

UFG/UFRGS/UFSC/USP-RP/UNESP-Ar/UFOP/UFMG/UFRN/UFPE
FACULDADE DE FARMÁCIA - UFRGS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Dispersão de agregados de C₆₀-PVP: caracterização físico-química e estudos de absorção dérmica e status oxidativo sob a influência de radiação ultravioleta A

GABRIELE DADALT SOUTO

PORTO ALEGRE, 2014

UFG/UFRGS/UFSC/USP-RP/UNESP-Ar/UFOP/UFMG/UFRN/UFPE
FACULDADE DE FARMÁCIA - UFRGS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Dispersão de agregados de C₆₀-PVP: caracterização físico-química e estudos de absorção dérmica e status oxidativo sob a influência de radiação ultravioleta A

Tese apresentada por **Gabriele Dadalt Souto** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Nanotecnologia Farmacêutica

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Porto Alegre, 2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, em nível Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.03.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. José María Monserrat

Instituto de Ciências Biológicas/Universidade do Rio Grande

Prof. Dr. Jose Mauro Granjeiro

Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Faculdade de Farmácia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Faculdade de Farmácia/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Solange Cristina Garcia

Faculdade de Farmácia/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Souto, Gabriele Dadalt

Dispersão de agregados de C60-PVP: caracterização físico-química e estudos de absorção dérmica e status oxidativo sob a influência de radiação ultravioleta A / Gabriele Dadalt Souto. -- 2014.

124 f.

Orientadora: Sílvia Stanisçuaski Guterres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Fulerenos. 2. Absorção dérmica. 3. Nanomaterial. 4. Pele humana. 5. Oxidação. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Sílvia S. Guterres, pela acessibilidade, orientação e aulas motivadoras, além da confiança depositada em minha capacidade de desenvolver um projeto diferente daqueles desenvolvidos no grupo.

À Profa. Adriana R. Pohlmann, pelas aulas mais desafiadoras da pós-graduação e nível de conhecimento, não somente científico, repassado durante as mesmas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, que acreditaram neste projeto e enfrentaram os desafios de montar um Doutorado em rede.

À Dra. Cassia Britto Detoni, primeira pessoa que acompanhei ao iniciar no laboratório, pelo incentivo à pesquisa, conversas motivadoras e todos os ensinamentos práticos e teóricos.

Aos meus colegas e amigos Karina Paese, Diego de Andrade, Ana Luiza M. da Silva, Karine Coradini, Aline Ourique, Ana Carolina Asbahar, Catiúscia Oliveira, Alana Klein, Franciele Bruinsmann e Caroline Borba pela amizade, discussões e apoio mais que essencial durante este período.

A todos os colegas do laboratório 405, pelo apoio sempre que preciso, conhecimentos compartilhados e momentos de descontração, além das pausas para o café.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos, e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela infraestrutura e ensino gratuito e de excelência.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a construção desta Tese.

E aos meus pais, pelos esforços imensuráveis despendidos ao me incentivarem a fazer o Doutorado e me manterem em Porto Alegre.

APRESENTAÇÃO

De acordo com o regulamento vigente do Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, em resolução aprovada pelo Conselho de Pesquisa, Extensão e Cultura da Universidade Federal de Goiás (CEPEC N° 948), a presente tese foi redigida no formato de compilação de artigos científicos, e encontra-se organizada da seguinte maneira:

- Resumo em Português e Inglês, seguidos do sumário;
- Introdução geral, incluindo a justificativa do estudo;
- Objetivos gerais e específicos;
- Capítulo 1, contendo revisão da literatura;
- Capítulos 2 e 3, contendo os trabalhos realizados durante a tese, em formato de artigos científicos;
- Discussão geral dos resultados encontrados;
- Conclusões;
- Referências bibliográficas;
- Apêndice, contendo resultados da preparação de suspensões não utilizadas em experimentos posteriores;
- Anexos, contendo os pareceres consubstanciados do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS quanto ao uso de pele humana nos experimentos da tese.

RESUMO

Objetivos: O objetivo principal da presente tese foi avaliar as interações entre a pele e agregados de fulerenos C_{60} estabilizados com polivinilpirrolidona (C_{60} -PVP), considerando sua incorporação recente em cosméticos, comparando-se a absorção dérmica *in vitro* entre pele suína e humana e avaliando-se o status oxidativo *ex vivo* de lipídios e proteínas de pele humana, sob radiação ultravioleta A, para verificar a influência deste fator externo nos estudos. **Métodos:** As dispersões de agregados de C_{60} preparadas foram caracterizadas quanto ao pH, tamanho de partícula, potencial zeta e morfologia. Os estudos de absorção dérmica foram realizados com pele suína e humana, sob uma fonte de radiação UVA, em equipamento automatizado de células do tipo Franz. Estudos *in vitro* foram realizados com homogenato de pele humana, na presença ou não de um sistema pró-oxidante, variando-se o tempo de incubação e a concentração de C_{60} -PVP, avaliando-se os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína carbonila. Utilizou-se pele humana recém excisada para estudos *ex vivo* de difusão de C_{60} -PVP na presença de radiação UVA e avaliação da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas. **Resultados:** O tamanho dos agregados de C_{60} obtido por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) foi 129 ± 54 nm e o potencial zeta foi $-4,93 \pm 1,72$ mV. Os agregados apresentaram formato irregular e permearam através da pele humana e suína após 12 h de exposição. O C_{60} -PVP não demonstrou atividade antioxidante, mas causou oxidação proteica, devido ao PVP. O C_{60} induziu oxidação de proteínas da epiderme humana *ex vivo*. **Conclusões:** A NTA foi considerada a técnica mais adequada para a caracterização do tamanho dos agregados de C_{60} -PVP, devido à dinâmica de agregação não controlada do sistema. A pele humana mostrou-se menos permeável do que a pele suína e a irradiação UVA aumentou o teor de C_{60} até a derme. O C_{60} não demonstrou capacidade antioxidante, mas pró-oxidante, e induziu a carbonilação de proteínas da epiderme humana.

Palavras-chaves: fulereno; C_{60} ; nanomaterial; pele humana; absorção dérmica; peroxidação lipídica; proteína carbonila.

ABSTRACT

Objectives: The main objective of the present dissertation was to evaluate the interactions between the skin and fullerene C₆₀ aggregates stabilised with poly(vinylpyrrolidone) (C₆₀-PVP), considering its recent incorporation into cosmetics, by comparing *in vitro* dermal absorption with porcine and human skin, and investigating the *ex vivo* oxidative effects to lipids and proteins of the human skin, under UVA irradiation to verify the influence of this external factor to the studies.

Methods: Aggregate dispersions were characterised for pH, particle size, zeta potential, and morphology. Skin absorption studies were performed using porcine or human skin under UVA or sham irradiation, in automated Franz diffusion cells equipment. *In vitro* studies were performed with human skin homogenates, with or without a pro-oxidant system, varying the time of incubation and the C₆₀-PVP concentration, to evaluate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and protein carbonyl levels. Freshly excised human skin was used for *ex vivo* studies of C₆₀-PVP diffusion with UVA radiation and subsequent determination of lipid peroxidation and protein oxidation content. **Results:** C₆₀ aggregate size through nanoparticle tracking analysis (NTA) was 129 ± 54 nm and zeta potential was $-4,93 \pm 1,72$ mV. C₆₀ aggregates presented irregular shape and permeated through human and porcine skin after 12 h exposure. C₆₀-PVP did not demonstrate antioxidant activity, but caused protein oxidation due to PVP. C₆₀ induced protein oxidation of human epidermis *ex vivo*. **Conclusions:** NTA was considered the most suitable method for aggregate size characterisation of C₆₀-PVP, due to the non-controllable aggregation dynamics of the system. Human skin was less permeable than porcine skin and the presence of UVA-R increased C₆₀ content up to the dermis. C₆₀ demonstrated no antioxidant capacity, but pro-oxidant activity, and induced protein carbonylation in human epidermis.

Keywords: fullerene; C₆₀; nanomaterial; human skin; dermal absorption; lipid peroxidation; protein carbonyl.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do fulereno C ₆₀	22
Figura 2. Representação esquemática dos diferentes tipos de preparações de C ₆₀	33
Figura 3. Representação esquemática dos mecanismos fotoquímicos Tipo 1 e Tipo 2.....	35
Figura 4. Representação esquemática da pele, indicando os principais componentes estruturais.....	37
Figura 5. Representação esquemática da pele, mostrando as possíveis rotas de absorção de substâncias.....	39
Figura 6. Size distribution from NTA measurements.....	58
Figura 7. TEM images of C ₆₀ -PVP aggregates.....	59
Figura 8. Representative liquid chromatograms of a blank sample of human skin spiked with PVP solution and C ₆₀ extracted from human skin spiked with C ₆₀ -PVP dispersion.....	60
Figura 9. C ₆₀ content after 2, 6 and 12 h of skin absorption experiments showing results for <i>stratum corneum</i> , viable epidermis and dermis of porcine and human skin.....	61
Figura 10. TBARS and protein carbonyl formation induced by the pro-oxidant system FeSO ₄ /EDTA and FeSO ₄ /H ₂ O ₂ , respectively.....	84
Figura 11. Epidermis and dermis lipid peroxidation after 12 h exposure to PVP or C ₆₀ -PVP dispersions in the presence or not of UVA radiation.....	87
Figura 12. Epidermis and dermis protein carbonyl content after 12 h exposure to PVP or C ₆₀ -PVP dispersions in the presence or not of UVA radiation.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos nanomateriais manufaturados do Programa da OECD.....	32
Tabela 2. Mean and SD values of particle size distribution parameters of each method used for determinations.....	57
Tabela 3. <i>In vitro</i> lipid peroxidation (TBARS content) of human skin homogenates in contact with different concentrations of PVP or C ₆₀ -PVP over different time durations.....	85
Tabela 4. <i>In vitro</i> carbonyl protein content of human skin homogenates in contact with different concentrations of PVP or C ₆₀ -PVP over different time durations.....	86

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO 1: Revisão da literatura.....	29
1.1 Nanomateriais e aspectos regulatórios.....	31
1.2 Fulereo C ₆₀	33
1.2.1 Generalidades.....	33
1.2.2 Efeitos biológicos de agregados de C ₆₀	34
1.2.3 Aplicação cutânea de C ₆₀	36
1.3 Pele e radiação ultravioleta.....	37
1.3.1 Pele: estrutura e rotas de absorção.....	37
1.3.2 Efeitos da radiação ultravioleta sobre a pele.....	39
1.3.3 Defesas antioxidantes e estresse oxidativo.....	41
1.3.3.1 Peroxidação lipídica.....	42
1.3.3.2 Oxidação de proteínas.....	43
CAPÍTULO 2: Caracterização físico-química e estudos de absorção dérmica de C ₆₀ -PVP sob a influência de radiação UVA.....	45
2.1 Apresentação.....	47
2.2 Publicação 1: Ultraviolet A irradiation increases the permeation of fullerenes into human and porcine skin from C ₆₀ -PVP aggregate dispersions....	49
CAPÍTULO 3: Avaliação dos efeitos oxidativos a lipídios e proteínas de pele humana após aplicação de C ₆₀ -PVP.....	71
3.1 Apresentação.....	73
3.2 Publicação 2: Oxidative effects of C ₆₀ -PVP aggregate dispersions to lipids and proteins of human skin: <i>In vitro</i> and <i>ex vivo</i> studies under ultraviolet A radiation.....	75
DISCUSSÃO GERAL.....	95
CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
APÊNDICE.....	115
ANEXOS.....	121

INTRODUÇÃO



Nanomateriais são definidos como sendo materiais naturais, incidentais ou manufaturados que contenham partículas, incluindo aquelas no estado de agregado ou aglomerado, onde para 50 % ou mais das partículas, na distribuição de tamanho por número, uma ou mais dimensões externas estejam no intervalo de tamanho entre 1 nm e 100 nm (EUROPEAN COMMISSION, 2011). O aparecimento de fenômenos dependentes do tamanho nanométrico dos materiais geralmente permite novas aplicações dos mesmos em diversas áreas, devido a propriedades diferentes e tecnologicamente interessantes, as quais divergem do material original de tamanho maior (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005; CROSERÁ *et al.*, 2009).

Produtos como cosméticos, medicamentos, tecidos, equipamentos diversos e produtos de limpeza utilizam nanomateriais manufaturados em sua composição e encontram-se comercialmente disponíveis (CROSERÁ *et al.*, 2009). Além disso, com o crescimento da utilização da nanotecnologia e o lançamento de novos produtos contendo nanomateriais sendo cada vez mais frequente (WOODROW WILSON INTERNATIONAL CENTER FOR SCHOLARS, 2013), mais trabalhadores e consumidores entrarão em contato com “nanoprodutos”. Documentos oficiais de alguns órgãos regulatórios têm discutido a questão acerca dos riscos potenciais que nanomateriais podem produzir, e se os mesmos precisam de regulação especial, uma vez que é importante que haja uma abordagem responsável e coordenada sobre o assunto (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2010).

A avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos que nanomateriais podem causar deve ser profundamente estudada, uma vez que a grande área superficial específica de nanopartículas, devido ao seu tamanho reduzido, possibilita maior reatividade e atividades biológicas, se comparadas com partículas maiores (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005). Nanomateriais, ao entrarem em contato com a pele, podem alojar-se junto à epiderme, um ambiente avascular, onde não são suscetíveis à remoção por fagocitose (CROSERÁ *et al.*, 2009). Possíveis efeitos da exposição dérmica a nanomateriais podem levar ao câncer de pele, irritação e/ou sensibilização dérmicas, ou produzir efeitos sistêmicos após absorção (MONTEIRO-RIVIERE; INMAN, 2006).

Fulerenos C_{60} (Figura 1), também denominados *buckminsterfullerene*, são moléculas contendo 60 átomos de carbono, arranjadas em uma estrutura semelhante a uma bola de futebol (KROTO *et al.*, 1985) e devem ser considerados,

por definição, nanomateriais (EUROPEAN COMMISSION, 2011). Em consequência de serem praticamente insolúveis em água, alguns métodos de dispersão aquosa foram descritos, os quais formam agregados nanométricos estáveis em determinadas condições (DEGUCHI; ALARGOVA; TSUJII, 2001; YAMAKOSHI *et al.*, 1994).

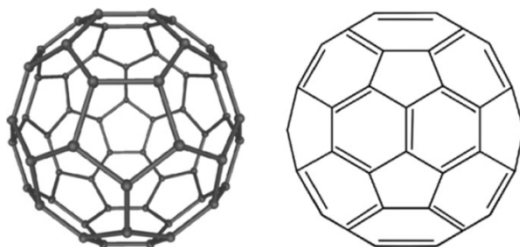


Figura 1. Estrutura do fulereno C_{60} .

Aos fulerenos é atribuída a atividade antirradicais livres (ANDRIEVSKY *et al.*, 2009; TAKADA *et al.*, 2006a), propriedade química responsável por despertar o interesse de algumas empresas fabricantes de cosméticos, que estão incluindo este nanomaterial em seus produtos (WWICS, 2013). Entretanto, apesar da utilização dos fulerenos por consumidores de produtos cosméticos, há uma escassez de estudos com relação ao perfil de absorção dérmica e dos possíveis efeitos que esse nanomaterial pode causar à pele, para garantir a segurança da aplicação cutânea desse nanomaterial (MONTEIRO-RIVIERE; RIVIERE, 2009).

Para fins de harmonização da linguagem do presente trabalho, o processo de absorção dérmica será definido como sendo um termo global que descreve o transporte de substâncias através da pele (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2006). Este processo pode ser dividido em três passos: (a) penetração, definida como a entrada de uma substância em uma camada ou estrutura particular da pele; (b) permeação, definida como a penetração de substâncias através de uma camada a outra da pele, a qual é funcionalmente e estruturalmente diferente da primeira camada; e (c) resorção, definida como sendo a captação de uma substância pelo sistema vascular local da pele, em que na maioria dos casos ocorre absorção sistêmica (WHO, 2006).

A pele é uma das principais barreiras do corpo humano contra agentes químicos, físicos e microbianos, além de prevenir a perda transepidermal de água,

manter a homeostase interna e apresentar funções sensoriais e de excreção. Entretanto, por possuir uma área de superfície relativamente grande, a pele é considerada uma rota potencial à exposição ocupacional e/ou ambiental a nanopartículas, além de ser uma via acessível para a administração voluntária de medicamentos ou cosméticos (MONTEIRO-RIVIERE; INMAN, 2006; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). O entendimento dos processos de absorção cutânea, assim como os possíveis efeitos que esses podem ocasionar, é necessário na avaliação dos aspectos de segurança de xenobióticos, como produtos químicos e formulações cosméticas (SCHAEFER *et al.*, 2008).

Um fator que pode influenciar os efeitos e a absorção dérmica de nanomateriais é a exposição da pele à radiação ultravioleta, pois vários cosméticos são de uso diurno. Alguns estudos demonstraram que a radiação UVA, além de ser responsável por danos na derme e DNA (HERRLING; JUNG; FUCHS, 2006), pode causar alterações químicas nos lipídios estruturais do estrato córneo e reduzir localmente a sua compactação (MERLE; BAILLET-GUFFROY, 2009). Estas alterações podem resultar no aumento da permeação cutânea de algumas substâncias, tornando indispensável o conhecimento deste dado para a avaliação da segurança de cosméticos contendo fulerenos.

Dessa forma, considerando: (a) a incorporação de fulerenos em produtos de consumo que possuem contato direto com a pele e que podem ser utilizados durante o dia; (b) a escassez de estudos relativos à absorção e possíveis efeitos dérmicos de nanomateriais, inclusive de fulerenos; (c) que metodologias mais próximas ao que ocorre *in vivo* fornecem dados com maior exatidão; e (d) que a predição da absorção dérmica e dos possíveis efeitos de nanomateriais deve ser conduzida de modo que a avaliação da segurança dos mesmos seja fidedigna, o presente trabalho objetiva estudar o comportamento de fulerenos quando aplicados sobre a pele suína e humana, gerando informações ainda inexistentes na literatura científica.

OBJETIVOS



Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar as interações entre a pele e dispersões aquosas de agregados de fulerenos, comparando-se a absorção dérmica *in vitro* entre pele suína e humana, e avaliando-se os efeitos oxidativos a lipídios e proteínas de pele humana, sob a influência da radiação UVA.

Objetivos específicos

- Preparar dispersões aquosas de agregados de fulerenos C_{60} , estabilizados com polivinilpirrolidona (PVP), e caracterizá-las quanto ao pH, tamanho e distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta e morfologia;
- Comparar os perfis de absorção dérmica de C_{60} -PVP em pele suína e humana através da quantificação dos mesmos nas diferentes camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável e derme) e no meio receptor;
- Verificar a influência da exposição a uma fonte de radiação UVA nos perfis de absorção dérmica de C_{60} -PVP em pele suína e humana;
- Avaliar a influência do tempo de aplicação da dispersão no perfil de absorção dérmica de C_{60} -PVP em pele suína e humana;
- Avaliar *in vitro* a capacidade antioxidante de C_{60} -PVP em homogenato de pele humana frente a um sistema oxidante;
- Avaliar *in vitro* a peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas dependente do tempo em homogenato de pele humana com diferentes concentrações de C_{60} -PVP;
- Avaliar *ex vivo* a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas em pele humana recém excisada após aplicação de C_{60} -PVP sob a influência da radiação UVA.

CAPÍTULO 1: Revisão da Literatura



O conteúdo presente no Capítulo 1 desta tese de doutorado refere-se a um artigo de revisão ainda não publicado, motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.

**CAPÍTULO 2: Caracterização físico-química e estudos de absorção dérmica de
C₆₀-PVP sob a influência de radiação UVA**



2.1 Apresentação

As informações acerca da incerteza quanto à segurança de nanomateriais, apresentadas no capítulo anterior, assim como a ampla utilização de fulerenos C_{60} em produtos cosméticos, e a escassez de conhecimento referente às suas interações com a pele, motivaram nosso grupo de pesquisa a realizar o trabalho descrito neste capítulo. Primeiramente, a dispersão aquosa de agregados de fulerenos estabilizados com polivinilpirrolidona (C_{60} -PVP) foi preparada e caracterizada, para se avaliar corretamente os efeitos biológicos que esse nanomaterial poderia exercer na pele. Em particular, diferentes técnicas de determinação da distribuição de tamanho de partícula foram utilizadas para a caracterização mais completa do sistema.

Em seguida, os processos de absorção dérmica *in vitro* da dispersão C_{60} -PVP foram investigados, utilizando-se para isso pele suína e humana, com o propósito de comparar os perfis de penetração cutânea. Além disso, avaliou-se a capacidade de uma fonte de radiação UVA em modificar o perfil de penetração/permeação dos agregados de fulerenos na pele.

O conteúdo presente no Capítulo 2 desta tese de doutorado encontra-se foi aceito para publicação no periódico científico *Skin Pharmacology and Physiology*, fator de impacto 2,885 (2013), Qualis A2 (Souto, G. D.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Ultraviolet A irradiation increases the permeation of fullerenes into human and porcine skin from C_{60} -PVP aggregate dispersions), motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.

CAPÍTULO 3: Avaliação dos efeitos oxidativos a lipídios e proteínas de pele humana após aplicação de C₆₀-PVP



3.1 Apresentação

Após avaliar a absorção cutânea da dispersão de agregados de C_{60} e verificar que os fulerenos são quantificados até as camadas mais inferiores da pele, decidiu-se avaliar os efeitos que o C_{60} poderia causar nos lipídios e proteínas da pele humana. Para isto, uma série de experimentos *in vitro* foi realizada com homogenatos de pele: utilizando-se um sistema pró-oxidante para verificar a capacidade antioxidante do C_{60} ; avaliando-se a influência de diferentes concentrações de C_{60} e tempo de incubação nos efeitos oxidativos; e estudando-se o possível mecanismo de oxidação. Os ensaios de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e de carbonilação de proteínas foram utilizados neste estudo como indicativo de peroxidação lipídica e oxidação proteica, respectivamente.

Além disso, experimentos *ex vivo* foram realizados com pele humana recém excisada (metabolicamente ativa) para que a avaliação dos efeitos oxidativos do C_{60} em um modelo mais próximo do que ocorre *in vivo* fosse possível. Adicionalmente, utilizou-se uma fonte de radiação UVA nestes experimentos de difusão, pois se verificaram possíveis alterações da permeação de C_{60} na pele sob essa condição.

O conteúdo presente no Capítulo 3 desta tese de doutorado refere-se a um manuscrito que se encontra em fase de submissão ao periódico científico *Toxicological Sciences*, fator de impacto 4,328, Qualis A1, motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.

DISCUSSÃO GERAL



Os resultados obtidos na presente tese demonstraram as interações entre o tecido cutâneo e fulerenos C_{60} estabilizados com o polímero hidrofílico PVP. Os objetivos específicos propostos foram atingidos, gerando duas publicações no formato de artigos científicos.

A carência de estudos avaliando os efeitos do C_{60} na pele, sendo este um nanomaterial já comercializado em produtos cosméticos, motivou os pesquisadores envolvidos neste trabalho a avaliar interações ainda não relatadas entre a pele e o C_{60} , sob a influência da radiação ultravioleta A. A literatura científica que aborda o assunto é concentrada em um grupo de pesquisadores japoneses da Universidade de Osaka, em colaboração com membros da empresa *Vitamin C₆₀ BioResearch Corporation*, a qual comercializa insumos contendo C_{60} para incorporação em formulações cosméticas. Dessa forma, torna-se importante a realização de estudos de segurança e eficácia por outros grupos de pesquisa, confirmando-se as propriedades de nanomateriais, ainda alvos de documentos regulatórios e de muitos estudos de segurança.

Considerando o exposto, a primeira parte da tese abordou a revisão da literatura sobre o tema, demonstrando a preocupação de agências regulatórias quanto à inclusão de nanomateriais inorgânicos em produtos de consumo, publicando opiniões e conclusões acerca de resultados preliminares. As generalidades, efeitos biológicos e aplicações cutâneas de agregados do fulereno C_{60} foram abordados de forma a demonstrar as discrepâncias existentes quanto ao fato de serem ou não tóxicos frente a sistemas biológicos. A estrutura da pele e alterações ocasionadas pela radiação ultravioleta A foram amplamente revisadas, para que os efeitos do C_{60} a serem observados fossem adequadamente interpretados. Os métodos de avaliação da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas foram brevemente revisados, pois são bastante utilizados devido à facilidade com que são realizados, além de fornecerem um *screening* comparativo confiável antes do planejamento de estudos mais aprimorados.

Os capítulos subsequentes da tese abordam os procedimentos experimentais utilizados para a execução dos objetivos propostos. Dessa forma, a publicação 1 contém os resultados da caracterização das dispersões de agregados de C_{60} -PVP, em que se demonstrou pela primeira vez sua distribuição de tamanho pela análise do rastreamento de nanopartículas, método demonstrado ser o mais adequado para a caracterização de sistemas com dinâmica de agregação não controlada.

Posteriormente, estudos de absorção dérmica foram conduzidos para responder às questões de o quanto o C₆₀ seria capaz de penetrar na pele e se a pele suína como modelo animal apresentaria os mesmos resultados. O C₆₀ foi capaz de permear *in vitro* através da pele suína e humana, porém a comparação dos perfis de permeação mostram diferenças marcantes quanto à penetração do C₆₀ no estrato córneo, pois a pele suína não ofereceu tanta resistência quanto a pele humana. Além disso, os estudos demonstraram modificações nos perfis de permeação dos fulerenos pela fonte de radiação UVA, os quais atingiram camadas mais inferiores da pele em maiores quantidades. Assim, concluiu-se com esta publicação que a pele humana é melhor modelo para a investigação da permeação cutânea de C₆₀ e levantou-se a questão da utilização de cosméticos de uso diário e diurno contendo C₆₀-PVP.

A publicação 2 originou-se da questão de que, se o C₆₀ é capaz de permear a pele humana, quais seriam os efeitos que eles poderiam provocar neste tecido? Dessa forma, utilizando-se de métodos de reação colorimétrica para quantificação de TBARS e grupamentos carbonílicos em proteínas, estudos *in vitro* foram primeiramente conduzidos. Estes estudos resultaram na conclusão de que, nas condições utilizadas, o C₆₀-PVP não possui capacidade antioxidante, mas provoca oxidação de proteínas da pele, efeito também demonstrado pelo veículo, sugerindo-se uma interação física do PVP com as proteínas. Por outro lado, experimentos *ex vivo* em pele humana metabolicamente ativa demonstraram que o C₆₀ *per se* induziu a carbonilação de proteínas, efeito observado na ausência de radiação UVA. Além disso, a radiação UVA não provocou efeitos adicionais à oxidação de proteínas na presença de C₆₀ e, dessa forma, o mecanismo de oxidação proteica causado pelo C₆₀ permanece desconhecido. Investigações futuras são necessárias para se obter respostas quanto à real segurança das dispersões de agregados de C₆₀-PVP.

CONCLUSÕES



- Os agregados de C₆₀ estabilizados com o polímero hidrofílico PVP são mais adequadamente caracterizados quanto à distribuição de tamanho pelo método *Nanoparticle Tracking Analysis*, devido à dinâmica de agregação não controlada do sistema;
- Os agregados de C₆₀ possuem carga negativa e morfologia irregular;
- O C₆₀ na concentração utilizada é capaz de permear através da pele suína e humana *in vitro*, porém a pele humana mostrou-se menos permeável, principalmente devido às diferenças estruturais do estrato córneo;
- A radiação UVA modificou o perfil de permeação do C₆₀, aumentando a concentração do mesmo nas camadas inferiores da pele, tanto suína quanto humana;
- A quantidade de C₆₀ permeada ao longo do tempo permaneceu constante na pele suína desde as primeiras horas de exposição, e a permeação foi mais lenta na pele humana;
- O C₆₀ não possui atividade antioxidante frente às espécies reativas do oxigênio induzidas por íon ferroso em homogenato de pele humana;
- O C₆₀-PVP possui atividade pró-oxidante dependente da concentração *in vitro* frente a proteínas, não relacionada à geração de oxigênio singleto, e devida ao PVP;
- O C₆₀ causa aumento significativo dos níveis de proteína carbonilada *ex vivo* na epiderme humana.
- A irradiação da pele humana durante os estudos *ex vivo* não mostrou efeitos adicionais em decorrência da presença de C₆₀.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ANDERSON, R. R.; PARRISH, J. A. The optics of human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 77, p. 13-19, 1981.

ANDRIEVSKY, G. *et al.* On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. **Journal of Chemical Society**, v. 12, p. 1281-1282, 1995.

ANDRIEVSKY, G. V. *et al.* Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C₆₀ fullerene nanostructures in vitro and in vivo. **Free Radical in Biology & Medicine**, v. 47, p. 786-793, 2009.

ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; WALKER, R. B.; DAYA, S. A sensitive and reliable method for the detection of lipid peroxidation in biological tissues. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 263-266, 2001.

AOSHIMA, H. *et al.* Biological safety of water-soluble fullerenes evaluated using tests for genotoxicity, phototoxicity, and pro-oxidant activity. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, p. 401-409, 2010.

BAIER, J. *et al.* Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1498–1506, 2007.

BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 21-50, 2010.

BERG, R. J. W.; GRUIJL, F. R.; VAN DER LEUN, J. C. Interaction between ultraviolet-A and ultraviolet-B radiations in skin cancer induction in hairless mice. **Cancer Research**, v. 53, p. 4212–4217, 1993.

BESARATINIA, A. *et al.* Similar mutagenicity of photoactivated porphyrins and ultraviolet A radiation in mouse embryonic fibroblasts: Involvement of oxidative DNA lesions in mutagenesis. **Biochemistry**, v. 43, p. 15557-15566, 2004.

BOSCIA, F. *et al.* Protein oxidation and lens opacity in humans. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.41, p. 2461-2465, 2000.

BOSI, S. *et al.* Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 913- 923, 2003.

BOTSOGLOU, N. A. *et al.* Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, 1931-1937, 1994.

BOUWSTRA, J. A. *et al.* A model membrane approach to the epidermal permeability barrier: An X-ray diffraction study. **Biochemistry**, v. 36, p. 7717-7725, 1997.

BRIGANTI, S.; PICARDO, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 17, p. 663–669, 2003.

BUETTNER, G. R.; HALL, R. D. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in hematoporphyrin derivative-cysteine, -NADH and -light systems. **Biochimica & Biophysica Acta**, v. 923, p. 501-507, 1987.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 675-711, 2004.

CHAE, S-R. *et al.* Comparison of methods for fullerene detection and measurements of reactive oxygen production in cosmetic products. **Environmental Engineering Science**, v. 27, p. 797-804, 2010.

CHENG, X.; KAN, A. T.; TOMSON, M. B. Naphthalene adsorption and desorption from aqueous C₆₀ fullerene. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 49, p. 675-683, 2004.

CROSERA, M. *et al.* Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 82, p. 1043-1055, 2009.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-38, 2003.

DARR, D.; FRIDOVICH, I. Free radicals in cutaneous biology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 671-675, 1994.

DAVIES, M. J.; TRUSCOTT, R. J. W. Photo-oxidation of proteins and its consequences. In: GIACOMONI, P. U. (Ed.). **Sun Protection in Man**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2001. P. 251-275.

DAVIES, M. J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 761-770, 2003.

DEGUCHI, S.; ALARGOVA, R. G.; TSUJII, K. Stable dispersions of fullerenes, C₆₀ and C₇₀, in water. Preparation and characterization. **Langmuir**, v. 17, p. 6013-6017, 2001.

DISSEMOND, J. *et al.* Protective and determining factors for the overall lipid peroxidation in ultraviolet A1-irradiated fibroblasts: in vitro and in vivo investigations. **British Journal of Dermatology**, v. 149, p. 341-349, 2003.

DIX, T. A.; AIKENS, J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 6, p. 2-18, 1993.

DR BRANDT SKIN CARE. Disponível em: <http://www.drbrandtskincare.com/p/lineless/lineless-cream>. Acesso em: 26 dez 2013.

DUTTA, R. K. *et al.* Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, 143-150, 2012.

ELIAS, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 44s–49s, 1983.

ELIAS, P. M.; CHOI, E. H. Interactions among stratum corneum defensive functions. **Experimental Dermatology**, v. 14, p. 719-726, 2005.

ENVIE DE NEUF. Disponível em: <http://shop.enviedeneuf.com/Fullerene-C60-Youth-Recruit-Complex-p/s25.htm>. Acesso em: 26 dez 2013.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, p. 81-128, 1991.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. **OJEU**, v. 54, p. L 275/38, 2011.

EUROPEAN COMMISSION. **Communication on the Second Regulatory Review on Nanomaterials**. 2012. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2012:0572:FIN:en:PDF>. Acesso em: 26 dez 2013.

FAN, J. *et al.* Water-dispersible fullerene aggregates as a targeted anticancer prodrug with both chemo- and photodynamic therapeutic actions. **Small**, v. 9, p. 613-621, 2013.

FERREIRA, J. L. R. *et al.* In vitro exposure to fullerene C₆₀ influences redox state and lipid peroxidation in brain and gills from *Cyprinus carpio* (Cyprinidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 961-967, 2012.

FILIP, A. *et al.* The effects of grape seeds polyphenols on SKH-1 mice skin irradiated with multiple doses of UV-B. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 105, p. 133–142, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry. **Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products**. 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Cosmetics/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ucm300932.pdf>. Acesso em: 26 dez 2013.

FUCHS, J. *et al.* Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 93, p. 769-773, 1989.

FUJIMOTO, T. *et al.* Induction of different reactive oxygen species in the skin during various laser therapies and their inhibition by fullerene. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, p. 685-694, 2012.

GIROTTI, A. W. Mechanisms of lipid peroxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 1, p. 87–95, 1985.

GIROTTI, A. W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 63, p. 103-113, 2001.

GIROTTI, A. W.; GIACOMONI, P. U. Lipid and protein damage provoked by ultraviolet radiation: mechanisms of indirect photooxidative damage. In: GIACOMONI, P. U. (Ed.). **Biophysical and Physiological Effects of Solar Radiation on Human Skin**. Cambridge: RSC Publishing, 2007. P. 271-291.

GRATTAGLIANO, I. *et al.* Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients. **Free Radical in Biology & Medicine**, v. 25, p. 369-372, 1998.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

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

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, 2006.

HAYWOOD, R. *et al.* Sunscreens inadequately protect against ultraviolet-A-induced free radicals in skin: Implications for skin aging and melanoma? **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, p. 862-868, 2003.

HAYWOOD, R.; ROGGE, F.; LEE, M. Protein, lipid, and DNA radicals to measure skin UVA damage and modulation by melanine. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 990-1000, 2008.

HERRLING, T.; JUNG, K.; FUCHS, J. Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. **Spectrochimica Acta A**, v. 63, p. 840-845, 2006.

HORIE, M. *et al.* *In vitro* evaluations of cellular response induced by stable fullerene C₆₀ medium dispersion. **The Journal of Biochemistry**, v. 148, p. 289-298, 2010.

HUNG, C-F. *et al.* Evaluation of drug and sunscreen permeation via skin irradiated with UVA and UVB: Comparisons of normal skin and chronologically aged skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 68, p. 135-148, 2012.

ICHIHASHI, M. *et al.* UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, p. 21-39, 2003.

ISAKOVIC, A. *et al.* Distinct cytotoxicity mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. **Toxicological Sciences**, v. 91, p. 173-183, 2006.

JENSEN, A.W.; WILSON, S.R.; SCHUSTER, D.I. Biological applications of fullerenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 767-779, 1996.

JEPPE, O. G. *et al.* Modeling the human skin barrier - Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 152-168, 2013.

JOHNSON, M. E.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Evaluation of solute permeation through the stratum corneum: lateral bilayer diffusion as the primary

transport mechanism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, p. 1162-1172, 1997.

JURKIEWICZ, B. A.; BUETTNER, G. R. EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: mouse versus human. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, p. 918-922, 1996.

KATO, S. *et al.* Biological safety of LipoFullerene composed of squalane and fullerene-C₆₀ upon mutagenesis, photocytotoxicity, and permeability into the human skin tissue. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, p. 483-487, 2009.

KHOROSHILOVA, E. V.; REPEYEV, Y. A.; NIKOGOSYAN, D. N. UV photolysis of aromatic amino acids and related dipeptides and tripeptides. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 7, p. 159-172, 1990.

KLOTZ, L. O. *et al.* Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. **European Journal of Biochemistry**, v. 260, p. 917-922, 1999.

KONG, L.; ZEPP, R. G. Production and consumption of reactive oxygen species by fullerenes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 136-143, 2012.

KROTO, H. W. *et al.* C₆₀: Buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, p. 162-163, 1985.

LARESE, F.F. *et al.* Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. **Toxicology**, v. 255, p. 33-37, 2009.

LEVINE, R. L. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LEVINE, R. L. *et al.* Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. In: S. M. Keyse (Ed.). **Methods in Molecular Biology**, vol. 99: Stress Response: Methods and Protocols. New Jersey: Humana Press Inc, 2000. P. 15-24.

LOPEZ-TORRES, M.; SHINDO, Y.; PACKER, L. Effect of age on antioxidants and molecular markers of oxidative damage in murine epidermis and dermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 476-480, 1994.

LYON, D. Y. *et al.* Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 4360-4366, 2006.

LYON, D. Y. *et al.* Antibacterial activity of fullerene water suspensions (nC₆₀) is not due to ROS-mediated damage. **Nano Letters**, v. 8, p. 1539-1543, 2008.

MANTLE, D.; FALKOUS, G.; WALKER, D. Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: comparison with antioxidant and free radical damage markers. **Clinica Chimica Acta**, v. 284, p. 45-58, 1999.

MANTOVANI, E. *et al.* **Developments in Nanotechnologies Regulation and Standards 2012** – Report of the Observatory Nano. 2012. Disponível em:

http://www.nanotec.it/documenti/ObservatoryNano_Nanotechnologies_RegulationAndStandards_2012.pdf. Acesso em: 26 dez 2013.

MARKOVIC, Z.; TRAJKOVIC, V. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀). **Biomaterials**, v. 29, p. 3561-3573, 2008.

MARNETT, L. J. Peroxyl free radicals: potent mediators of tumor initiation and promotion. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1365-1373, 1987.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, v. 424, p. 83-95, 1999.

MCCORMICK, J. P. *et al.* Characterisation of a cell-lethal product from the photooxidation of tryptophan: Hydrogen peroxide. **Science**, v. 191, p. 468-469, 1976.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S3-S17, 2002.

MERLE, C.; LAUGEL, C.; BAILLET-GUFFROY, A. Spectral monitoring of photoirradiated skin lipids: MS and IR approaches. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 154, p. 56-63, 2008.

MERLE, C.; BAILLET-GUFFROY, A. Physical and chemical perturbations of the supramolecular organization of the stratum corneum lipids: In vitro to ex vivo study. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1788, p. 1092-1098, 2009.

MERWALD, H. *et al.* UVA-induced oxidative damage and cytotoxicity depend on the mode of exposure. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 79, p. 197-207, 2005.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; INMAN, A. O. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. **Carbon**, v. 44 p. 1070-1078, 2006.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; RIVIERE, J. E. Interaction of nanomaterials with skin: aspects of absorption and biodistribution. **Nanotoxicology**, v. 3, p. 188-193, 2009.

NISHIGORI, C.; HATTORI, Y.; TOYOKUNI, S. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. **Antioxidants & Redox Signal**, v. 6, p. 561-570, 2004.

NISHIMURA, H.; YASUI, H.; SAKURAI, H. Generation and distribution of reactive oxygen species in the skin of hairless mice under UVA: studies on in vivo chemiluminescent detection and tape stripping methods. **Experimental Dermatology**, v. 15, p. 891-899, 2006.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, p. 823-839, 2005.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the sponsorship programme for the testing of manufactured nanomaterials: Revision.

Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, No. 27, ENV/JM/MONO(2010)46 2010. Disponível em: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)46&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)46&doclanguage=en). Acesso em: 26 dez 2013.

OTBERG, N. *et al.* Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, p. 14-19, 2004.

P.SKIN. Disponível em: <http://www.dermasia.com.hk/en/pskin-bg.php>. Acesso em: 26 dez 2013.

PATHAK, M. A.; STRATTON, K. Free radicals in human skin before and after exposure to light. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 123, p. 468– 476, 1968.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v. 30, p. 277-290, 1995.

PRYOR, W. A.; STANLEY, J. P.; BLAIR, E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. **Lipids**, v. 11, p. 370-379, 1976.

RADI, R. *et al.* Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 288, p. 481-487, 1991.

RHIE, G. *et al.* Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, p. 1212-1217, 2001.

ROKITSKAYA, T. I. *et al.* Tryptophan-dependent sensitized photoinactivation of colicin E1 channels in bilayer lipid membranes. **FEBS Letters**, v. 505, p. 147-150, 2001.

ROUSE, J. G. *et al.* Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. **Nano Letters**, v. 7, p. 155-160, 2007.

RÜNGER, T. M. How different wavelengths of the ultraviolet spectrum contribute to skin carcinogenesis: the role of cellular damage responses. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, p. 832–841, 2007.

SAILSTAD, D. M. *et al.* The effect of a vitamin A acetate diet on ultraviolet radiation–induced immune suppression as measured by contact hypersensitivity in mice. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, p. 766–771, 2000.

SANDER, C. S. *et al.* Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 118, p. 618-625, 2002.

SANTOS, L. J. *et al.* Fullerene C₆₀: chemistry and applications. **Química Nova**, v. 33, p. 680-693, 2010.

SAYES, C. M. *et al.* Nano-C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation. **Biomaterials**, v. 26, p. 7587-7595, 2005.

SCHAEFER, U. F. *et al.* Models for skin absorption and skin toxicity testing. **Drug Absorption Studies**, v. 7, p. 3-33, 2008.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS (SCENIHR). **Risk assessment of products of nanotechnologies**. 2009. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_023.pdf. Acesso em: 26 dez 2013.

SHINDO, Y. *et al.* Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 122-124, 1994.

SHINDO, Y.; HASHIMOTO, T. Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation. **Journal of Dermatological Science**, v. 14, p. 225-232, 1997.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 207-218, 2003.

SVOBODOVÁ, A. *et al.* Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin. **Journal of Dermatological Science**, v. 46, p. 21-30, 2007.

TAKADA, H. *et al.* Innovative anti-oxidant: Fullerene is as "Radical Sponge" on the skin. Its high level of safety, stability and potential as premier anti-aging and whitening cosmetic ingredient. **Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures**, v. 14, p. 335-341, 2006a.

TAKADA, H. *et al.* Antioxidant activity of supramolecular water-soluble fullerenes evaluated by β -carotene bleaching assay. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, p. 3088-3093, 2006b.

TANAKA, N. *et al.* Immunohistochemical detection of lipid peroxidation products, protein-bound acrolein and 4-hydroxynonenal protein adducts, in actinic elastosis of photodamaged skin. **Archives of Dermatological Research**, v. 293, p. 363-367, 2001.

THIELE, J. J. *et al.* Macromolecular carbonyls in human stratum corneum: a biomarker for environment exposure? **FEBS Letters**, v. 422, p. 403-406, 1998.

TOLL, R. *et al.* Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, p. 168-176, 2004.

VAN DER ZEE, J. *et al.* Hydroxyl radical generation by a light-dependent Fenton reaction. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 105-113, 1993.

VILE, G. F.; TYRRELL, R. M. UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p. 721-730, 1995.

WAGNER, B. A.; BUETTNER, G. R.; BURNS, P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. **Biochemistry**, v. 33, p. 4449-4453, 1994.

WERTZ, K. *et al.* β -Carotene interferes with ultraviolet light A-induced gene expression by multiple pathways. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, p. 428-434, 2005.

WEST, J. D.; MARNETT, L. J. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 173-194, 2006.

WILKINSON, F.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution – an expanded and revised compilation. **Journal of Physical and Chemical Reference**, v. 24, p. 663-1021, 1995.

WILLIAMS, A. C. Structure and function of human skin. **Transdermal and topical drug delivery**, Pharmaceutical Press, p. 1-25, 2003.

WOODROW WILSON INTERNATIONAL CENTER FOR SCHOLARS (WWICS). **Nanotechnology Consumer Products Inventory**. 2013. Disponível em: <http://www.nanotechproject.org/consumerproducts>. Acesso em: 26 dez 2013.

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). Dermal absorption. **Environmental Health Criteria 235**. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc235.pdf>. Acesso em: 26 dez 2013.

XIA, X. R.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; RIVIERE, J. E. Intrinsic biological property of colloidal fullerene nanoparticles (nC₆₀): Lack of lethality after high dose exposure to human epidermal and bacterial cells. **Toxicology Letters**, v. 197, p. 128-134, 2010a.

XIA, X. R.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; RIVIERE, J. E. Skin penetration and kinetics of pristine fullerenes (C₆₀) topically exposed in industrial organic solvents. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 242, p. 29-37, 2010b.

XIAO, L. *et al.* Antioxidant effects of water-soluble fullerene derivatives against ultraviolet ray or peroxy lipid through their action of scavenging the reactive oxygen species in human skin keratinocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 351-358, 2005.

XIAO, L. *et al.* The water-soluble fullerene derivative 'Radical Sponge[®]' exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 1590-1595, 2006.

XIAO, L.; MATSUBAYASHI, K.; MIWA, N. Inhibitory effect of the water-soluble polymer-wrapped derivative of fullerene on UVA-induced melanogenesis via downregulation of tyrosinase expression in human melanocytes and skin tissues. **Archives of Dermatological Research**, v. 299, p. 245–257, 2007.

YAMAKOSHI, Y. N. *et al.* Solubilization of fullerenes into water with polyvinylpyrrolidone applicable to biological tests. **Journal of Chemical Society**, p. 517-518, 1994.

YAMAKOSHI, Y. *et al.* Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as Potential Medicines: O₂^{-•} versus ¹O₂. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 12803–12809, 2003.

YOHN, J. J. *et al.* Disparate antioxidant enzyme activities in cultured human fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, p. 405-409, 1991.

APÊNDICE A: Preparação de suspensões aquosas de fulerenos através de agitação estendida e troca de solvente

Introdução

Desde a descoberta do fulereno C_{60} por Kroto *et al.* (1985), sua produção aumentou substancialmente após o desenvolvimento de um método para produção em grande escala (KRATSCHMER *et al.*, 1990). A solubilidade aquosa menor que 10^{-9} $\mu\text{g/mL}$ do fulereno em pó (HEYMANN, 1994) acarretou na proposta de diferentes métodos de preparação de suspensões aquosas de fulerenos (denominadas nC_{60} ou *FWS – fullerene water suspensions*).

Estes métodos comumente envolvem a dissolução do C_{60} em um solvente, seguida da adição de água e subsequente remoção do solvente (DEGUCHI; ALARGOVA; TSUJII, 2001; YAMAKOSHI *et al.*, 1994). Além disso, foi proposto que o nC_{60} pode ser a forma ambientalmente mais relevante do C_{60} , pois agregados podem ser formados com a agitação da água (FORTNER *et al.*, 2005).

Por este motivo, agregados nC_{60} foram destaque de vários estudos toxicológicos que receberam atenção generalizada (OBERDÖRSTER, 2004; SAYES *et al.*, 2005). Dessa forma, o início experimental da presente tese teve como objetivo a preparação e caracterização do tamanho de partícula de suspensões nC_{60} preparadas por diferentes métodos descritos na literatura.

Métodos

Preparação de Aq/ nC_{60} . A suspensão aquosa identificada como Aq/ nC_{60} seguiu o método descrito por Cheng *et al.* (2004) de agitação estendida em água. Dessa forma, 5 mg de fulereno C_{60} foram mantidos sob agitação constante em 200 mL de água ultrapura durante 30 dias, ao fim do qual a suspensão foi filtrada (0,45 μm).

Preparação de THF/ nC_{60} . A suspensão tetrahidrofurano/ nC_{60} (THF/ nC_{60}) foi preparada conforme método descrito primeiramente por Deguchi *et al.* (2001). 5 mg de fulereno C_{60} (99.5+% de pureza, SES Research, USA) foram dissolvidos em 200 mL de THF, e esta mistura foi mantida sob agitação por aproximadamente 15 h em

temperatura ambiente. A solução foi filtrada (0,45 μm) para a remoção de partículas não dissolvidas. Após, 200 mL de água ultrapura foram adicionados (aproximadamente 1 L/min) à solução de C_{60} em THF sob agitação vigorosa. O THF foi removido sob vácuo em evaporador rotatório, sob temperatura de 35 °C, com dois ciclos de evaporação e adição de 100 mL água ultrapura, produzindo-se aproximadamente 100 mL de THF/ $n\text{C}_{60}$, a qual foi posteriormente filtrada (0,45 μm).

Preparação de Son/ $n\text{C}_{60}$. A suspensão preparada através de sonicação (Son/ $n\text{C}_{60}$) foi baseada no método de Andrievsky *et al.* (1995). Uma solução de 1 mg/mL de fulereno C_{60} em tolueno (10 mL) foi adicionada a 100 mL de água ultrapura. Essa mistura bifásica foi sonicada durante 3 h em capela de exaustão para que o tolueno fosse evaporado completamente. A suspensão formada foi filtrada (0,45 μm).

Preparação de PVP/ C_{60} . A suspensão de fulereno C_{60} estabilizado com polivinilpirrolidona (PVP) foi preparada de acordo com o método proposto por Yamakoshi *et al.* (1994). 10 mL de uma solução a 50 mg/mL de PVP em clorofórmio foi adicionada a 5 mL de uma solução a 1 mg/mL de C_{60} em tolueno. A mistura foi agitada, os solventes evaporados sob vácuo em evaporador rotatório, e o filme remanescente foi sonicado com 10 mL de água ultrapura. A suspensão foi filtrada em membrana PVDF (0,45 μm).

Determinação do tamanho de partícula. O tamanho *z-average* de partícula (diâmetro hidrodinâmico médio), o tamanho médio por intensidade (CONTIN) e o índice de polidispersão (Pdl) foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), utilizando-se o equipamento Zetasizer[®] Nano ZS (Malvern Instruments, UK). As amostras foram diluídas ou não em água ultrapura filtrada (0,45 μm) antes das análises, que foram realizadas a 25 °C.

Resultados e Discussão

Os valores *z-average*, CONTIN e Pdl, determinados por espalhamento de luz dinâmico, juntamente com os valores de taxa de contagem (kcps) encontram-se sumarizados na Tabela A1.

Tabela A1. Parâmetros avaliados na análise por espalhamento de luz dinâmico das suspensões aquosas de fulerenos.

Amostra	Z-ave (nm)	Pdl	CONTIN (nm)	kcps
Aq/nC ₆₀	810 ± 160	0,718 ± 0,132	144 ± 39	94 ± 102
THF/nC ₆₀ nf ¹	403 ± 29	0,523 ± 0,006	199 ± 3	763 ± 12
THF/nC ₆₀	223 ± 28	0,519 ± 0,069	119 ± 10	132 ± 1
THF/nC ₆₀ 1:500	353 ± 21	0,515 ± 0,042	131 ± 9	52 ± 1
Son/nC ₆₀ nf ¹	350 ± 20	0,635 ± 0,037	98 ± 1	438 ± 2
Son/nC ₆₀	125 ± 8	0,359 ± 0,036	82 ± 6	172 ± 14
Son/nC ₆₀ 1:500 ²	94 ± 1	0,202 ± 0,021	95 ± 1	1347 ± 5
PVP/C ₆₀ 1:500	244 ± 16	0,499 ± 0,121	13 ± 2 e 130 ± 15	149 ± 9
PVP/C ₆₀ 1:100 ²	160 ± 3	0,323 ± 0,012	150 ± 3	1719 ± 18

Todas as análises foram realizadas no modo automático do equipamento. ¹nf = não filtrada. ²Amostras cujo resultado atende aos critérios de qualidade da análise.

A distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico compõe diversos parâmetros a serem analisados, especialmente quando o padrão de espalhamento não provém de nanopartículas esféricas com distribuição estreita (BOYD; PICHAIMUTHU; CUENAT, 2011). Vários estudos objetivaram a completa caracterização de suspensões aquosas de fulerenos preparadas por diferentes métodos (LYON *et al.*, 2006; DUNCAN; JINSCHK; VIKESLAND, 2008; KIM *et al.*, 2010), porém os dados de distribuição de tamanho variam e normalmente abordam poucos parâmetros. Dessa forma, além do tamanho *Z-average*, que é o parâmetro original e mais estável produzido pela técnica, e do Pdl, que indica a amplitude de distribuição de tamanho da amostra, foram avaliados o tamanho médio por intensidade dos picos das amostras, gerados pelo algoritmo CONTIN, e a taxa de contagem de fótons, que é o número de fótons detectados durante a análise, a qual deve estar acima de determinados valores para se obter sinal suficiente para a análise.

Pode-se observar que, apesar da seleção da amostra em filtro 0,45 µm, os agregados preparados por agitação estendida em água reagregam-se, atingindo valores limites de Pdl para análise por *DLS*. As suspensões THF/nC₆₀ atingiram menores valores de *Z-average* e Pdl, porém nota-se que conforme a amostra é

diluída (primeiramente por filtração e após por adição de água), a taxa de contagem de fótons diminui, conforme o esperado, sendo que nenhuma das contagens é suficiente para uma análise adequada de amostra, o que sugere a reagregação em partículas maiores, mesmo após a filtração. No caso das suspensões Son/nC₆₀, observa-se redução do *Z-average*, redução do Pdl e aumento da taxa de contagem de fótons com a diluição da amostra. A diluição 1:500 da Son/nC₆₀ atendeu aos critérios de qualidade de uma análise por *DLS* e, além disso, o tamanho *Z-average* e CONTIN atingiram valores muito semelhantes, demonstrando a homogeneidade da amostra. As dispersões PVP/C₆₀ foram também avaliadas e seus resultados demonstrados nesta seção para fins comparativos, por este motivo foram denominadas diferentemente. O *DLS* mostrou-se adequado para a análise dessa dispersão em diluição 1:100, atingindo os maiores valores de taxa de contagem de fótons. Por outro lado, em maior diluição a taxa de contagem é muito reduzida e o Pdl aumentado, demonstrando uma distribuição multimodal da amostra com dois picos de intensidade distintas, indicados pelo CONTIN.

Dessa forma, os resultados apresentados nesta seção demonstram a natureza polidispersa das suspensões aquosas de fulerenos C₆₀. Apesar de não ser uma técnica adequada para a caracterização desse tipo de sistema, o *DLS* é amplamente utilizado para este fim, gerando resultados muito variados conforme o grupo de pesquisa. Entretanto, é possível obter-se algumas informações acerca da dinâmica do sistema, estudando-se diferentes diluições e condições de análise, assim como os diferentes parâmetros gerados.

Referências

ANDRIEVSKY, G. *et al.* On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. **Journal of Chemical Society**, v. 12, p. 1281-1282, 1995.

BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 387, p. 35-42, 2011.

CHENG, X.; KAN, A. T.; TOMSON, M. B. Naphthalene adsorption and desorption from aqueous C₆₀ fullerene. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 49, p. 675-683, 2004.

DEGUCHI, S.; ALARGOVA, R. G.; TSUJII, K. Stable dispersions of fullerenes, C₆₀ and C₇₀, in water. Preparation and characterization. **Langmuir**, v. 17, p. 6013-6017, 2001.

DUNCAN, L. K.; JINSCHK, J. R.; VIKESLAND, P. J. C₆₀ colloid formation in aqueous systems: Effects of preparation method on size, structure, and surface charge. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 173-178, 2008.

FORTNER, J. D. *et al.* C₆₀ in water: Nanocrystal formation and microbial response. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 4307-4316, 2005.

HEYMANN, D. Solubility of C₆₀ and C₇₀ in seven normal alcohols and their deduced solubility in water. **Fullerene Science and Technology**, v. 4, p. 509-515, 1994.

KIM, K-T. *et al.* Effect of preparation methods on toxicity of fullerene water suspensions to Japanese medaka embryos. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 5606-5612, 2010.

KRATSCHMER, W. *et al.* Solid C₆₀: A new form of carbon. **Nature**, v. 347, p. 354-358, 1990.

KROTO, H. W. *et al.* C₆₀: Buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, p. 162-163, 1985.

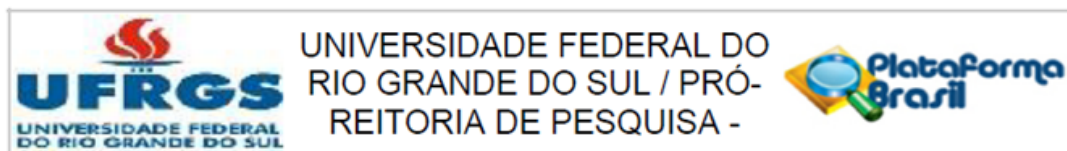
LYON, D. Y. *et al.* Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 4360-4366, 2006.

OBBERDÖRSTER, E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, p. 1058-1062, 2004

SAYES, C. M. *et al.* Nano-C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation. **Biomaterials**, v. 26, p. 7587-7595, 2005.

YAMAKOSHI, Y. N. *et al.* Solubilization of fullerenes into water with polyvinylpyrrolidone applicable to biological tests. **Journal of Chemical Society**, p. 517-518, 1994.

ANEXO A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa sobre o projeto intitulado “Avaliação da absorção dérmica *in vitro* de nanomateriais” para utilização de pele humana nos estudos desta tese



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DÉRMICA IN VITRO DE NANOMATERIAIS

Pesquisador: Sílvia Stanisçuaski Guterres

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 12143113.4.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/COMITÊ DE ÉTICA EM

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 229.750

Data da Relatoria: 21/02/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa, que constituirá a tese de doutorado da farmacêutica Gabriele D. Souto, está bem apresentado. A introdução é atualizada e de fácil entendimento. Os objetivos são claros e os procedimentos experimentais adequados. As solicitações feitas no parecer anterior foram atendidas. Portanto, recomenda-se aprovação.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto de pesquisa pretende avaliar a absorção dérmica *in vitro* de dispersões aquosas de agregados de fulerenos, aplicados sobre pele humana, sob a influência da radiação UVA, para prever seu comportamento *in vivo*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

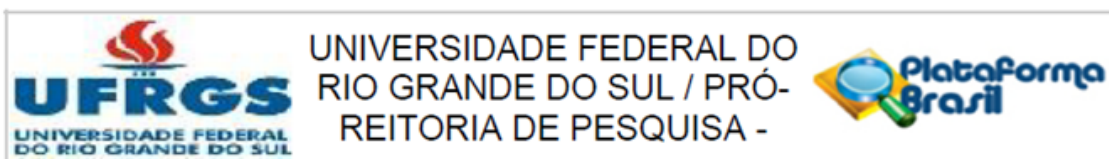
Foram devidamente apresentados os riscos e benefícios da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa trata de tema atual e relevante para a sociedade, pois pretende demonstrar o quanto dispersões aquosas de agregados de fulerenos penetram pelas camadas da pele humana.

Para a realização da pesquisa, serão obtidas amostras de pele humana de 2 pacientes femininos submetidos, por livre e espontânea vontade, à cirurgia de abdominoplastia no Hospital Nossa Senhora da Conceição, localizado em Porto Alegre, RS. De acordo com o projeto de pesquisa, as

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br



amostras de pele serão fornecidas pela médica cirurgiã responsável pelo procedimento de abdominoplastia, Dra. Rosanne Platchek (CRM RS 8877), com autorização do hospital. Em atendimento à solicitação, essa autorização foi anexada a documentação do projeto de pesquisa. Ainda, adequações foram feitas no item "Gerenciamento de resíduos".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em atendimento à solicitação, foi anexado Termo de Anuência do Hospital Nossa Senhora da Conceição.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS é de parecer favorável à realização deste projeto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

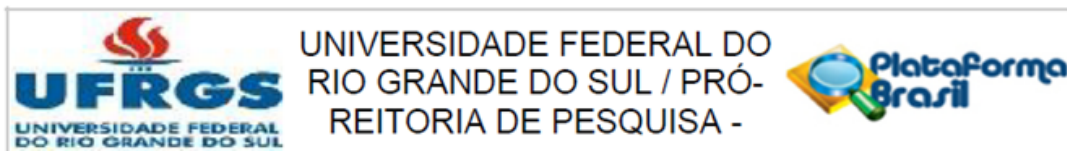
Encaminha-se.

PORTO ALEGRE, 26 de Março de 2013

Assinador por:
José Artur Bogo Chies
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

ANEXO B: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa sobre o adendo ao projeto intitulado “Avaliação da absorção dérmica *in vitro* de nanomateriais”



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DÉRMICA IN VITRO DE NANOMATERIAIS

Pesquisador: Sílvia Stanisçuaski Guterres

Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

Versão: 3

CAAE: 12143113.4.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/COMITÊ DE ÉTICA EM

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 522.762

Data da Relatoria: 06/02/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto possui aprovação do CEP da UFRGS (Número do Parecer: 229.750). Na versão atual do projeto de pesquisa, os pesquisadores solicitam aprovação de emenda, pois os dados do projeto original obtidos até o momento necessitam complementação.

Objetivo da Pesquisa:

Na emenda apresentada, os pesquisadores propõem avaliar os efeitos oxidativos *in vitro* de dispersões aquosas de agregados de fulerenos, aplicados sobre pele humana, sob a influência da radiação UVA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como informado no parecer anterior, os riscos e benefícios da pesquisa foram apresentados.

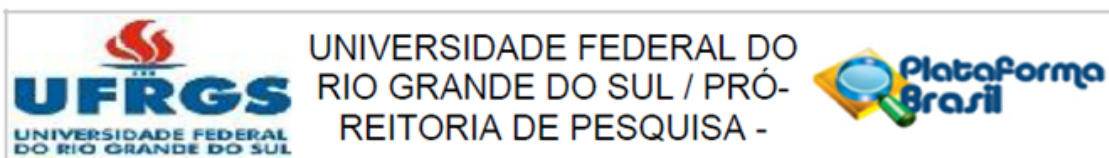
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Como informado no parecer anterior, as porções de pele humana serão obtidas de pacientes do sexo feminino submetidos, por livre e espontânea vontade, à cirurgia de abdominoplastia. Segundo os pesquisadores, serão necessárias doações de amostras de pele de 8 pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em atendimento às solicitações, os pesquisadores anexaram Termo de Anuência do Grupo Hospitalar Conceição, referente à emenda proposta ao projeto de pesquisa original, devidamente

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 522.762

assinada, e incluíram no TCLE a informação de aprovação da versão atual do projeto de pesquisa pelo CEP da UFRGS.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação da nova versão do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como os pesquisadores atenderam às solicitações, recomenda-se aprovação da nova versão do projeto de pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

PORTO ALEGRE, 06 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br