) e microscópio (Olympus BX-50)

4.3 Métodos

4.3.1 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de Phl por HPLC-UV

O método analítico foi desenvolvido e validado conforme preconizado na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 166 de 24 de julho de 2017. O método analítico foi adaptado conforme o método proposto por Wei e colaboradores (2017).

A fase móvel foi constituída de acetonitrila: água ultrapura com 0,2% de ácido fosfórico (40:60 v/v). Foi utilizado uma coluna RP-18 Phenomenex (tamanho de partícula de 250 mm × 4,6 mm

× 5 µm). O fluxo foi de 1 mL/min, o volume de injeção foi de 20 µL e o comprimento de onda de detecção foi de 286 nm.

Primeiramente, uma solução mãe foi preparada, na concentração de 50 µg/mL para realizar uma curva de calibração. A faixa de concentração da linearidade foi de 0,5 a 15 µg/mL. Para a precisão foi utilizada uma nanocápsula branca, ou seja, sem a presença do fármaco (NC-Br) seguindo o mesmo método para o teor e a especificidade posteriormente descritos. Na exatidão foram utilizados três pontos da curva, as concentrações usadas foram 0,7 µg/mL; 3,0 µg/mL e 14 µg/mL. Na determinação da especificidade foi usado a NC-Br. Foi pipetado da suspensão de NC-Br a quantidade de 100µL e diluídas em balão volumétrico em 10mL de metanol. As soluções foram submetidas a ultrassom por 10 min e centrifugadas a 3600 rpm por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em uma membrana de tamanho de poro de 0,45 µm e, em seguida, o conteúdo foi analisado por HPLC-UV

4.3.2 Desenvolvimento de nanocápsulas contendo *Phloretin*

As nanocápsulas contendo Phl foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). A fase orgânica constituída em óleo de copaíba (330 µL), monoestearato de sorbitano (0,038 g) e PCL (0,1 g), acetona (24 mL), etanol (3 mL) (Frank *et al.*, 2017) e o flavonóide Phl (0,002 g) que também foi adicionada à fase orgânica. Esta solução lipofílica foi então vertida sobre uma fase aquosa contendo polissorbato 80 (0,077 g) e água (54 mL) com temperatura de 45°C. A acetona e o etanol foram removidos sob pressão reduzida e a suspensão foi concentrada até o volume final de 10 mL. Esta formulação foi denominada NC-Phl. De maneira semelhante, a mesma formulação sem o ativo foi denominada de NC-Br. Para avaliar o desempenho das nanocápsulas, uma solução aquosa de Phl dispersa em polissorbato 80 (0,077 g) foi preparada como controle e denominada Phl não encapsulado.

4.3.2 Caracterização de NC-Phl

As análises da distribuição do tamanho de partícula foram avaliadas por difração a laser (Mastersizer® 2000, Malvern Instruments, Reino Unido) a 25 °C. O tamanho médio de partícula, PDI e potencial zeta foram medidos em Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Para o teor, foi realizada extração das NC-Phl diluindo 100 µL da formulação em 10 mL de metanol. As soluções foram submetidas a ultrassom por 10 min e centrifugadas a 3600 rpm por 10 min e o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de tamanho de 0,45 µm e injetado em equipamento de HPLC conforme descrito no item 4.3.1 Para determinar a eficiência de encapsulação, foi utilizada a técnica de ultrafiltração-centrifugação (Ultrafree-

MC 10.000 MW, Milipore, Billerica, EUA). Após a centrifugação a 5000 rpm por 5 min, o teor e eficiência de encapsulação foram analisadas por HPLC conforme descrito no item 4.3.1. Foi realizada a análise de rastreamento de nanopartícula (NTA), esta análise é baseada no espalhamento de luz e movimento browniano. É uma técnica microscópica com iluminação a laser utilizada para visualizar e analisar partículas em dispersões líquidas. Primeiramente, a formulação de NC-Phl foi diluída 1000 vezes em água ultrapura e depois avaliada a 25 °C por 60 segundos com detecção automática (NanoSight LM 10 & NTA 2.2 Analytical Software, Nanosight Ltd., Amesbury, Reino Unido). Todas as análises descritas foram realizadas em triplicata.

A eficiência de encapsulação foi calculada como a diferença entre a concentração total e não encapsulada do fármaco segundo a equação.

$$\%EE = ((Ct-Cf))/Ct \times 100$$

Onde Ct é a concentração total de Phl na formulação e Cf é a concentração de Phl na fase aquosa da suspensão.

O pH foi medido com o auxílio de um potenciômetro (B474 Micronal) diretamente nas suspensões poliméricas.

4.6 Avaliação *in vitro* em cultura de células

Para avaliar a segurança da formulação NC-Phl, foram utilizadas linhagens celulares humanas de fibroblastos (MRC5) e queratinócitos (HaCaT). Além disso, os efeitos antitumorais da NC-Phl foram testados nas células de melanoma humano (linhagem celular SK-MEL-28). Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio (DMEM) de baixa glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina (100 U/mL) / estreptomicina (100 mg/mL) e mantidas a 37 ° C, 95% de umidade e 5% de CO₂ no ar.

4.6.1 Ensaio de brometo de 3- (4,5 dimetiltiazol-2-tiazil) -2,5-difenil-tetrazólio (MTT)

A citotoxicidade para as linhagens celulares das formulações foi determinada usando o ensaio MTT (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Aproximadamente 5 x 10³ células foram semeadas em placas de 96 poços e os seguintes tratamentos foram aplicados: Controle (meio de cultura apenas com dimetilsulfóxido (DMSO)); NC-Br (formulação de nanocápsulas sem *phloretin*); NC-Phl (formulação de nanocápsula contendo 10 µM de *phloretin*); e Phl (10 µM

de *phloretin* não encapsulada solubilizada em DMSO). Todas as formulações foram preparadas em condições assépticas.

Após os tempos de tratamentos 48h e 72h, a solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada às células e incubadas por 3 h a 37 ° C. Posteriormente os sobrenadantes foram retirados e os cristais foram solubilizados em DMSO (100 µL). A absorbância foi medida a 570nm em um espectrofotômetro EnVision 2103 (PerkinElmer®). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle, considerando como 100% de viabilidade.

4.6.2 Ensaio *Cumulative population doubling* (cPD)

Para avaliar os efeitos das NC-Phl na proliferação celular do melanoma, foi realizado o ensaio de cPD, o qual permite mensurar o índice de duplicação de uma dada população de células em um determinado período de tempo. Aproximadamente 2×10^4 células SK-MEL-28 foram semeadas em uma placa de 48 poços e tratadas por, 48 e 72 h. Os tratamentos foram removidos e as células foram lavadas com PBS e destacadas das placas. Um volume de 50 µL (aproximadamente 3.500 células) foram semeados novamente e as células restantes foram contadas em um citômetro de fluxo (Guava Technologies) para avaliar a concentração celular (primeira medição de proliferação). As células ressemeadas foram mantidas em meio de cultura fresco (sem tratamento) por 7 dias e depois destacadas e contadas novamente no citômetro de fluxo (segunda medição de proliferação). O índice da duplicação da população celular (PD) para o primeiro e o segundo intervalos de tempo foram determinadas a partir da fórmula $PD = [\log N (fn) - \log N (in)] / \log 2$, em que N (fn) é o número de células no momento da medição, e N (pol) é o número de células na medição anterior. A soma foi plotada em relação ao tempo de cultura (SILVA *et al.*, 2016).

4.6.3 Análise morfométrica nuclear (NMA)

Para avaliar os efeitos da NC-Phl na morfologia nuclear das células do melanoma, que é uma indicação de processos celulares como senescência e apoptose, foi utilizada a ferramenta de análise morfométrica nuclear, descrita por (FILIPPI-CHIELA *et al.*, 2012). Resumidamente, as células foram tratadas conforme descrito anteriormente por 48 e 72 h, fixadas com paraformaldeído a 4% (v/v em PBS) por 30 min em temperatura ambiente e coradas com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) 300 nM por 30 min. As imagens dos núcleos marcados com DAPI foram capturadas usando um microscópio Olympus BX-50 com lente ótica ($\times 10 / 0,30$ Ph1-UplanFI) acoplado a uma câmera Moticam 2500. A quantificação dos núcleos corados com

DAPI foi realizada usando o Software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Os dados foram apresentados como um gráfico de área *versus* índice de irregularidade nuclear.

4.8 Produção do hidrogel contendo NC-Phl

O hidrogel contendo nanocápsulas de Phl foi preparado com 0,25g Lecigel® por meio de uma mistura manual. Usou-se a quantidade de 25 mL de suspensão da NC-Phl para produzir o hidrogel contendo nanocápsulas de *Phloretin* (HG-NC-Phl). Também foi preparada o hidrogel da solução não encapsulada de Phl a qual foi solubilizado o Phl em polissorbato 80 em seguida 25 mL de água foi adicionado e ao final 0,25g do Lecigel® foi adicionando sob agitação até a obtenção de um gel (HG-Phl).

4.8.1 Caracterização de hidrogéis

Para medir o pH e o tamanho de partículas das formulações, os hidrogéis foram dissolvidos em água ultrapura (1:10, p/v). Os pHs foram avaliadas em potenciômetro (B474, Micronal), e o perfil granulométrico por difração de laser (Mastersizer 2000, Malvern). A análise reológica foi verificada através da viscosimetria rotatória (37 ° C, LVDV-II + Pro, fuso SC4-25, Brookfield, EUA) usando 25g do gel.

4.8.2 Análise morfológica dos hidrogéis

A análise morfológica do HG-NC-Phl e a forma livre do flavonoide HG-Phl foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (microscópio de varredura Jeol-JSM-5800) com ampliações de até 3.000 vezes e uma energia de 7 kV. O hidrogel preparado foi adicionado em uma quantidade de aproximadamente 20 mg no stab sob a fita de carbono deixadas em temperatura ambiente para secar por pelo menos 15 minutos em seguida foram metalizadas com ouro. As amostras foram preparadas 48 h antes da análise no microscópio. (JEOL Jee 4B SVG IN, Tóquio, Japão) (CHAVES *et al.*, 2018; HOFFMEISTER *et al.*, 2012).

4.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) e o teste t de Student, com $p < 0,05$ considerado para indicar o nível mínimo de significância. Os resultados foram expressos como média \pm DP.

5.0 Resultados e discussão

5.1 Validação de método analítico

Conforme preconizado na RDC 166 de 24 julho de 2017, os parâmetros necessários para a validação de um método analítico são seletividade, linearidade, exatidão e precisão. Nesse trabalho, os resultados dos parâmetros analisados mostraram-se adequados. O intervalo de linearidade de 0,5 a 15 $\mu\text{g/mL}$ apresentou um $R^2 = 0,999$ com uma equação da reta de $y = 78538x + 62,68$. O desvio padrão relativo (DPR) da precisão intra e inter dia foram de 1,67 e 2,39, respectivamente. O DPR da exatidão foi menor que 4,7% apresentando uma boa porcentagem de recuperação do fármaco (95,8% - 103,7%). O tempo médio de retenção do Phl foi de 8,3 min. Esses resultados estão de acordo com o estudo publicado por Wei e colaboradores (2017) onde a análise de Phl em cromatográfica líquida de alta eficiência mostrou-se adequada.

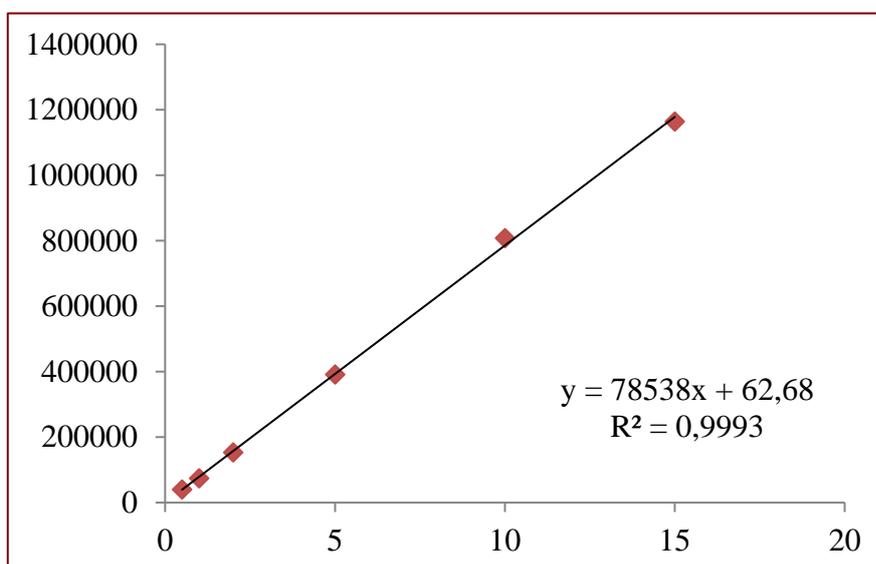


Figura 1: Linearidade e curva de calibração. Utilizando uma concentração da solução mãe de 50 $\mu\text{g/mL}$ com volume de injeção de 20 μL e comprimento de onda de 286 nm e um fluxo de 1 mL/min em HPLC-UV.

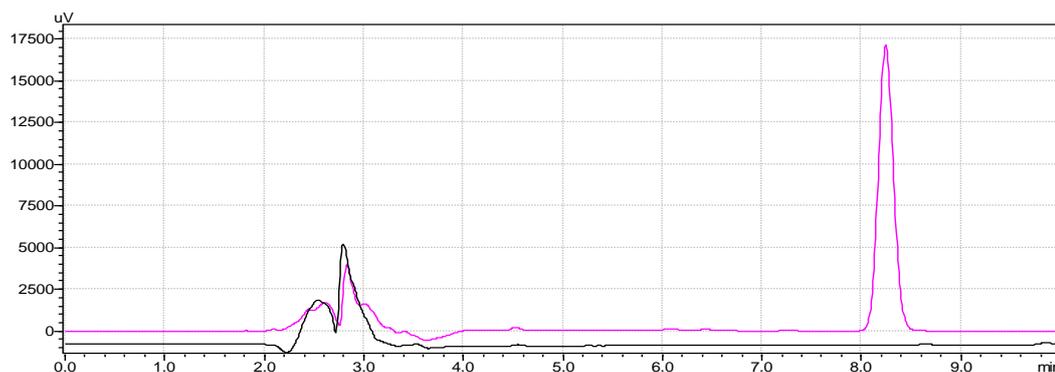


Figura 2: Especificidade do Phl. Utilizando 100 μL de NC-Br. Com volume de injeção de 20 μL e comprimento de onda de 286 nm e um fluxo de 1 mL/min em HPLC-UV

Tabela 1: Exatidão: 3 pontos da curva de calibração 0,7 $\mu\text{g/mL}$; 3,0 $\mu\text{g/mL}$ e 14 $\mu\text{g/mL}$ com volume de injeção de 20 μL e comprimento de onda de 286 nm e um fluxo de 1mL/min em HPLC-UV

$\mu\text{g/mL}$	1	2	3	Média	DP	DPR
0,7	90,613	99,251	97,508	95,791	4,568	4,769
3	104,077	101,885	105,170	103,711	1,673	1,613
14	102,999	104,148	103,836	103,661	0,594	0,573

5.2 Avaliação da qualidade de NC-Phl

NC-Phl foram obtidas pelo método de nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1989). Esse método já vem sendo extensamente desenvolvido no nosso grupo de pesquisa por ser um método fácil, reprodutível e considerado rápido (FRANK *et al.*, 2017). O tipo de partícula formada (nanocápsulas poliméricas) apresenta capacidade de encapsulamento que varia de acordo com as características físico-químicas de cada fármaco (RAFFIN R.P *et al.*, 2003). Nesse trabalho, a maior concentração incorporada às nanocápsulas poliméricas com máxima eficiência de encapsulação foi de 0,2 mg/mL de Phl de acordo com estudos de pré-formulação.

Um dos aspectos importantes a serem analisados em uma formulação nanotecnológica são suas características relacionadas ao seu tamanho, forma, dimensões, potencial zeta, densidade, teor e liberação do fármaco (FARIA *et al.*, 2018). Todas essas características afetam na sua reprodutibilidade impactando na comparação com outras pesquisas na área de nanotecnologia (FARIA *et al.*, 2018). Neste trabalho, NC-Phl foi avaliada por diferentes técnicas, todas

complementares entre si. Deste modo, foi realizado a análise do tamanho das partículas por difração a laser que demonstrou uma distribuição nanométrica, um diâmetro médio ($D [4,3]$) de $207,53 \pm 3,85$ nm (NC-Phl) e $206,3 \pm 7,29$ nm (NC), apresentando distribuição monomodal de tamanhos sem a presença de micropartículas. O valor de SPAN para NC-Phl foi de $1,75 \pm 0,04$. Os valores de SPAN menores que 2 indicam uma formulação com distribuição de tamanho estreita, adequada para aplicações farmacêuticas (BIANCHIN *et al.*, 2015).

As características físico-químicas das suspensões são apresentadas na Tabela 2 e mostraram uma distribuição de tamanho estreita por espalhamento de luz dinâmico, com um diâmetro de partícula e PDI semelhantes. Para ambas as formulações, o potencial zeta foi negativo e próximos de zero, devido à presença do monoestearato de sorbitano (span 60), um polímero não iônico na interface partícula / água e do surfactante polissorbato 80 solúvel em água (JÄGER *et al.*, 2009). A análise de cada videoclipe pelo software NTA 2.0 Build 127 (NanoSight) permitiu a medição da densidade de partículas e distribuição de tamanhos. Com essa técnica é possível identificar e rastrear cada nanopartícula que segue o padrão de movimento browniano. A partir disso, os resultados corroboram com as medidas de tamanho de partícula obtidas pelas diferentes técnicas utilizadas nesse trabalho, comprovando que partículas nanométricas foram produzidas. Sendo assim, foi possível verificar que foram produzidas partículas com medidas de tamanho nanométricas pelas diferentes técnicas utilizadas.

O valor do pH de todas as formulações apresentou-se levemente ácido, o que favorece a aplicação cutânea. O papel do estrato córneo como barreira de permeabilidade depende de seu caráter hidrofóbico, a formação da barreira estrato córneo, envolve várias enzimas dependentes do pH. Duas enzimas-chaves estão presentes, β -glucocerebrosidase e esfingomielinase ácida que apresentam o pH ótimo entre 5,6 e 4,5, respectivamente, ambos envolvidos na síntese de ceramidas, importante na permeabilidade na barreira da pele, (ALI; YOSIPOVITCH, 2013). Esses fatos mostram a importância da avaliação e da produção de partículas com pH ácido. E ressaltando o resultado do pH obtido por nossas formulações.

Para NC-Phl, o teor do fármaco foi próximo ao valor teórico (0,2 mg/mL) e a eficiência de encapsulação foi maior que 99%. O encapsulamento de Phl já foi proposto por Lee e Cho (2016) e os autores produziram uma formulação de nanopartículas usando o poliéster poli (ácido láctico-co-glicólico) contendo 1,33 mg/mL de Phl. Essa nanopartícula apresentou um tamanho semelhante (237 nm) ao trabalho proposto, porém apresentou uma eficiência de encapsulação de apenas 50%, indicando que, embora eles tivessem usado uma quantidade superior de Phl,

metade desse não estava encapsulado (LEE e CHO, 2016). Além disso, o trabalho proposto foi o primeiro a encapsular uma quantidade inferior de Phl já descrita na literatura.

No presente trabalho, o polímero PCL foi escolhido devido a inúmeros estudos que demonstraram sua biocompatibilidade fisiológica e ausência de efeitos toxicológicos. O uso da PCL para sistemas de entrega tem outras vantagens, como excelente capacidade de carga de fármaco, taxa de liberação controlável, e degradação lenta em relação ao ácido poliglicólico e outros polímeros (SINHA *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2017).

Tabela 2: Características físico-químicas de NC-Phl e NC-B (médias \pm DP, n = 3).

Formulação	LNC-Phl	NC-Br
Tamanho de partícula (nm) ¹	207.53 \pm 3.85	206.3 \pm 7.29
SPAN 60	1,282	1.446
Tamanho de Partícula (nm) ²	203.84 \pm 7.38	206.82 \pm 6.10
Densidade ³ (partículas/mL)	(1.74 \pm 0.26) \times 10 ¹²	(1.53 \pm 0.22) \times 10 ¹²
PDI ¹	0.10 \pm 0.00	0.13 \pm 0.03
Potencial zeta (mV) ²	-8.78 \pm 0.33	-10.09 \pm 1.5
pH	5.77 \pm 0.03	5.57 \pm 0.18
Conteúdo do fármaco ⁴ (mg/mL)	0.2 \pm 0.002	N/A
Eficiência de encapsulação ⁴ %	>99%	N/A

Determinação por meio de análise de espalhamento de luz adinâmica¹, mobilidade eletroforética², análise de rastreamento de nanopartículas³ e HPLC-UV⁴; N / A: não se aplica.

A partir desses resultados, foi possível verificar que nanocápsulas poliméricas produzidas com um polímero biodegradável contendo Phl em seu núcleo apresentaram tamanho adequado e alta eficiência de encapsulação.

5.3 Efeitos citotóxicos de NC-Phl em cultura de células

Sendo um dos objetivos principais deste estudo, o desenvolvimento de uma formulação nanotecnológica contendo Phl visando sua aplicação tópica para diferentes fins, avaliamos o efeito de NC-Phl em linhagem celular de fibroblastos (MRC5). Primeiramente foi testado um intervalo a curto prazo (8h), para verificar a segurança das suspensões pensando em uso cosmecêutico. NC-Phl mostrou um perfil seguro sem toxicidade significativa para o Phl (10 μ M) (Figura 3A). Adicionalmente, NC-Phl em uma concentração de (20 μ M) também foi testado em queratinócitos (Figura 3B), outro tipo de célula que está presente na epiderme afim de avaliar a toxicidade nessa concentração para determinar a dose que seria escolhida. NC-Br e NC-Phl não apresentaram redução na viabilidade celular (NC-Br e NC-Phl) ($p > 0,05$).

A avaliação da segurança dos nanossistemas é uma etapa importante pois isso corrobora com os benefícios que esse tipo de sistema pode promover no campo da pesquisa tornando importante o seu estudo (WEISS-ANGELI *et al.*, 2008; KÜLKAMP *et al.*, 2012 FRANK *et al.*, 2015; VENTURINI *et al.*, 2015;). As nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) têm se mostrado seguras em estudos que avaliaram a citotoxicidade em células como em queratinócitos humanos, fibroblastos e eritrócitos (VENTURINI *et al.*, 2015). Bender e colaboradores (2012) também avaliaram nanocápsulas poliméricas com polissorbato 80 e lecitina revestida ou não com quitosana mostrando-se seguras na atividade hemolítica (BENDER *et al.*, 2012). E nanocápsulas poliméricas com óleo de copaíba não induziram alterações significativas na proliferação da linhagem celular HaCaT em comparação com o grupo não tratado (VENTURINI *et al.*, 2015). Assim a produção de nanocápsulas com o polímero poli (ϵ -caprolactona) é considerado seguro devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (ALVAREZ *et al.*, 2001; POHLMANN *et al.*, 2013).

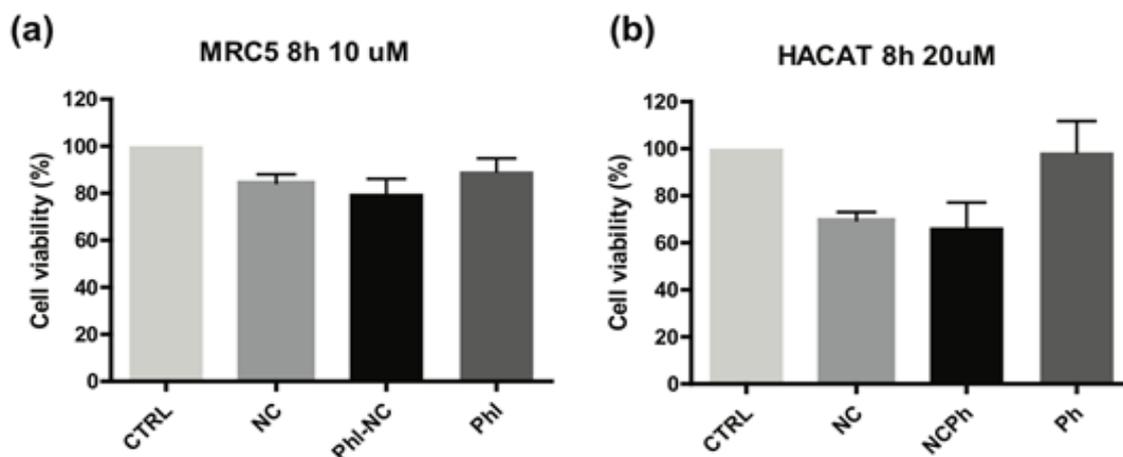


Figura 3: Análise de viabilidade celular para linhas celulares (a) MRC5 e (b) HaCaT após tratamento nas condições indicadas. CTRL - controle não tratado; NC - nanocápsulas sem *phloretin*; NC-Phl - nanocápsulas carregadas com *phloretin*; Phl - *phloretin* não encapsulado. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $p < 0,05$ ($n = 3$).

Existem estudos na literatura sobre as atividades antitumorais do Phl contra diferentes tipos de tumor, como câncer gástrico (IC₅₀, 8 μM) (XU *et al.*, 2018), câncer de mama (10-150 μM , por 24 h); câncer de pulmão (células A549) (25, 50 ou 75 $\mu\text{g} / \text{mL}$) (MIN *et al.*, 2015), câncer de esôfago (60 $\mu\text{g} / \text{mL}$) (DUAN *et al.*, 2017) e câncer de próstata (PC3 e células DU145; 20, 50 e 100 μM , por 24 h) (KIM *et al.*, 2020). Dessa maneira, no presente trabalho, propusemos também a avaliação da atividade antitumoral em melanoma testando seus efeitos na linhagem tumoral SK-MEL-28 na concentração de 10 μM de NC-Phl, representando uma das doses mais baixa já descritas na literatura.

A mesma concentração usada para os fibroblastos foi aplicada (10 μM), porém em tempos de tratamento mais longos foram testados (48 e 72 h), uma vez que os efeitos a longo prazo são geralmente desejados nas abordagens terapêuticas contra o câncer. Na atividade citotóxica foi observada uma redução leve (aproximadamente 20%), porém robusta na viabilidade das células do melanoma, detectada em 48 h de tratamento ($p < 0,001$) (Figura 4A), o que não foi observada nem para NC-Br nem para o fármaco não encapsulado. Curiosamente, quando avaliamos as taxas de proliferação, um aumento no tempo de duplicação da população (indicando uma menor taxa de proliferação) foi observado após o tratamento com NC-Phl, quando as células foram tratadas por 72 h, que então continuou por 7 dias após a remoção do tratamento ($p < 0,05$) (Figura 4B).

Afim de avaliarmos o processo que poderia estar envolvido na parada de proliferação celular foi realizada uma análise morfométrica dos núcleos. Núcleos grandes são uma das características das células senescentes, que não se duplicam e isso pode estar relacionado à redução nas taxas de proliferação. Nesse sentido, essa análise revelou um aumento na porcentagem de núcleos grandes após 72 h de tratamento com NC-Phl (~ 12%, $p < 0,0001$) (Figura 4C).

Trabalhos anteriores já observaram os efeitos de nanopartículas revestidas com quitosana contendo Phl (CS-PLGA/Phl) em células de melanoma de camundongo (B16F10) com padrão de crescimento em monocamada (LEE *et al.*, 2019). As células B16F10 foram tratadas com Phl nas concentrações de 1, 10, 25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$ e incubadas por 72h e observou-se uma diminuição na viabilidade celular em concentrações maiores (75 $\mu\text{g/mL}$). Quando o estudo *in vivo* foi conduzido em modelo de camundongo com melanoma, o grupo CS – PLGA / Phl exibiu peso pulmonar e número de focos metastáticos significativamente mais baixos do que grupos com metástase tratados com Phl não encapsulado e até mesmo Phl nanoencapsulada sem quitosana (o PLGA / Phl). O peso pulmonar do grupo (metástase + CS – PLGA / Phl) foi 46% do grupo com metástase, mostrando um alto potencial da produção de nanopartículas contendo Phl.

Ainda, outros estudos usaram Phl em sua forma não encapsulada em concentrações de até 200 μM (ABKIN *et al.*, 2016), mostrando seu efeito antitumoral em células B16 incubadas com concentrações de 100 e 200 μM por 72 h, com inibição do crescimento celular de aproximadamente duas e três vezes, respectivamente. Em oposição, tratamentos com concentrações de 20 ou 50 μM , resultam em menos de 2% de inibição do crescimento celular. Isso revela que o Phl em concentrações mais baixas, apresenta um efeito inferior quando comparado a concentrações maiores.

Em outro estudo, 150 μM de Phl induziu apoptose em aproximadamente 95% das células de melanoma de camundongo B16 4A5 após 24 h (KOBORI *et al.*, 1997). Isso mostra que, possivelmente para induzir apoptose, em níveis significativos, o Phl deve estar em concentrações superiores a 100 μM .

Os resultados apresentados no nosso estudo mostram que quando são utilizadas nanocápsulas contendo Phl, ainda que, em concentrações mais baixas de fármaco (10 μM), é possível observar eficácia superior ao Phl na sua forma não encapsulada e em altas concentrações, como mencionado nos demais estudos citados, sugerindo a superioridade das suspensões de nanocápsulas.

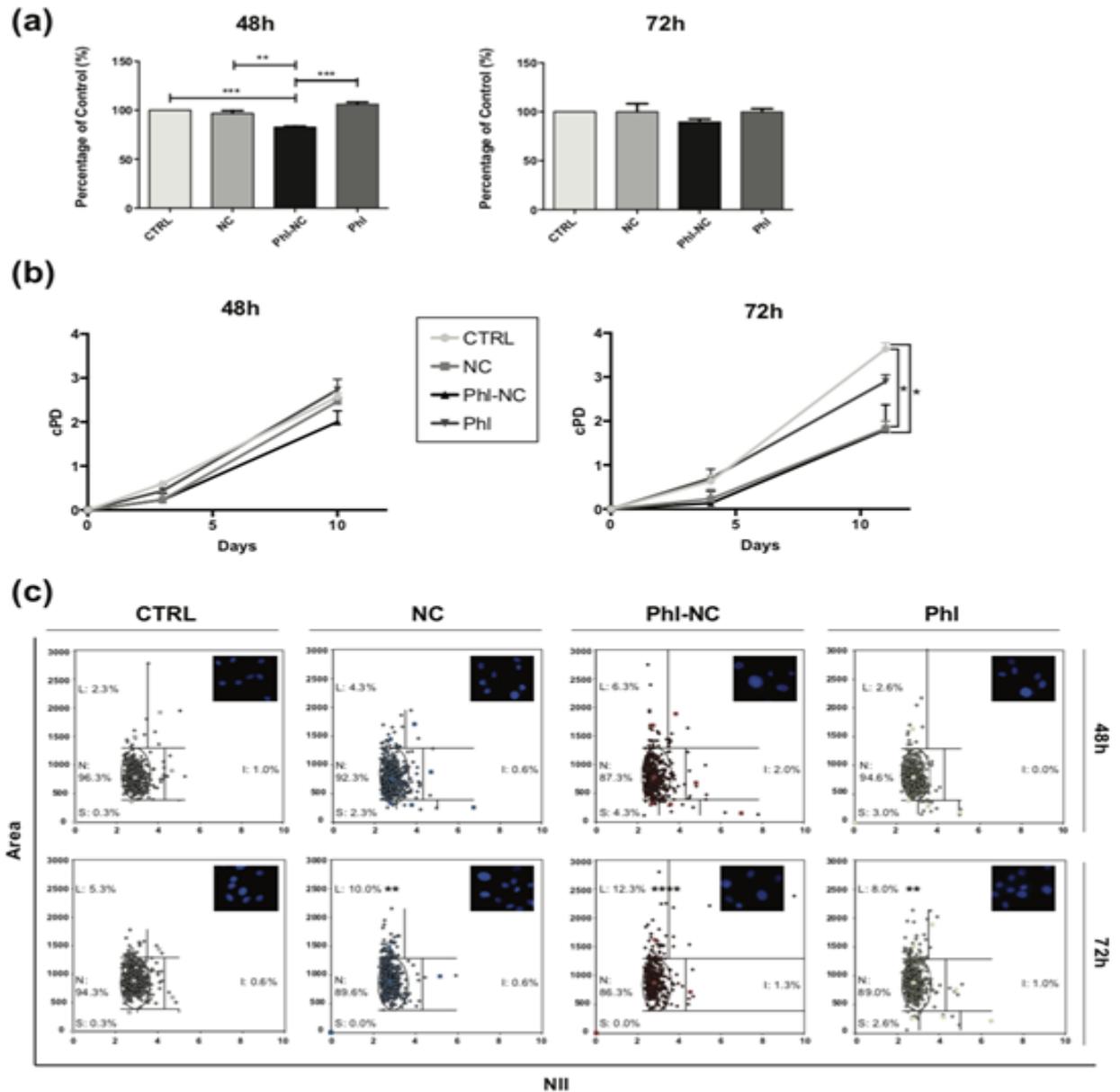


Figura 4: Efeitos de NC-Phl em células de melanoma SK-MEL-28 (a) Viabilidade celular medida pelo ensaio MTT em 48 e 72 h de tratamento nas condições indicadas. (b) Proliferação celular ao longo do tempo em cultura medida pelo ensaio de cPD (*cumulative population doubling*). (c) Análise morfométrica nuclear realizada após 48 e 72 horas de tratamento nas condições indicadas. L (núcleos grandes); N (núcleos normais); I (núcleos irregulares); S (pequenos núcleos). As significâncias estatísticas estão relacionadas ao grupo CTRL, a menos que especificado de outra forma. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Todos os experimentos com n de 3.

Nesses resultados experimentos realizados indicaram que o NC-Phl demonstra segurança para as células de fibroblasto e queratinócitos (MRC5 e HaCaT), e apresenta efeito citotóxico e antiproliferativo em células de melanoma (SK-MEL-28). Juntamente com as características físico-químicas favoráveis de NC-Phl e do HG-NC-Phl, esses dados reforçam a adequação da formulação nanotecnológica desenvolvida de Phl para aplicação em melanoma.

5.4 Hidrogel: características físico-químicas e reologia

Como as NC-Phl são destinadas à aplicação tópica, o desenvolvimento de uma formulação semissólida com viscosidade aumentada é necessário para evitar perdas do produto e permitir aplicação efetiva na superfície da pele.

Um polímero inovador, Lecigel®, foi escolhido para produzir um hidrogel contendo NC-Phl. Este polímero é um agente gelificante com propriedades emulsificantes, composto por copolímero de acrilato de sódio e lecitina. Segundo seu produtor (LUCAS MEYER, FRANÇA), essa combinação resulta em um aumento da viscosidade que aumenta a estabilidade da formulação. Outras vantagens incluem o potencial para processamento a frio e quente, compatibilidade com a maioria dos emulsificantes, estabilidade em uma ampla faixa de valores de pH e o fornecimento de uma sensação de pele macia e não oleosa. Quando usado como um agente gelificante para géis aquosos ou emulsionante para cremes em gel, a concentração está geralmente entre 0,5% e 4%.

Nesse trabalho, as NC-Phl foram incorporadas diretamente no polímero Lecigel® (1%) e homogeneizadas diretamente na suspensão da nanocápsulas poliméricas. Dessa forma, se obteve um gel com características opaca e de coloração branca.

A avaliação físico-química das formulações semissólidas HG-NC-Phl e HG-Phl mostraram valores de pHs ($6,73 \pm 0,04$ e $7,20 \pm 0,10$) e teor de fármaco semelhantes ($0,2 \pm 0,018$ e $0,2 \pm 0,007$) respectivamente. Perfis granulométricos, avaliados por difração de laser, são mostrados na Figura 5. É possível observar que a população nanométrica foi mantida no hidrogel composto por NC-Phl. É importante ressaltar, também, que há uma população micrométrica proveniente das partículas do polímero Lecigel®, que pode ser verificado em ambos os hidrogéis produzidos.

Os hidrogéis exibiram um perfil pseudoplástico não newtoniano, pois os valores de viscosidade não foram constantes durante o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 5). Além disso, o índice de fluxo estava abaixo de 1, e a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento, recuperando gradualmente quando o cisalhamento era removido. Isso é

importante para uma formulação dermatológica pois a diminuição da viscosidade na aplicação permite uma cobertura adequada da pele, e a recuperação da viscosidade permite que o produto permaneça na pele (HUANG, 2019). O modelo Herschel-Bulkley descreveu os resultados para ambas as formulações (Tabela 3). Independentemente da presença de nanocápsulas, os índices de consistência e o índice de fluxo apresentaram valores com resultados próximos.

Tabela 3: Índice de consistência, índice de fluxo e confiança de ajuste de formulações de hidrogel (médias \pm DP, n = 3).

Formulação	Índice de consistência (CP)	Índice de fluxo	Confiança de ajuste
HG-Phl-NC	21863 \pm 1839	0.36 \pm 0.02	100
HG-Phl	18758 \pm 3128	0.39 \pm 0.03	100

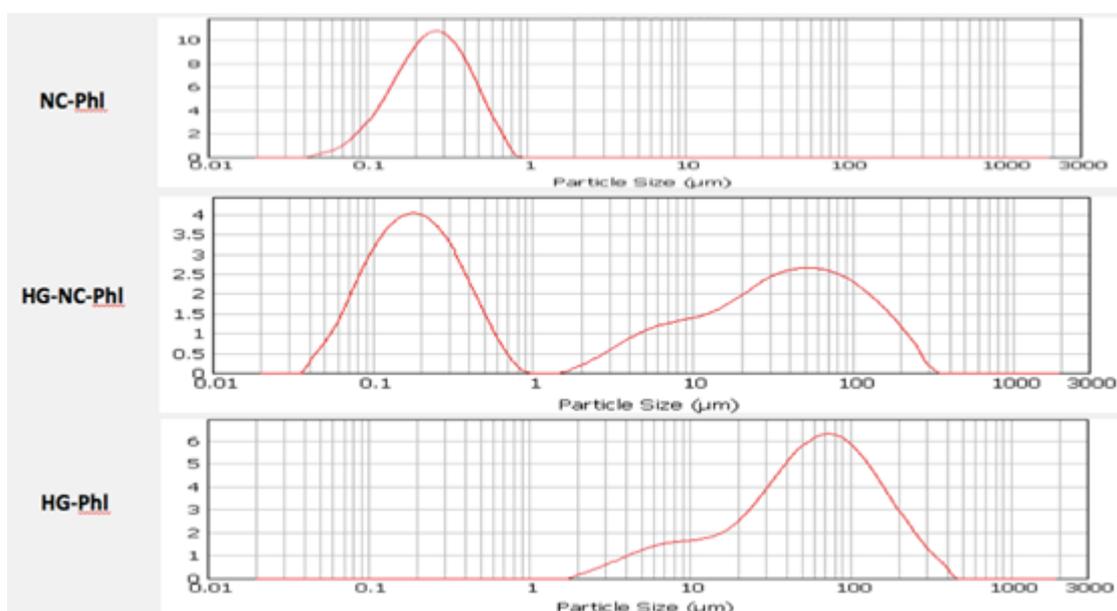


Figura 5: Perfil de distribuição de tamanho de partícula de NC-Phl (nanocápsulas poliméricas com *phloretin*) HG-NC-Phl (formulação semissólida de NC-Phl) e HG-Phl (formulação semissólida de NC-Phl).

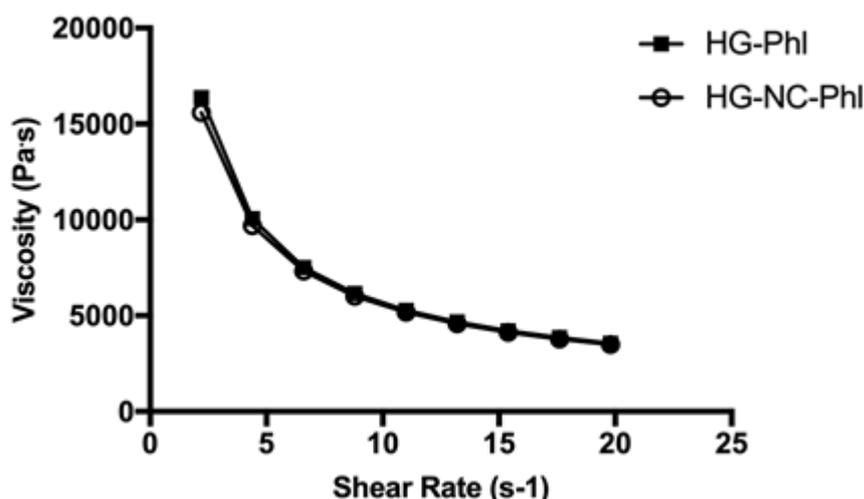


Figura 6: Viscosidade *versus* taxa de cisalhamento de hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas carregadas com Phl (HG-NC-Phl) e de hidrogéis contendo Phl não encapsulado (HG-Phl).

5.5 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície das amostras foi analisada por microscopia eletrônica de varredura, conforme mostrado na Figura 7. Fotografias dos hidrogéis de HG-Phl e HG-NC-Phl revelaram estruturas diferentes (Figuras 7A e 7B). Verificou-se que os aglomerados de nanocápsulas poliméricas na formulação HG-NC-Phl (Figura 7A), indicando a presença de nanopartículas, provenientes da formulação NC-Phl. Além disso, verifica-se que essas nanopartículas estão distribuídas homogeneamente por todo o hidrogel. Por outro lado, na Figura 7B, observa-se cristais de Phl de tamanho micrométrico e distribuição heterogênea no hidrogel. Essas análises morfológicas corroboraram com os resultados avaliados pela técnica de difração a laser (Figura 5), em que HG-Phl mostrou conter micropartículas e HG-NC-Phl mostrou conter nanopartículas e micropartículas. A presença de nanocápsulas poliméricas em veículos semissólidos já foi verificado anteriormente por diferentes autores (CONTRI et al., 2014; GAZZI et al., 2020) conforme descrito por Gazzi e colaboradores (2020).

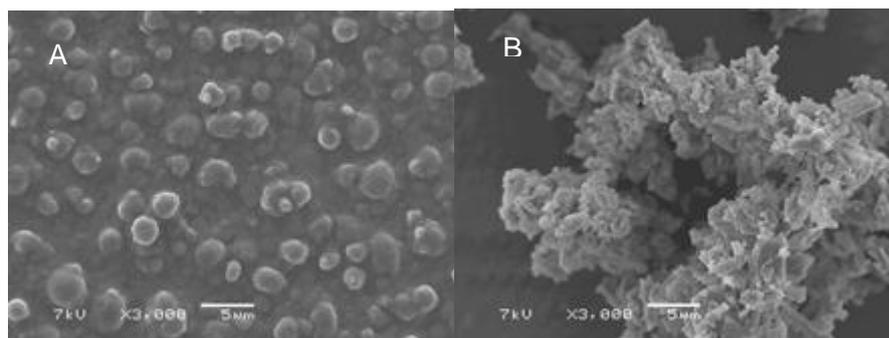


Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (x3000) de HG-NC-Phl (A) e HG-Phl (B).

6.0 Conclusão

Foi possível validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com todos os parâmetros analíticos adequados conforme a legislação vigente. Nesse trabalho, desenvolvemos, pela primeira vez, a encapsulação de Phl em nanocápsulas poliméricas, e a concentração encapsulada obtida foi a menor concentração descrita na literatura e com alta eficiência de encapsulação. NC-Phl apresentaram características físico-químicas adequadas em termos de tamanho e distribuição homogênea podendo ser consideradas formulações com características nanotecnológicas apropriadas. Os estudos *in vitro* em fibroblastos humanos (MRC5), queratinócitos (HaCaT) e células de melanoma (SK-Mel-28) mostraram que NC-Phl podem ser consideradas seguras e apresentam atividade antitumoral. O HG-NC-Phl, após os parâmetros avaliados apresentou-se adequado com possibilidade de aplicação cosmecêutica e terapia do melanoma. Este trabalho valida a adequação do veículo de entrega e fornece uma plataforma para estabelecer uma abordagem dermatológica versátil.

Referências:

- ABKIN, S V. *et al.* Phloretin increases the anti-tumor efficacy of intratumorally delivered heat-shock protein 70 kDa (HSP70) in a murine model of melanoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 83–92, 2016
- ALI, S. M.; YOSIPOVITCH, G. Skin pH: From basic science to basic skin care. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 93, n. 3, p. 261–267, 2013
- ANDRADE, F. M.; JUDICE, L. F. **Comunicação breve**. V. 36, n. 5, p. 617–620, 2010.
- ALVAREZ, R.R. *et al.* Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], 2001.
- BENDER, E. A. *et al.* Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], 2012
- BIANCHIN, M. D., *et al.* Radar charts based on particle sizing as an approach to establish the fingerprints of polymeric nanoparticles in aqueous formulations. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], 2015.
- BILATI, U. *et al.* Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 24, n. 1, p. 67–75, 2005.
- CALLAHAN, M. K., *et al.* Immunomodulatory therapy for melanoma: ipilimumab and beyond. **Clinics in dermatology**, v. 31, n. 2, p. 191–199, 2013.
- CAMARA, M. E. L. ANALISE DA UTILIZAÇÃO DA VITAMINA C EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS NO COMBATE AOS RADICAIS LIVRES. [s.l.] Pernambuco, 2019.
- CASSARINI, T..P.A *et al.* Aplicações dermatológicas do flavonoide Phloretin. *European Journal of Pharmacology* Disponível online 21 de setembro de 2020.
- CHAVES, P.D.S., *et al.* Mucoadhesive properties of eudragits100, eudragits100, and poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules: influence of the vehicle and the mucosal surface. **Aaps pharmscitech**, v.19, n.4, p.1637-1646, 2018.
- CONTRI, R.V. *et al.* structural analysis of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules. **Materials science and engineering c: materials for biological applications**, v.42, p.234-42, 2014.
- CONTRI, R.V. *et al.* Nanoencapsulation of Rose-Hip Oil Prevents Oil Oxidation and Allows Obtainment of Gel and Film Topical Formulations, *AAPS PharmSciTech*.17 (2016) 863–871.
- CONTRI, R.V. *et al.* Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: An innovative formulation for topical delivery, *Soft Materials*. (2010).
- CARDOSO, A. M. *et al.* Chitosan hydrogels containing nanoencapsulated phenytoin for cutaneous use: skin permeation/penetration and efficacy in wound healing. **Materials science and engineering c**, v. 96, n. November 2018, p. 205–217, 2019.
- DAS, B. *et al.* Topical gels of lidocaine hcl using cashew gum and carbopol 940: preparation and in vitro skin permeation. **International journal of biological macromolecules**, v. 62, p. 514–517, 2013.
- DETONI, C.B. *et al.* photostability and skin penetration of different e-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochemistry photobiology**, v.88, n.4, p.913-921, 2012.
- DE OLIVEIRA MR. Phloretin-induced cytoprotective effects on mammalian cells: a mechanistic view and future directions. *Biofactors*, v.42, n.1, p.13-40, 2016.

- DUAN, H. *et al.* Phloretin induces apoptosis of human esophageal cancer via a mitochondria-dependent pathway. **Oncology letters**, V.14, n.6, p.6763–6768, 2017.
- EBERHARDT LEE, C.Y.; LIU, R.H. antioxidant activity of fresh apples. **Nature**, n.405, p.903–904, 2000.
- FARIA, M. *et al.* Minimum information reporting in bio–nano experimental literature. **Nature Nanotechnology**, v. 13, n. 9, p. 777–785, 2018.
- FESSI, H. *et al.* Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International journal of pharmaceutics**, v.113, p. R1-r4, 1989.
- FILIPPI, C. *et al.* Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. **PLoS ONE**, [S. l.], 2012
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Liposome Drug Products - Guidance for Industry. **Pharmaceutical Quality**, v. Revision 1, n. October, p. 1–13, 2015.
- FRANK, L.A. *et al.* the use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v.114, p.202–212, 2017.
- FRANK, L. A. *et al.* Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 623–639, 2015.
- GARBE, C. *et al.* A. European dermatology forum (edf); european association of dermato-oncology (eado); european organisation for research and treatment of cancer (eortc). Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - update 2016. **European journal of cancer**, v.63, p.201-17, 2016.
- GAZZI, R.P. *et al.* New pectin-based hydrogel containing imiquimod-loaded polymeric nanocapsules for melanoma treatment. **Drug Delivery and Translational Research**, 2020.
- HUANG, N. Rheological Characterization of Pharmaceutical and Cosmetic Formulations for Cutaneous Applications. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], 2019.
- HOFFMEISTER, C. R. D. *et al.* Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale research letters**, [s. L.], 2012.
- Instituto nacional do câncer (Inca). Disponível em <www.inca.org.br> acessado em junho 2020.
- JÄGER, E. *et al.* Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 130–140, 2009.
- KIM, M.S. *et al.* Phloretin induces apoptosis in h-ras mcf10a human breast tumor cells through the activation of p53 via jnk and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. **Annals of the new york academy of sciences**, v.1171, p.479-83. 2009.
- KOBORI, M. *et al.* Phloretin-induced apoptosis in B 16 melanoma 4A5 cells by inhibition of glucose transmembrane transport, **Cancer Letters**, 1997.
- KÜLKAMP, I. C. G. *et al.* Development and stability of innovative semisolid formulations containing nanoencapsulated lipolic acid for topical use. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [S. l.], 2012.
- KUM, H. *et al.* Evaluation of anti-acne properties of phloretin *in vitro* and *in vivo*. **International journal of cosmetic science**, v.38, n.1, p.85-92, 2016.
- LEU, S.J. *et al.* phenolic constituents of *malus doumeri* var. *Formosana* in the field of skin care. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v.29, n.4, p.740-5, 2006.

- LI, B. *et al.* W. Solubilities of phloretin in 12 solvents at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 56, n. 4, p. 1459–1462, 2011.
- LIN YP. *et al.* Constituents from the formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. **Phytochemistry**, v.68, n.8, p.1189-99, 2007.
- LEE, Song Yi; CHO, Hyun Jong. Amine-functionalized poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for improved cellular uptake and tumor penetration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 148, p. 85–94, 2016.
- LEE, C.H. *et al.* molecular mechanisms of uv-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: the implication in uv-based phototherapy. **International journal of molecular sciences**, v.14, n.3, p.6414–6435, 2013.
- LEE, Y. J. *et al.* Flavonoid morin inhibits proliferation and induces apoptosis of melanoma cells by regulating reactive oxygen species, Sp1 and Mcl-1. **Archives of Pharmacal Research**, [S. l.], 2019.
- LIU-SMITH, F. *et al.* -induced molecular signaling differences in melanoma and non-melanoma skin cancer. **Advances in experimental medicine and biology**, v.996, p.27-40, 2017.
- LUCAS MAYER COSMETICOS disponível em: < <https://www.lucasmeyercosmetics.com> > acessado em 04 de setembro de 2020.
- MARQUES, I.R.; Novos sistemas terapêuticos nanotecnológicos; Universidade Fernando Pessoa; Faculdade de ciências da saúde, 2009.
- MARTINS, P.S; O sistema de normas ISSO e as nanotecnologias: As interfaces regulatórias e o diálogo entre as fontes do direito; **Faculdade Unisinos; São Leopoldo**, 2016
- MASSI, D. *et al.* Dedifferentiated melanomas: morpho-phenotypic profile, genetic reprogramming and clinical implications. **Cancer treatment reviews**, v. 88, n. April, p. 102060, 2020.
- MISHRA, H. *et al.* Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of cancer research and clinical oncology**, 2018.
- MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. **Nature**, basingstok, v. 445, n. 7130, p. 874–880, 2007.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - a review. **Tropical journal of pharmaceutical research**, v. 5, n. 1, p. 561–573, 2007.
- MARIADOSS, A.V. *et al.* Nanopartículas de quitosana carregadas com floretina aumentam a apoptose intrínseca mediada por mitocôndria dependente de pH em células de câncer oral humano Int. **J. Biol. Macromol.** , 130 (2019) , pp. 997 - 1008
- MATHES, C. *et al.* Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects. **Journal of controlled release**, v. 223, p. 207–214, 2016.
- MIN, Jie *et al.* Phloretin induces apoptosis of non-small cell lung carcinoma A549 cells via JNK1/2 and p38 MAPK pathways. **Oncology Reports**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 2871–2879, 2015.
- NAM. S. *et al.* Nanofibras de rápida dissolução carregadas com phloretin para a terapia local regional do carcinoma de células escamosas oral **J. Colloid Interface Sci.**, 508 (2017) , pp. 112 - 120
- NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti- inflammatory, antioxidant and dna repair mechanisms. **Archives of dermatological research**, alemanha, v. 302, n. 2, p. 71-83, 2010.
- NG, C.Y. *et al.* phytochemicals in skin cancer prevention and treatment: an updated review. **International journal of molecular sciences**, v.19, n.4, 2018.

ORESANO, C. *et al.* Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin c, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin. **Journal of cosmetic dermatology**, v.7, n.4, p.290-7, 2008.

Payne, J.N. *et al.* Desenvolvimento de nanopartículas de ouro funcionalizadas com dihidrocalcona para aumento da atividade antineoplásica **Int. J. Nanomed.** , 13 (2018) , pp. 1917 - 1926

PARK S.Y. *et al.* Induction of apoptosis in ht-29 colon cancer cells by phloretin. **Journal of medicinal food**. V.10, n.4, p.581-6, 2007.

POHLMANN, A.R *et al.* **Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery.** [S. l.: s. n.]

QIN, X. *et al.* Dihydrochalcone compounds isolated from crabapple leaves showed anticancer effects on human cancer cell lines. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21193–21203, 2015.

RAFFIN, R. P. *et al.* Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: Estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 163–172, 2003.

SANCHES, M. M. *et al.* J. P. Artigo de Revisão Genes e Melanoma Artigo de Revisão. v. 75, n. Abril, p. 231–238, 2017.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, [s. l.], 2003.

SARHEED, O. *et al.* Formation of stable nanoemulsions by ultrasound-assisted two-step emulsification process for topical drug delivery: effect of oil phase composition and surfactant concentration and loratadine as ripening inhibitor. **International journal of pharmaceutics**, v. 576, n. November 2019, p. 118952, 2020.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International journal of pharmaceutics**, v.289, p.209-213, 2005.

SHIN, S. *et al.* Protective effects of a new phloretin derivative against uvb-induced damage in skin cell model and human volunteers. **International journal of molecular sciences**, v.15, n.10, p.18919-40, 2014.

SILVA, A. O. *et al.* A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. **Tumor Biology**, [S. l.], 2016

SINHA, V. R. *et al.* **Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview.** [S. l.: s. n.]

SUN, Z. *et al.* Recent Advances in Application of Poly-Epsilon-Caprolactone and its Derivative Copolymers for Controlled Release of Anti-Tumor Drugs. **Current Cancer Drug Targets**, [S. l.], 2017

VENTURINI, C. G. *et al.* Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: Promising formulations against skin carcinoma. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], 2015.

VEÍCULOS FUNCIONAIS DERMOCOSMÉTICOS **biotecdermo** <https://www.biotecdermo.com.br/wp-content/uploads/2019/01/veiculos_funcionais.pdf> acessado em 27 de julho de 2020.

WANG, L. *et al.* Synthesis, crystal structure, and biological evaluation of a series of phloretin derivatives. **Molecules**, n.19, p.16447-16457, 2014.

WU. C.H. *et al.* *In vitro* and *in vivo* study of phloretin-induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter. **International journal of cancer**, v.124, n.9, p.2210-9, 2009.

WEISS-ANGELI, V. *et al.* nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet a radiation. **Journal of biomedical nanotechnology**, v.4, n.1, 2008.

WEI, Y. *et al.* Molecular model and in vitro antioxidant activity of a water-soluble and stable phloretin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of molecular liquids**, [s. L.], v. 236, p. 68–75, 2017.

XU, M. *et al.* Anticancer activity of phloretin against human gastric cancer cell lines involves apoptosis, cell cycle arrest, and inhibition of cell invasion and jnk signalling pathway. **Medical science monitor**, v.24, p.6551-6558, 2018.

YINGNGAM, B. *et al.* Optimization of menthol-loaded nanocapsules for skin application using the response surface methodology. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 53, n. June, p. 101138, 2019.