



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências da Saúde

ANA CLARA NOGUEIRA BRATHWAITE

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO TÓPICA ATIVADORA DE
COLÁGENO: AVALIAÇÃO DA IONTOFORESE E DO MICROAGULHAMENTO
NA PROMOÇÃO DA PERMEAÇÃO DE HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO**

Brasília
2024

Ana Clara Nogueira Brathwaite

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO TÓPICA ATIVADORA DE
COLÁGENO: AVALIAÇÃO DA IONTOFORESE E DO MICROAGULHAMENTO
NA PROMOÇÃO DA PERMEAÇÃO DE HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Faculdade de Ciências da Saúde,
Universidade de Brasília, como requisito à
obtenção do título de Doutora em Ciências
Farmacêuticas

Orientador(a): Prof. Dr^a. Taís Gratieri

Brasília
2024

Ana Clara Nogueira Brathwaite

Desenvolvimento de formulação tópica ativadora de colágeno: avaliação da iontoforese e do microagulhamento na promoção da permeação de hidroxiapatita de cálcio.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Tais Gratieri (Presidente)
Universidade de Brasília

Profª. Dra. Márcia Renata Mortari
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto
Universidade Federal de Goiás

Dra. Juliana Lago
Natura

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por me permitir chegar até aqui. Meu processo de reencontro com a fé foi essencial nessa caminhada.

Aos meus pais, **Francisco Antonio** e **Clara Rúbia**, e meu irmão, **João Antônio**, por serem minha base, meu maior amor e exemplo. Obrigada por sempre acreditarem no meu potencial e me proporcionarem tudo que eu sempre precisei para atingir meus objetivos. Nossa família é o meu maior orgulho.

Ao meu noivo, **Phelipe**, por ser meu maior apoio em todos os momentos de dificuldade e meu maior incentivador. Obrigada por todas as conversas e por me mostrar que eu sou capaz de realizar aquilo que me proponho. Sem você a caminhada até aqui teria sido muito mais difícil. Aos meus sogros, **Walter** e **Joana**, e minhas cunhadas e concunhado, **Daniela**, **Monique** e **Paulinho**, por compartilharem e celebrarem minhas conquistas como se fossem de vocês.

À minha orientadora, **Prof^ª. Dr^a. Tais Gratieri** por aceitar mais esse desafio, lapidar esse projeto e acreditar no meu potencial. Foi um prazer compartilhar essa jornada acadêmica e científica ao seu lado. Você é nosso maior exemplo de mulher cientista.

Aos amigos e colegas que o **LTMAC** me deu ao longo desses 6 anos de mestrado e doutorado, incluindo aqueles que finalizaram esse ciclo antes de mim, meu eterno agradecimento por tornarem nossa rotina mais leve e divertida. **Camila**, **Breno**, **Geisa**, **Thamires**, **Danillo**, **Rayssa**, **Jaya**, **Venâncio**, **Manuel**, **Ricardo**, **Paula** e **Wanessa**, vocês estão gravados na minha história e no meu coração. Obrigada por tudo.

À minha prima de tabela, **Gabriela**, por compartilhar as alegrias e desesperos que o doutorado nos traz e ter sido alicerce nesse período desafiador e gratificante. Às minhas amigas de vida, **Renata**, **Mariana**, **Ana Luiza** e **Ananda**, por mesmo não entendendo desta área me ouvirem falar da minha rotina e me darem apoio nas horas que mais precisei.

Aos professores colaboradores deste trabalho e suas alunas, **Prof. Dr. Felipe Saldanha**, **Prof^ª Dr^a Graziella Joanitti**, **Prof^ª Dr^a Juliana Lott**, **Elizabete**, **Vitória** e **Maria Victória**, por todo auxílio nos experimentos em culturas celulares.

Aos **Prof. Dr. Guilherme** e **Prof. Dr. Marcílio** por todo o conhecimento compartilhado em aulas ou reuniões.

À **Universidade de Brasília (UnB)**, por me proporcionar a realização deste trabalho. À **Central Analítica (IQ)** e sua equipe técnica pelo auxílio ao uso da FAAS. Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)** por todo o suporte nessa jornada. À **CAPES** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

RESUMO

Há no mercado uma grande demanda por cosméticos rejuvenescedores e do uso de substâncias injetáveis bioestimuladoras de colágeno para gerenciamento dos sinais do envelhecimento. A Hidroxiapatita de Cálcio (CaHA) é um mineral natural dos dentes e ossos humanos, utilizada de maneira injetável para tratamento de rugas e estímulo de produção de colágeno. Seu uso em regiões de risco e de maneira errônea pode gerar complicações como necrose tecidual, cegueira e acidente vascular cerebral. Este estudo tem como objetivo desenvolver uma formulação cosmética de aplicação tópica da CaHA e avaliar a iontoforese e o microagulhamento como promotores de sua permeação. Para tal, CaHA adquirida do fornecedor com tamanho de $\sim 10 \mu\text{m}$ (Commercial CaHA) foram dissolvidas e submetidas a secagem utilizando dois equipamentos/processos distintos: (i) Nanospray Dryer e (ii) Spray Dryer. Partículas foram produzidas utilizando ou não a lactose como antiagregante. As nanopartículas obtidas a partir do Nanospray Dryer (Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix e Nano CaHA Lac), apresentaram tamanho $829,45 \pm 27,08 \text{ nm}$, $504,07 \pm 0,25 \text{ nm}$ e $566,13 \pm 39,79 \text{ nm}$, e índice de polidispersão (PDI) $0,6 \pm 0,06$, $0,3 \pm 0,11$ e $0,1 \pm 0,04$, respectivamente, e a micropartícula obtida a partir do Spray Dryer (Micro CaHA) apresentou tamanho $2239,3 \pm 309,46 \text{ nm}$. A morfologia de todas as partículas foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Realizou-se a análise térmica das partículas, demonstrando a interação da lactose com a CaHA durante o processo de secagem por ambos os métodos. Foram realizados ensaios preliminares para avaliar o efeito sobre a proliferação celular, fragmentação de DNA e expressão gênica de Col 1, Col 4 e Col 6, IL-10 e INF- γ em culturas de fibroblastos humanos, apontando que as partículas nanométricas aumentam a divisão celular e expressão gênica de genes relacionados à inflamação e produção de colágeno em fibroblastos humanos. Selecionou-se então a partícula de melhor desempenho, Nano CaHA Lac, para prosseguimento dos estudos. Avaliou-se a expressão gênica de Col 1, Col 3, IL-4, IL-13 e TGF- β em co-cultura de fibroblastos humanos e PBMC, além da produção de Col 1 em fibroblastos humanos, em comparação a apresentação comercial injetável Radiesse®, apontando uma maior ação da partícula obtida neste estudo. Tais estudos incluíram como controle células não tratadas com as partículas obtidas. Avaliou-se o potencial irritativo de suspensão de Nano CaHA Lac 1% pelo método de HET-CAM, classificando-a como não irritante. Um método bioanalítico utilizando espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS) foi desenvolvido e validado para quantificar cálcio

(Ca) após ensaios de permeação *in vitro* e realizou-se a histologia da pele de orelha de porco danificada após o uso do microagulhamento. Por fim, avaliou-se a permeação de Nano CaHA Lac de forma passiva, após microagulhamento e com iontoforese, demonstrando penetração de $90,5 \pm 38,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $159,4 \pm 39,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $92,9 \pm 25,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nas camadas da pele. A partir deste estudo foi possível inferir que as suspensões de Nano CaHA Lac são adequadas para aplicação tópica de CaHA, pois são seguras e capazes de estimular significativamente a penetração de CaHA para as camadas mais profundas da pele, sendo que tal penetração é significativamente aumentada em pele pré-tratada com microagulhamento. Assim, a combinação do uso da formulação desenvolvida à técnica de microagulhamento pode beneficiar o tratamento tópico de flacidez cutânea.

Palavras-chaves: Hidroxiapatita de cálcio; Colágeno; Nanopartícula; Micropartícula.

ABSTRACT

There is a great demand on the market for rejuvenating cosmetics and the use of injectable collagen biostimulating substances to manage the signs of aging. Calcium Hydroxyapatite (CaHA) is a natural mineral from human teeth and bones, used injectably to treat wrinkles and stimulate collagen production. Its use in regions at risk and incorrectly can lead to complications such as tissue necrosis, blindness and stroke. This study aims to develop a cosmetic formulation for topical application of CaHA and evaluate iontophoresis and microneedling as promoters of its permeation. To this end, CaHA acquired from the supplier with a size of $\sim 10 \mu\text{m}$ (Commercial CaHA) were dissolved and subjected to drying using two different equipment/processes: (i) Nanospray Dryer and (ii) Spray Dryer. Particles were produced using or not using lactose as an anti-aggregant. The nanoparticles obtained from the Nanospray Dryer (Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix and Nano CaHA Lac) were $829.45 \pm 27.08 \text{ nm}$, $504.07 \pm 0.25 \text{ nm}$ and $566.13 \pm 39.79 \text{ nm}$, and polydispersity index (PDI) 0.6 ± 0.06 , 0.3 ± 0.11 and 0.1 ± 0.04 , respectively, and the microparticle obtained from the Spray Dryer (Micro CaHA) presented size $2239.3 \pm 309.46 \text{ nm}$. The morphology of all particles was evaluated using scanning electron microscopy (SEM). Thermal analysis of the particles was carried out, demonstrating the interaction of lactose with CaHA during the drying process using both methods. Preliminary assays were carried out to evaluate the effect on cell proliferation, DNA fragmentation and gene expression of Col 1, Col 4 and Col 6, IL-10 and INF- γ in human fibroblast cultures, indicating that the nanometric particles increase division cellular and gene expression of genes related to inflammation and collagen production in human fibroblasts. The particle with the best performance, Nano CaHA Lac, was then selected for further studies. Gene expression of Col 1, Col 3, IL-4, IL-13 and TGF- β was evaluated in co-culture of human fibroblasts and PBMC, in addition to the production of Col 1 in human fibroblasts, in comparison to injectable commercial presentation Radiesse[®], pointing to a greater action of the particle obtained in this study. Such studies included cells not treated with the obtained particles as controls. The irritant potential of Nano CaHA Lac 1% suspension was evaluated using the HET-CAM method, classifying it as non-irritating. A bioanalytical method using flame atomic absorption spectrometry (FAAS) was developed and validated to quantify calcium (Ca) after in vitro permeation assays and histology of damaged pig ear skin was performed after the use of microneedling. Finally, the permeation of Nano CaHA Lac was evaluated passively, after

microneedling and with iontophoresis, demonstrating penetration of $90.5 \pm 38.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $159.4 \pm 39.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $92.9 \pm 25.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the skin layers. From this study it was possible to infer that Nano CaHA Lac suspensions are suitable for topical application of CaHA, as they are safe and capable of significantly stimulating the penetration of CaHA into the deeper layers of the skin, with such penetration being significantly increased in skin pre-treated with microneedling. Thus, the combination of the use of the developed formulation and the microneedling technique can benefit the topical treatment of sagging skin.

Keywords: Calcium hydroxyapatite; Collagen; nanoparticle; Microparticle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.	3
Figura 2. Estrutura cristalina da hidroxiapatita de cálcio.	5
Figura 3. Necrose tecidual, inflamação difusa e fibrose exsudato após 11 dias de aplicação de CaHA, com agulha.....	7
Figura 4. Vias de penetração através do estrato córneo: (A) via transcelular, (B) via intercelular, e as vias anexos cutâneos: (C) folículo piloso e glândula sebácea, (D) glândula sudorípara.....	8
Figura 5. Esquema comparativo dos equipamentos de spray dryer (A) e nanospray dryer (B).....	10
Figura 6. Transwell: (A) Placa de 12 poços com transwell; (B) Esquema ilustrativo ..	21
Figura 7. Representação da célula de difusão do tipo Phoenix™.	26
Figura 8. Commercial CaHA com sacarose agregadas após aquecimento a 110 °C.....	31
Figura 9. Fotomicrografia das partículas obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) Nano CaHA; (B) Nano CaHA Lac Mix; (C) Nano CaHA Lac; (D) Micro CaHA.....	32
Figura 10. Análise térmico da lactose (Lac), Commercial CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Micro CaHA por (A) DSC e (B) TG.	36
Figura 11. Reação de redução de MTT a cristais de formazan.	37
Figura 12. Viabilidade celular dos Fibroblastos humanos pela técnica de MTT na presença de tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac). (A) 24 horas; (B) 48 horas. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorbância de triplicatas biológicas em duplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *.	37
Figura 13. Ensaio de azul de tripan para avaliação da integridade de membrana plasmática.	39
Figura 14. Viabilidade celular pela técnica de Azul de Tripan na presença de tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac). Fibroblastos humanos. O gráfico representa a média e o desvio-padrão das células contabilizadas de triplicatas biológicas em duplicatas técnicas,	

normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *..... 39

Figura 15. Análise morfológica de tamanho celular de fibroblastos humanos por citometria de fluxo na presença de tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) após 48h de incubação. (A) Tamanho celular (FSC-H); (B) Granularidade (SSC-H). O gráfico representa a média geométrica e o desvio-padrão das células contabilizadas de triplicatas biológicas em duplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *..... 40

Figura 16. Análise por citometria de fluxo da ação do tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) após 48h de incubação nas fases G1, S e G2/M no ciclo celular dos fibroblatos humanos. O gráfico representa a média e o desvio-padrão das células contabilizadas de triplicatas biológicas em duplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *..... 42

Figura 17. Análise de fragmentação de DNA por citometria de fluxo da ação do tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) em fibroblastos humanos após 48h de incubação. O gráfico representa a média e o desvio-padrão das células contabilizadas de triplicatas biológicas em duplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *..... 43

Figura 18. Avaliação da expressão gênica relativa de genes envolvidos na resposta imuno pela ação do tratamento com Commercial CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) em fibroblastos humanos após 48h de incubação, através da técnica de qPCR. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *. (A) INF- γ ; (B) IL-10. 44

Figura 19. Avaliação da expressão gênica relativa de colágeno pela ação do tratamento com Commercial CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) em fibroblastos humanos após 48h de incubação, através da técnica de qPCR.

Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *. (A) Col1; (B) Col4; (C) Col6. 46

Figura 20. Viabilidade celular dos Fibroblastos humanos pela técnica de MTT na presença de tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac). (A) 24 horas; (B) 48 horas. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorvância de triplicatas biológicas em duplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *. 49

Figura 21. Avaliação da expressão gênica relativa de colágeno pela ação do tratamento com Radiesse® e Nano CaHA Lac em PBMC após 48h de incubação, através da técnica de qPCR. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *. (A) IL-4; (B) IL-13; (C) TGF- β 51

Figura 22. Avaliação da expressão gênica relativa de colágeno pela ação do tratamento com Radiesse® e Nano CaHA Lac em fibroblastos humanos após 48h de incubação, através da técnica de qPCR. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *. (A) COL1; (B) COL3. 53

Figura 23. Avaliação da produção de colágeno tipo I em fibroblastos humanos após 48 horas de tratamento com Radiesse® e Nano CaHA Lac. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo enquanto os fibroblastos humanos não tratados foram considerados como controle negativo. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *. 54

Figura 24. Pele de orelha de porco após realização de microagulhamento automatizado com dermapen, com ponteiros previamente embebidas em corante, em diferentes profundidades. (A) 0,25 mm; (B) 0,5 mm; (C) 1,0 mm; (D) 1,5 mm; (E) 2,0 mm. 56

Figura 25. Análise histológica da pele de orelha de porco coradas com hematoxilina e eosina em aumento de 20x. (A) Pele integra. (B) 0,25 mm. (C) 0,5 mm (D) 1,0 mm (E) 1,5 mm (F) 2,0 mm. 56

Figura 26. Curva analítica em ácido nítrico 2% obtidas pela análise de concentrações de 0,0 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata; equação da reta: $y = 0,1563x + 0,0074$; $R^2 = 0,9908$ 59

Figura 27. Correspondência entre as curvas em ácido nítrico 2% (solvente) e a curva em solvente acrescida de 0,5 mL de matriz biológica, realizadas em triplicata. Equação da

reta: $y = 0,1563x + 0,0074$. $R^2 = 0,9908$; Equação da reta: $y = 0,3584x + 0,1461$. $R^2 = 0,9919$ para Matriz Biológica.	59
Figura 28. Curva analítica em ácido nítrico 2% acrescido de 0,5 mL de matriz biológica, obtidas pela análise de concentrações de 0,0 a 1,25 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata; equação da reta: $y = 0,2365x + 0,0731$; $R^2 = 0,9958$	60
Figura 29. Estudo de permeação passiva, após microagulhamento e com iontoforese com densidade de corrente 0,5 mA/cm^2 da suspensão de Nano CaHA Lac 1% (m.v.) Análise estatística por ANOVA, (*) $p \leq 0,05$	65
Figura 30. Sequência ilustrativa das imagens do ensaio de HET-CAM demonstrando o efeito do controle negativo (NaCl 0,9%), controle positivo (NaOH 1 mol/L) e triplicata experimental de Nano CaHA Lac 1% (m.v.) na membrana cório-alantoide nos tempos 0 seg, 30 seg, 2 min e 5 min.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Siglas adotadas para as partículas obtidas e sua forma de obtenção	13
Tabela 2. Escala para teste de HET-CAM conforme efeitos observados ao longo de 5 min.....	29
Tabela 3. Classificação final das formulações analisadas considerando a pontuação cumulativa ao grau de irritabilidade no HET-CAM.....	29
Tabela 4. Resultados das análises de tamanho de gotícula, potencial zeta e PDI das nanopartículas obtidas a partir da média de 3 determinações \pm desvio padrão.....	34
Tabela 5. Valores de concentração real, precisão e exatidão da concentração teórica do ponto baixo e ponto alto da curva analítica em ácido nítrico 2% acrescida de 0,5 mL de matriz biológica para avaliação de efeito matriz.....	61
Tabela 6. Valores de concentração real, precisão e exatidão da concentração teórica do ponto baixo da curva analítica em ácido nítrico 2% acrescida de 0,5 mL de matriz biológica.....	62
Tabela 7. Limites de detecção e quantificação de Ca em ácido nítrico 2% acrescido de 0,5 mL de matriz biológica.....	63
Tabela 8. Valores de precisão e de exatidão intra e interensaio do método analítico para o Ca em ácido nítrico 2% acrescida de 0,5 mL de matriz biológica.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(m.m) – massa/massa

(v.v) – volume/volume

(m.v.) – massa/volume

AGEs - Produtos finais da glicação avançada

Ca - Cálcio

CaHA - Hidroxiapatita de Cálcio

Commercial CaHA – Hidroxiapatita de cálcio comercial de 10 µm de diâmetro hidrodinâmico

COL1 – Colágeno tipo 1

COL3 – Colágeno tipo 3

COL4 – Colágeno tipo 4

COL6 – Colágeno tipo 6

DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC - Calorimetria Exploratório Diferencial

FAAS - Espectrometria de absorção atômica por chama

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

IL-4 – Interleucina 4

IL-10 – Interleucina 10

IL-13 – Interleucina 13

INF-γ – Interferon gama

LTMAC – Laboratório de Tecnologia em Medicamentos, Alimentos e Cosméticos

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Micro CaHA - Hidroxiapatita de cálcio adicionada de lactose, atomizadas e secas em conjunto pela técnica de spray drying

MMP - metaloproteinases da matriz

MTT - Brometo de 3-(4,5dimetil-2-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólio

mV – Milivolts

Nano CaHA - Hidroxiapatita de cálcio obtida pela técnica de nanospray drying

Nano CaHA Lac Mix - Hidroxiapatita de cálcio obtida pela técnica de nanospray drying adicionada de lactose posteriormente a secagem

Nano CaHA Lac - Hidroxiapatita de cálcio adicionada de lactose, pulverizadas e secas em conjunto pela técnica de nanospray drying

nm - Nanometro

PBMC – célula mononuclear de sangue periférico

PBS – Tampão fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PdI – índice de polidispersividade

pH - Potencial hidrogeniônico

pKa - log negativo do Ka (constante de acidez)

RPMI - Meio Gibco Roswell Park Memorial Institute

TG - Análise termogravimétrica

TH2 – T helper 2

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	2
2.1.	Objetivo geral.....	2
2.2.	Objetivos específicos.....	2
3.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
3.1.	Envelhecimento cutâneo.....	2
3.2.	Hidroxiapatita de Cálcio.....	4
3.2.1.	Mecanismo de ação.....	5
3.2.2.	Complicações.....	6
3.3.	Permeação cutânea.....	8
4.	MATERIAL.....	12
5.	METODOLOGIA.....	13
5.1.	Obtenção de nanopartícula e micropartícula.....	13
5.1.1.	Nanospray drying.....	14
5.1.2.	Spray drying.....	14
5.2.	Caracterização de nanopartícula e micropartícula.....	14
5.2.1.	Morfologia.....	14
5.2.2.	Tamanho, potencial zeta e PDI.....	14
5.3.	Análise térmica.....	15
5.4.	Ensaio in vitro com fibroblastos humanos.....	15
5.4.1.	Viabilidade celular em fibroblastos humanos por MTT.....	15
5.4.2.	Viabilidade celular por integridade de membrana plasmática.....	16
5.4.3.	Citometria de fluxo.....	17
5.4.4.	Avaliação da expressão gênica preliminar.....	17
5.5.	Seleção de partícula para estudos subsequentes.....	18
5.6.	Ensaio in vitro com fibroblastos humanos e células mononucleares de sangue periférico.....	19
5.6.1.	Isolamento das PBMC.....	19
5.6.2.	Viabilidade celular em fibroblastos humanos e PBMC.....	20
5.6.3.	Avaliação da expressão gênica.....	20
5.6.4.	Avaliação de produção de colágeno.....	21
5.7.	Microagulhamento em pele de orelha de porco.....	22
5.8.	Análise histológica da pele de orelha de porco danificada.....	22
5.9.	Método Analítico.....	23
5.9.1.	Preparo de solução estoque.....	23
5.9.2.	Digestão da pele de orelha de porco.....	23
5.9.3.	Validação de método analítico.....	24
5.10.	Avaliação in vitro de permeação cutânea do Hidroxiapatita de Cálcio.....	26
5.10.1.	Permeação Passiva.....	27

5.10.2.	Iontoforese	27
5.11.	Avaliação in vitro do potencial irritativo.....	28
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6.1.	Obtenção de nanopartícula e micropartícula	30
6.1.1.	Nanospray drying	31
6.1.2.	Spray drying	31
6.2.	Caracterização de nanopartícula e micropartícula.....	32
6.2.1.	Morfologia	32
6.2.2.	Tamanho, potencial zeta e PDI.....	33
6.3.	Análise térmica	35
6.4.	Ensaio in vitro com fibroblastos humanos.....	36
6.4.1.	Viabilidade Celular.....	37
6.4.2.	Citometria de fluxo.....	40
6.4.3.	Avaliação de expressão gênica preliminar	43
6.5.	Seleção de partícula para estudos subsequentes	48
6.6.	Ensaio in vitro com fibroblastos humanos e PBMC	49
6.6.1.	Viabilidade celular em fibroblastos humanos e PBMC.....	49
6.6.2.	Avaliação da expressão gênica	51
6.6.3.	Avaliação de produção de colágeno	54
6.7.	Microagulhamento em pele de orelha de porco.....	56
6.8.	Análise histológica da pele de orelha de porco danificada.....	56
6.9.	Método Analítico.....	58
6.9.1.	Linearidade e Efeito Matriz.....	58
6.9.2.	Seletividade	62
6.9.3.	Limite de detecção e de quantificação.....	62
6.9.4.	Precisão e Exatidão.....	63
6.10.	Avaliação in vitro de permeação cutânea do Hidroxiapatita de Cálcio.....	64
6.11.	Avaliação in vitro do potencial irritativo.....	67
7.	RESUMO DOS RESULTADOS.....	69
9.	REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é causado por fatores intrínsecos, por meio da perda de funções celulares provenientes da passagem natural do tempo, e por fatores extrínsecos, principalmente a exposição à radiação ultravioleta (UV). O fotoenvelhecimento cutâneo apresenta características bem definidas, como perda de elasticidade, manchas, afinamento da epiderme, telangectasias e rugas. A exposição da pele humana à radiação UV aumenta os níveis de metaloproteinases da matriz (MMP), enzimas que degradam as fibras de colágeno e outros componentes da matriz extracelular da derme. Há um declínio de aproximadamente 1% ao ano de fibras de colágeno na pele com o envelhecimento (GANCEVICIENE *et al.*, 2012; QUAN *et al.*, 2013).

Há no mercado uma grande demanda sobre cosméticos com função de diminuir as características do fotoenvelhecimento, os cosméticos antienvelhecimento. Os componentes estruturais da derme, colágeno, elastina e glicosaminoglicanos, são os principais alvos de pesquisas e estratégias desses produtos (GANCEVICIENE *et al.*, 2012).

Os retinóides, como retinol e a tretinoína, induzem a produção de colágeno e reduzem a expressão das MMP, sendo assim os principais ativos utilizados nos cosméticos antienvelhecimento. Porém esses ativos apresentam efeitos adversos como xerose, descamação, dermatite, sensação de ardência e queimação, prurido e sensibilidade a luz. O maior problema do ponto de vista clínico é a teratogenicidade do tratamento com retinóides, pois eles atravessam a barreira placentária e são secretados no leite. Além disso, são difíceis de serem formulados devido à sua fotossensibilidade. Essas características abrem precedentes para a pesquisa de novos ativos indutores de colágeno para uso tópico (MUKHERJEE *et al.*, 2006; MAIO, 2011).

Além do uso de cosméticos tópicos, a procura por procedimentos estéticos injetáveis é crescente na população mundial. A American Society of Plastic Surgery (ASPS) demonstrou um aumento de 174% na procura por procedimentos estéticos minimamente invasivos na última década, como toxina botulínica, preenchedores, laseres e bioestimuladores de colágeno (ASPS, 2020). Porém, apesar dos benefícios desse tipo de procedimento, há a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos como infecções, oclusão vascular e reações de hipersensibilidade, além de nódulos e granulomas (KADOUCH, 2017). Apesar da incidência de complicações ser baixa e a maioria dos

eventos adversos serem leves, o aumento no número de procedimentos produziu o aumento concomitante no número de complicações. As complicações graves são raras, embora provavelmente subnotificadas (URDIALES-GÁLVEZ *et al.*, 2018).

A Hidroxiapatita de Cálcio (CaHA) é um mineral encontrado nos dentes e ossos humanos utilizada de maneira injetável para tratamento de rugas e estímulo de produção de colágeno. Por estar presente no corpo humano não apresenta toxicidade ao organismo, sendo assim biocompatível (CHAO *et al.*, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2019). Pesquisas com CaHA em formulações tópicas vem sendo desenvolvidas para seu uso em filtros solares, afim de substituir outros minerais como Zinco, Magnésio e Ferro (TEIXEIRA *et al.*, 2017). Assim, torna-se um potencial alvo de estudo e há o interesse em avaliar o potencial indutor de produção de colágeno do uso da CaHA de maneira tópica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver uma formulação cosmética de aplicação tópica contendo Hidroxiapatita de Cálcio para indução da produção de colágeno e avaliar a iontoforese e o microagulhamento como metodologias de promoção da permeação do ativo.

2.2. Objetivos específicos

- Diminuir o tamanho das partículas de hidroxiapatita de cálcio obtidas comercialmente;
- Realizar estudos *in vitro* para avaliar a ação das nanopartículas de hidroxiapatita de cálcio em fibroblastos e PBMC;
- Desenvolver e validar método de quantificação analítica;
- Avaliar a permeação passiva do ativo;
- Avaliar a permeação com aplicação de iontoforese e microagulhamento;
- Avaliar a irritabilidade cutânea da formulação.

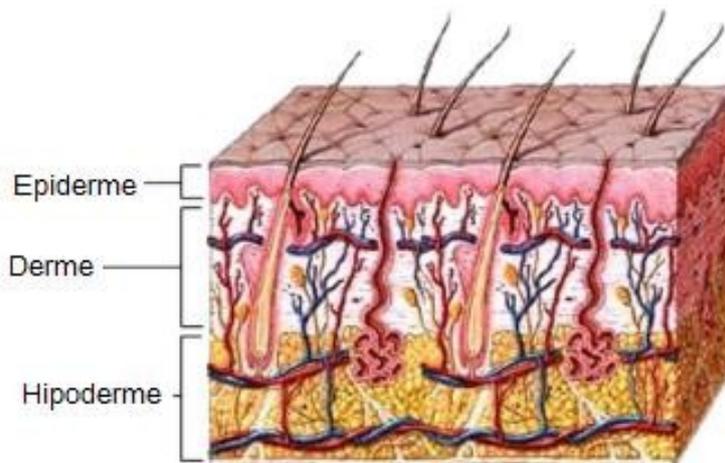
3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Envelhecimento cutâneo

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a cerca de 15% do total do peso corporal de um adulto e possui uma área de superfície de aproximadamente 2 m². Possui como principais funções a regulação da temperatura e quantidade de água corporal, auxiliar o funcionamento do sistema nervoso e proteger o organismo contra injúrias, microorganismos, substâncias externas e radiações presentes no ambiente, como a radiação UV (DABROWSKA *et al.*, 2016; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013).

É formada por três camadas distintas (Figura 1): epiderme, derme e hipoderme. A hipoderme é a camada mais interna da pele, situando-se abaixo da derme e acima do tecido muscular. É composta por adipócitos e se conecta a derme por meio de fibras de colágeno e elastina. Apresenta como função o isolamento térmico e reserva de energia, sendo responsável por armazenar 80% da gordura corporal (KHAVKIN; ELLIS, 2011; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013)

Figura 1. As três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.



Fonte: Adaptado de KHAVKIN, ELLIS, 2011.

A derme é subdividida em derme papilar e reticular, estando localizada logo abaixo da epiderme e tendo como função a sua sustentação e nutrição. Essa camada é composta por fibras de colágeno e elastina, assim como por fibroblastos, mastócitos, células dendríticas, vasos sanguíneos, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas, músculo eretor de pelo e glândulas sudoríparas. A epiderme é a primeira camada da pele e é subdividida em 4 camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea (KHAVKIN; ELLIS, 2011; LAI-CHEONG, MACGRATH, 2013).

O envelhecimento cutâneo é resultado da ação de fatores individuais e genéticos e também de fatores ambientais e comportamentais, sendo subdividido em

envelhecimento intrínseco e envelhecimento extrínseco respectivamente. O envelhecimento intrínseco é cronológico e acompanha processos naturais de degeneração, ocorrendo também em outros órgãos. Com ele as células passam a ter sua capacidade de renovação diminuída (MAIO, 2011; KHAVKIN; ELLIS, 2011; SALVADOR; CECHINEL-ZANCHETT, 2020). Já o envelhecimento extrínseco está ligado a fatores externos ao organismo, como por exemplo a exposição solar, sendo conhecido como fotoenvelhecimento, o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, estimulando a geração de radicais livres e gerando estresse oxidativo, e uma alimentação rica em carboidratos, capaz de induzir a glicação, uma reação não enzimática, que ocorre entre a glicose e as proteínas, gerando os produtos finais da glicação avançada (AGEs) (BERTUCCELLI *et al.*, 2016; JENKINS *et al.*, 2014; LATREILLE *et al.*, 2013). Durante o processo de envelhecimento, observamos perda de volume subcutâneo, reabsorção óssea, flacidez cutânea, frouxidão ligamentar e alterações gravitacionais (BORBA; MATAYOSHI, 2018).

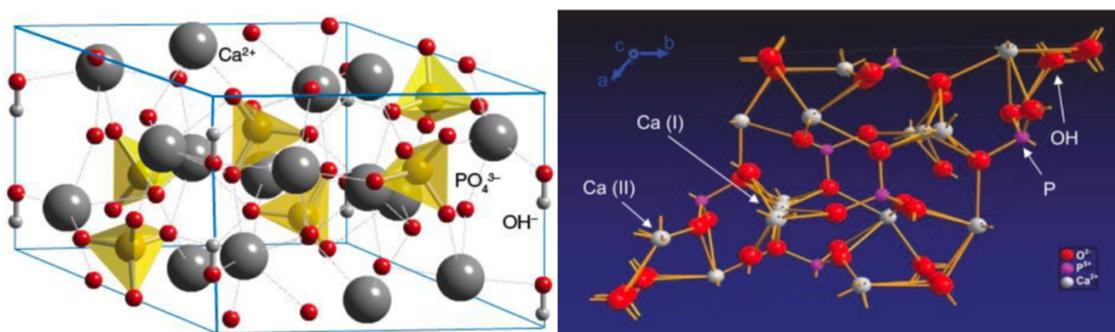
Os fibroblastos são células presentes na derme responsáveis pela síntese de colágeno. A proliferação, diferenciação e síntese anormal dos fibroblastos acarretam em mudanças estruturais e funcionais da pele, sendo sua disfunção uma das marcas do envelhecimento. Com o envelhecimento cutâneo há uma diminuição significativa na produção de colágeno tipo I e piora da capacidade migratória dos fibroblastos. O colágeno tipo I é responsável pela resistência ao estresse e tração da pele. A redução da sua síntese é um dos fatores responsáveis pelo envelhecimento cutâneo. Além disso, o fotoenvelhecimento cutâneo aumenta os níveis de MMPs, enzimas que degradam as fibras de colágeno, e reduz a produção de colágeno tipo I. Esse desequilíbrio na homeostase do colágeno resulta em fibroblastos com funções alteradas e consequências na estrutura da pele, como a flacidez tissular (QUAN *et al.*, 2013).

3.2. Hidroxiapatita de Cálcio

A Hidroxiapatita de Cálcio (CaHA) é um fosfato de cálcio hidratado do grupo mineral dos fosfatos e possui fórmula química $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, com relação Ca/P de 1,67. É uma apatita constituinte dos ossos e dentes humanos. Apatita é uma definição estrutural e não de composição, sendo sua fórmula genérica $M_{10}(ZO_4)_6(X)_2$ (FIUME *et al.*, 2021). Sua estrutura cristalina é mostrada na figura 2. É umas das principais cerâmicas usadas em aplicações clínicas visando à regeneração óssea e dentária devido a sua

excelente biocompatibilidade, ausência de toxicidade e similaridade com a composição química da fase mineral dos tecidos calcificados (KUMTA *et al.*, 2005a).

Figura 2. Estrutura cristalina da hidroxiapatita de cálcio.



Fonte: FIUME *et al.*, 2021

Esse composto é utilizado no tratamento dos aspectos do envelhecimento em procedimentos de rejuvenescimento não cirúrgico, de maneira injetável. É um produto que promove volumização, decorrente do gel de carboximetilcelulose no qual as microesferas da CaHA estão inseridas, e bioestimulação de colágeno como ação primária. Após a injeção do material, o gel de carboximetilcelulose é degradado e as partículas de CaHA atuam estimulando a neocolagênese. Atualmente, esse material é diluído em soro fisiológico para que haja dispersão das microesferas de CaHA e o material apresente apenas a função de estimulação de produção de colágeno. Com essa aplicação, observa-se a produção de colágeno do tipo I e do tipo III. Há uma melhora na proliferação de fibroblastos e sua função de contração, tratando assim rugas da pele fotoenvelhecida (DE ALMEIDA *et al.*, 2019).

3.2.1. Mecanismo de ação

Após a injeção de Hidroxiapatita de Cálcio (CaHA) na derme, inicia-se o processo inflamatório inicial. Há uma reação de corpo estranho. Os monócitos são transformados em macrófagos e migram para o local através de dois processos: pela absorção de proteínas da superfície do corpo estranho e adesão dos macrófagos e pela ação das IL-4 e IL-13, produzidos pelos linfócitos tipo TH2. Ocorre a proliferação de fibroblastos ao redor das partículas de CaHA. Os fibroblastos secretam fatores de crescimento,

estimulam a migração de células proliferativas e inflamatórias para a região e mediam a produção de colágeno e matriz extracelular. Na fase proliferativa, tecidos de granulação são formados ao redor das partículas de CaHA. O tecido de granulação é formado por novos vasos sanguíneos, fibroblastos, células inflamatórias, células endoteliais, miofibroblastos e componentes provisórios da matriz extracelular. Novos tecidos são formados ao redor dos macrófagos e CaHA, compostos por novo colágeno produzido pelos fibroblastos, glicosaminoglicanos, fibras reticulares e elásticas, e glicoproteínas. O colágeno do tipo III é formado ao redor das partículas de CaHA e decaem com a degradação da CaHA, sendo substituído pelo colágeno do tipo I. Não é possível ocorrer a calcificação e nem a osteogênese após a aplicação de CaHA na derme por não existirem células progenitoras de osteogênese em tecidos moles (KIM, 2019; VAN LOGHEM; YUTSKOVSKAYA; WERSCHLER, 2015).

De maneira geral, aproximadamente após 9 a 12 meses da injeção, as partículas de hidroxapatita de cálcio são degradadas em cálcio e fosfato e eliminadas pelo sistema renal (DE ALMEIDA *et al.*, 2019a). Porém, é possível observar em alguns casos partículas residuais de CaHA mesmo após 12 meses da injeção inicial (VAN LOGHEM; YUTSKOVSKAYA; WERSCHLER, 2015). Uma semana após a injeção, os fibroblastos começam a envolver os cristais de CaHA. Seis meses após, as microesferas apresentam variação de tamanho devido ao rompimento em resposta a ação do tecido conjuntivo fibroso e estão completamente circundadas por esse tecido. Os cristais de CAHA são completamente absorvidos pelos macrófagos após 24 meses da injeção (LORENC *et al.*, 2018). O uso da CAHA aumenta a produção de colágeno tipo I e elastina após 7 meses da injeção, mesmo quando hiperdiluída. Além disso, aumenta a força de contração dos fibroblastos (DE ALMEIDA *et al.*, 2019b).

3.2.2. Complicações

Apesar da CaHA ser um material biocompatível com o corpo humano, seu uso injetável para fins estéticos de rejuvenescimento, preenchimento e estímulo de colágeno pode acarretar em algumas intercorrências e complicações. As complicações mais comuns são relacionadas ao trauma causado pela injeção do material, como inchaço, hematoma, eritema, dor e coceira. São definidas como reações de injeção local e que resolvem espontaneamente em um curto período de tempo (KADOUCH, 2017).

Os efeitos adversos ou complicações reais, podem ser subdivididas em complicações imediatas, até duas semanas após a aplicação, e complicações tardias, após

duas semanas de aplicação. Comprometimento vascular, assimetrias, aplicações superficiais e nódulos são exemplos de complicações imediatas. Já os granulomas, infecções com biofilmes e migração do material são consideradas complicações tardias. As complicações imediatas não estão relacionadas ao biomaterial em si, mas principalmente à erros de aplicação inerentes à procedimentos injetáveis, sendo as principais o comprometimento vascular e a formação de nódulos (KADOUCH, 2017; KASSIR *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2016).

O comprometimento vascular pode ocorrer quando o produto é indevidamente injetado no interior de uma artéria, ou muitas vezes devido ao grande volume de produto utilizado, causando uma compressão vascular. Essa compressão impede a circulação sanguínea local e compromete a oxigenação tecidual, originando uma isquemia com subsequente necrose. Quando não solucionada, a isquemia evolui para a formação do levedo reticular na pele, acompanhado por retorno capilar lento. Dependendo da extensão da lesão pode levar à necrose de tecido sobrejacente (BRAZ; SAKUMA, 2017; KADOUCH, 2017; SHI *et al.*, 2016). Assim que identificado o comprometimento vascular, a aplicação de hialuronidase, em altas doses, deve ser realizada para minimizar os malefícios causados pela diminuição da oxigenação tecidual (VAN LOGHEM *et al.*, 2020).

Os nódulos podem ser causados por aplicações superficiais do material e erros na técnica de aplicação, sendo classificados como nódulos recentes. Já os nódulos tardios surgem por acúmulo e/ou agregação das partículas por deslocamento. A aplicação de injeções de água estéril e de corticoesteróides interlesional pode ser uma opção para tratamento desses nódulos (KADOUCH, 2017)

Figura 3. Necrose tecidual, inflamação difusa e fibrose exsudato após 11 dias de aplicação de CaHA, com agulha.



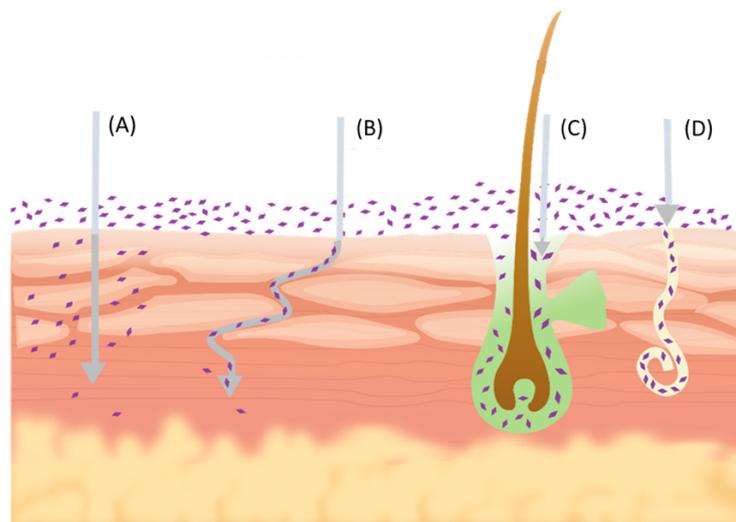
Fonte: TRACY et al., 2014.

3.3. Permeação cutânea

A pele humana funciona como uma barreira semipermeável capaz de regular a entrada de substâncias no organismo. Ela é utilizada como via de administração de medicamentos e cosméticos, visando tanto uma ação local devido a retenção dos fármacos nas suas camadas (epiderme, derme e hipoderme), como uma ação sistêmica, servindo como via transdérmica (OH et al., 2019).

A permeação e penetração passiva de ativos depende das características do fármaco, se restringindo a poucas moléculas, que devem ser capazes de atingir o efeito terapêutico em baixas concentrações, serem pequenas e ligeiramente lipofílicas (GRATIERI et al, 2008). O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme e a primeira barreira contra a permeação, conferindo resistência e impermeabilidade. Dependendo das características físico-químicas do ativo, a substância pode ter sua penetração impedida ou permear a epiderme por meio de três vias de penetração: via intracelular, onde o fármaco irá se difundir em torno dos corneócitos, ficando regularmente no interior da matriz lipídica; via transcelular, onde o fármaco atravessa inteiramente os corneócitos e a matriz lipídica extracelular; via anexos cutâneos, onde o fármaco pode ser absorvido por meio dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (Figura 4) (SHAKER et al, 2019).

Figura 4. Vias de penetração através do estrato córneo: (A) via transcelular, (B) via intercelular, e as vias anexos cutâneos: (C) folículo piloso e glândula sebácea, (D) glândula sudorípara.



Fonte: adaptado de (SHAKER et al., 2019a).

A utilização da nanotecnologia e tecnologia farmacêutica para obtenção de partículas com tamanhos reduzidos, traz benefícios para a permeação passiva e penetração passiva de ativos. Equipamentos e técnicas de secagem, como a técnica de spray drying e de nanospray drying, são amplamente utilizadas para tal fim.

A técnica de spray drying ocorre por meio de secagem por atomização. Ela é utilizada em todas as grandes indústrias, seja química, farmacêutica, biotecnológica e alimentícia, desde a década de 1940. O processo de secagem por atomização se dá em um único passo, através da transformação de um líquido em sólido. Parte-se de uma dissolução, emulsificação ou dispersão de uma dada substância em água ou solvente orgânico. Então o material é atomizado na câmara de secagem, onde o ar de secagem aquecido auxilia a evaporação da água ou solvente orgânico. Produz-se então partículas micrométricas sólidas secas, que são separadas do gás e coletadas pela utilização de forças centrífugas com um ciclone (Figura 5A) (BÜCHI, 2023; STROJEWSKI; KRUPA, 2022).

Esta técnica pode ser utilizada tanto para redução de tamanho de partícula como para o encapsulamento de algumas substâncias. Possui como principais vantagens ser um processo de etapa única, simples e com baixo custo, além de ser rápido e passível da sua utilização em escala industrial. O processo de secagem de maneira rápida evita a degradação do ativo em questão e dos materiais encapsulados, permitindo a conservação de suas propriedades após o processo de formação das partículas (SILVA *et al.*, 2003; SOSNIK; SEREMETA, 2015).

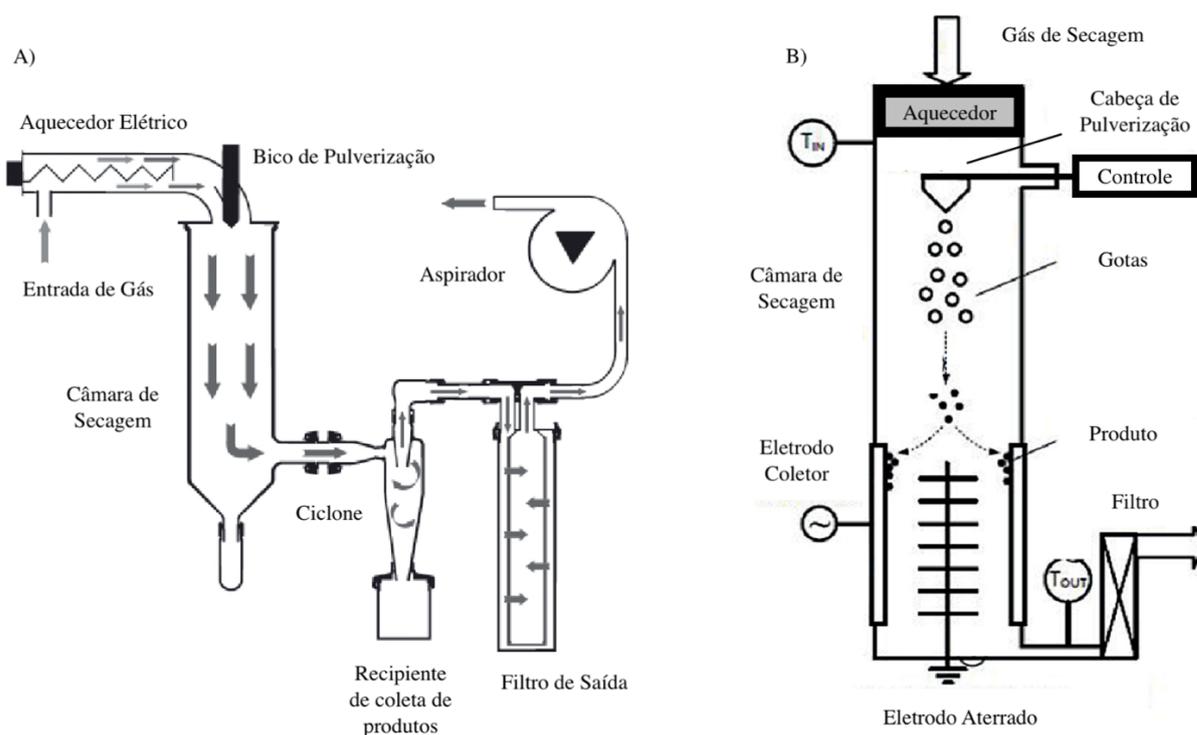
Porém, os equipamentos convencionais de spray drying não possibilitam a produção de partículas de tamanho nanométrico. Os atomizadores comuns são incapazes

de gerar minúsculas gotículas para conversão em nanopartículas. Além disso, o fluxo de gás dentro da câmara de secagem não pode ser tão alto para a coleta eficaz das nanopartículas secas. Para tal, é necessária a utilização de equipamentos específicos de nanospray drying (ASSADPOUR; MAHDI JAFARI, 2019).

A técnica de nanospray drying permite a obtenção de nanopartículas, com morfologia e distribuição de tamanho de partícula adequadas, podendo ser utilizada tanto para nanoencapsulação de ativos, como apenas para sua redução de tamanho a escala nanométrica. Além disso, possibilita sua mudança estrutural, proporcionando a transição de uma substância cristalina para sua fase amorfa (STROJEWSKI; KRUPA, 2022) Trata-se de um processo de secagem por pulverização dividido em três etapas que necessitam ser realizadas em sequência. Primeiramente, há o estabelecimento de um circuito de gás de secagem para formar o fluxo de gás que acompanha o líquido pulverizado. Em seguida inicia-se o processo de formação de partículas e por último realiza-se sua coleta (BÜCHI, 2017).

A secagem por pulverização ocorre dentro de um cilindro de secagem. As microgotas do material da amostra são ejetadas pelo nebulizador, com precisão, no cilindro de pulverização em um fluxo de gás de secagem quente pré-estabelecido, permitindo sua secagem em partículas sólidas. O eletrodo coletor então recupera as partículas secas usando um campo elétrico gerado entre o eletrodo coletor e o eletrodo aterrado. O eletrodo aterrado desvia as partículas e o eletrodo coletor as atrai, permitindo que as partículas sólidas secas se acumulem no seu interior para posterior coleta. Por fim, o gás de exaustão sai do secador por spray através do filtro de saída, que retém as partículas livres do gás (Figura 5B) (BÜCHI, 2017).

Figura 5. Esquema comparativo dos equipamentos de spray dryer (A) e nanospray dryer (B).



Fonte: adaptado de (STROJEWSKI; KRUPA, 2022)

Além da produção de partículas de tamanho reduzido, o uso de algumas técnicas facilita a permeação cutânea de ativos. A iontoforese é uma técnica não-invasiva, na qual há a aplicação de uma corrente elétrica de fraca intensidade a fim de facilitar e controlar a penetração de diversos fármacos, carregados ou não, através de membranas biológicas. Uma fonte de energia ou bateria gera corrente elétrica de baixa intensidade, que é distribuída com o auxílio de eletrodos positivo e negativo por meio de uma solução eletrolítica para a pele e corrente sanguínea. Para otimizar o transporte iontoforético é necessário adequar dispositivos iontoforéticos e formulações compatíveis com eles, isto porque o transporte de íons é dependente de vários fatores relacionados ao dispositivo iontoforético e à formulação utilizada. Sendo assim, o fluxo iontoforético de um fármaco pode ser aumentado através da alteração de fatores elétricos, como a densidade e a natureza da corrente e o tipo de eletrodo utilizado. Na formulação podem ser modificados a concentração do fármaco, a concentração de outros íons, o pH e a força iônica (GRATIERI *et al.*, 2008; MATOS *et al.*, 2017).

Com o uso da iontoforese o estrato córneo deixa de ser a principal barreira de penetração de moléculas, que passam a utilizar vias alternativas de baixa resistência, como os folículos pilosos e glândulas sudoríporas, ampliando o uso de outros ativos em

formulações tópicas. As formulações devem ser sempre hidrofílicas, sendo assim capazes de conduzir a corrente elétrica (GRATIERI et al., 2008).

Outra forma de facilitar a permeação de diversos fármacos é por meio da utilização da técnica de microagulhamento. A aplicação de microagulhas permite a permeação de moléculas de alto peso molecular de maneira minimamente invasiva e segura pela pele, direcionando e controlando a liberação do fármaco para o sítio de ação desejado por longos períodos. Utiliza-se diversos tipos de microagulhas, entre elas as microagulhas sólidas. Elas são utilizadas visando criar microporos no estrato córneo e na epiderme viável, facilitando a liberação e permeação de fármacos (REIS *et al.*, 2014). O microagulhamento, isolado ou em conjunto com outros promotores de permeação, aumenta consideravelmente a permeação de moléculas tanto em experimentos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* (TUAN-MAHMOOD *et al.*, 2013).

Desse modo, a aplicação de iontoforese e microagulhamento juntamente com as formulações desenvolvidas contendo CaHA proporcionaria um aumento da permeação desse ativo, facilitando sua ação no estímulo a produção de colágeno após aplicação tópica.

4. MATERIAL

A Hidroxiapatita de cálcio de 10 μm comercial foi adquirida na Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A lactose, o amido e o ácido acético utilizados para produção das micropartículas e nanopartículas foram adquiridas pela Dinâmica Química Contemporânea Ltda (São Paulo, Brasil) e Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O padrão de cálcio para ICP foi adquirido na Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio foram adquiridos pela Dinâmica Química Contemporânea Ltda (São Paulo, Brasil). Os filtros pré-limpos, de diâmetro 25 mm e poro 0,45 μm hidrofílicos foram comprados da Analítica (São Paulo, Brasil). Todas as análises foram realizadas com água ultrapura (Millipore, França).

Para os testes *in vitro* com fibroblastos humanos e queratinócitos (HaCat), o MTT (brometo de 3-(4,5dimetil-2-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólio) foi obtido de Sigma Chemicals (Co. St. Louis, EUA). O meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o soro fetal bovino, o trizol e o azul de tripan foram obtidos da Gibco (Estados Unidos). A Penicilina/estreptomicina foram obtidos pelo Invitrogen (Grand Island, NY, EUA). O tampão fosfato (PBS) e a tripsina na Sigma-Aldrich (Alemanha). O etanol foi adquirido na Dinâmica Química Contemporânea Ltda (São Paulo, Brasil). O iodeto de propídio 20

$\mu\text{g/mL}$ foi adquirido na Probes, Thermo Fisher (EUA). O álcool isopropílico foi adquirido na Merck (Alemanha).

Para as análises de expressão gênica, o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription, o Oligo dT (12-18) primer, a RNase e os inibidores de Rnase (Rnase OUT) foram adquiridos na Invitrogen (EUA). Os reagentes padronizados para PCR em tempo real (SYBR™ GoTaq MasterMix) foram adquiridos na Promega Corporation (EUA).

Para estudos histológicos, álcool absoluto, corantes eosina e hematoxilina da Bio Express (São Paulo, Brasil), formaldeído da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (São Paulo, Brasil), parafina da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e xilol da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

5. METODOLOGIA

5.1. Obtenção de nanopartícula e micropartícula

Para a obtenção das nanopartículas e micropartículas, utilizou-se soluções contendo 0,25% de CaHA (Commercial CaHA), de diâmetro hidrodinâmico 10 μm , solubilizada em água acidificada com ácido acético (pH 3). As formulações foram testadas apenas com Commercial CaHA e com aerosil, sacarose, amido e lactose monohidratada 10% (m.m).

Tabela 1. Siglas adotadas para as partículas obtidas e sua forma de obtenção

Sigla	Correspondência
Commercial CaHA	Hidroxiapatita de cálcio comercial de 10 μm de diâmetro hidrodinâmico
Nano CaHA	Hidroxiapatita de cálcio obtida pela técnica de nanospray drying
Nano CaHA Lac Mix	Hidroxiapatita de cálcio obtida pela técnica de nanospray drying adicionada de lactose posteriormente a secagem
Nano CaHA Lac	Hidroxiapatita de cálcio adicionada de lactose, pulverizadas e secas em conjunto pela técnica de nanospray drying
Micro CaHA	Hidroxiapatita de cálcio adicionada de lactose, atomizadas e secas em conjunto pela técnica de spray drying

5.1.1. Nanospray drying

As nanopartículas foram produzidas pela técnica de secagem por pulverização por nanospray drying. Para tal, utilizou-se soluções contendo 0,25% de Commercial CaHA, de diâmetro hidrodinâmico 10 μm , solubilizada em água acidificada (pH 3), com ou sem adição de lactose ou amido previamente a secagem. Utilizou-se o Nanospray Dryer B-90 (Buchi Laborthechnik, Essen, Alemanha) operando em modo aberto, com os seguintes parâmetros: malha de pulverização = 4 μm ; pump = 20%; spray = 70%; temperatura = 110°C, baseando-se no ponto de evaporação da água.

5.1.2. Spray drying

As micropartículas foram produzidas pela técnica de atomização e secagem por spray drying. Para tal, utilizou-se soluções contendo 0,25% de Commercial CaHA, de diâmetro hidrodinâmico 10 μm , solubilizada em água acidificada (pH 3), com adição de lactose previamente a secagem. Utilizou-se o Spray Dryer modelo MSD 0.5 L (Labmaq, Brasil) com os seguintes parâmetros: fluxo = 0,35 L/h; fluxo do ar de secagem = 0,63 m^3/min ; temperatura de entrada = 110 °C; temperatura de saída = 70 °C.

5.2. Caracterização de nanopartícula e micropartícula

Todas as partículas obtidas foram caracterizadas quanto a morfologia e as nanopartículas também tiveram seu tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta mensurados.

5.2.1. Morfologia

A morfologia das nanopartículas e micropartículas obtidas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As diferentes partículas foram colocadas em um suporte composto por liga metálica de cobre e zinco e revestidas com ouro, previamente a análise. A análise foi realizada no equipamento JSM-7001F (JEOL, Japão).

5.2.2. Tamanho, potencial zeta e PdI

Todas as amostras foram dispersas em etanol na proporção de 1:100, em etanol. O potencial zeta de todas as partículas desenvolvidas foi analisado por meio da

determinação da mobilidade eletroforética das gotículas. O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão foram mensurados por meio do espalhamento de luz dinâmico. A análise foi realizada pelo equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA).

5.3. Análise térmica

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada pelo equipamento DSC-60 (Shimadzu, Japão) a uma taxa de aquecimento de 20 °C/min de 25 a 200 °C, utilizando amostras de 3 a 5 mg em pans de alumínio. Utilizou-se o equipamento DTG-60H (Shimadzu, Japão) para análise termogravimétrica (TGA), a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 500 °C com a mesma quantidade de amostra da análise anterior, em pans de platina. Todas as análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min.

5.4. Ensaios *in vitro* com fibroblastos humanos

Para ensaios de viabilidade celular, fragmentação de DNA e de expressão de genes relacionados à síntese de colágeno e processo inflamatório, foram utilizadas culturas de fibroblastos humanos de cultura primária, adquiridas pelo protocolo aceita no comitê de ética em pesquisa número 30175020.0.0000.5558.

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, EUA), suplementado com 10% v.v. de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, EUA), além de 1 % v.v. de solução de penicilina/estreptomicina (1.000 U/mL) (Invitrogen, Grand Island, NY). As células foram mantidas em estufa a 5 % de CO_2 , 37 °C e 95 % de umidade.

5.4.1. Viabilidade celular em fibroblastos humanos por MTT

Para determinação da toxicidade e concentração de uso, realizou-se ensaio de viabilidade celular em culturas de fibroblastos humanos através da análise da redução do sal MTT em cristais de formazan pela ação de desidrogenases mitocondriais. 2×10^4 células foram plaqueadas em poços de placa de 96 poços (TPP, EUA) e mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% v.v de SBF e 1% v.v. de solução de penicilina/estreptomicina (1.000 U/mL), em estufa a 5% de CO_2 , a 37°C e 95% de umidade. Foram adicionadas Commercial CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac, Micro CaHA e Lactose em concentrações de 0,25% a 0,0020%, diluídas

a partir de uma solução estoque de 1% de suspensão em água destilada estéril, para tratamento das células. O controle de 100% de viabilidade celular foi representado por poços de célula sem nenhum tratamento, incubadas apenas com DMEM. Os tratamentos foram mantidos por dois tempos distintos: 24 e 48 horas. Cada grupo experimental foi avaliado em triplicata. Em cada período de tratamento (24 e 48 horas) foram realizadas duplicatas do ensaio de MTT.

Após o período de incubação (24 e 48 horas) com o tratamento, o sobrenadante de cada poço foi removido, o poço foi lavado com PBS (tampão fosfato-salino) e posteriormente foi adicionado 135 μL de DMEM com 15 μL de MTT na concentração de 5 mg/mL. As placas de cultura foram então incubadas por 2 horas protegidas da luz, a 37 °C (5 % de CO_2 e 95 % de umidade). Após esse período, os cristais de formazan foram solubilizados e homogeneizados com a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) em volume de 150 μL por poço. Por conta da deposição de partículas no fundo dos poços da placa, antes da leitura da absorbância, 120 μL da solução de cristais de formazan diluídos de cada poço foram transferidos para uma nova placa. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Bio-Tec PowerWave, HT, EUA) a 595 nm. A análise foi realizada após a dedução da densidade óptica obtida no branco (DMSO) e normalização em relação ao controle de 100% de viabilidade.

5.4.2. Viabilidade celular por integridade de membrana plasmática

Para confirmação da viabilidade celular na concentração escolhida, foi avaliada a integridade da membrana plasmática pelo ensaio de azul de tripan. $1,2 \times 10^5$ células de fibroblastos humanos foram plaqueadas em poços de placa de 24 poços (TPP, EUA) e mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% v.v de SBF e 1% v.v de solução de penicilina/estreptomicina (1.000 U/mL), em estufa a 5% de CO_2 , a 37°C e 95% de umidade. Foram adicionadas Commercial CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac, Micro CaHA e Lactose na concentração de 0,065%, diluídas a partir de uma solução estoque de 1% de suspensão em água destilada estéril, para tratamento das células. O controle de 100% de viabilidade celular foi representado por poços de célula incubadas com DMEM. Os tratamentos foram mantidos por 48 horas. Cada grupo experimental foi avaliado em triplicata.

Após 48 horas de tratamento, as células foram colhidas por tripsinização, centrifugadas e o pellet obtido foi ressuspenso em 100 μL de DMEM. As células foram então coradas com solução de azul de tripan a 0,4%, diluídas em PBS (Sigma, EUA). O

número de células totais foi determinado em câmara de Neubauer, dividindo-se em células coradas ou não coradas. Células não coradas foram consideradas células com membrana intacta. Já as células coradas de azul, com membranas plasmáticas danificadas.

5.4.3. Citometria de fluxo

Para realização dos testes de análise morfológica, ciclo celular e fragmentação de DNA por citometria de fluxo, $1,2 \times 10^5$ células de fibroblastos humanos de cultura primária foram plaqueados em poços de placa de 24 poços (TPP, EUA) e mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% v.v de SBF e 1% v.v. de solução de penicilina/estreptomicina (1.000 U/mL), em estufa a 5% de CO_2 , a 37°C e 95% de umidade. Foram adicionadas todas as partículas obtidas previamente, Commercial CaHA e lactose na concentração de 0,065%, diluídas a partir de uma solução estoque de 1% de suspensão em água destilada estéril, para tratamento das células. O controle de 100% de viabilidade celular foi representado por poços de célula incubadas com DMEM. Os tratamentos foram mantidos por 48 horas. Cada grupo experimental foi avaliado em triplicata.

Após o período de tratamento, as células foram ressuspensas em 1 mL de etanol frio (70%) e armazenadas a - 20 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionou-se 100 µL de RNase (50 µg/mL) por 30 min a 37 °C, protegidas da luz. Em seguida, foram adicionados 100 µL de iodeto de propídio 20 µg/mL (Probes, Thermo Fisher, EUA), diluído em PBS, e as amostras foram incubados por 30 min em temperatura ambiente, protegidas da luz. A morfologia, fragmentação do DNA e o ciclo celular foram analisados por um citômetro de fluxo (BD FACS-Verse™, EUA) usando o canal PI. Um total de 10.000 eventos foram coletados por amostra.

5.4.4. Avaliação da expressão gênica preliminar

Para análise dos genes colágeno 1 (COL 1), colágeno 4 (COL 4), colágeno 6 (COL 6), interleucina 10 (IL-10), interferon gama (INF- γ) e do gene constitutivo Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle, foi realizado após as 48 horas de tratamento dos fibroblastos humanos para o ensaio da avaliação do potencial indutor de produção de colágeno da Commercial CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose, o isolamento do RNA total das células de cada condição utilizando-se o reagente Trizol (Gibco) e seguindo-se as instruções do fabricante.

O meio foi retirado dos poços onde foram cultivadas as células e 1 mL de Trizol adicionado. o Trizol foi adicionado a eppendorfs DNA-RNase free de 1,5 mL após sucessivas pipetagens, afim de promover a lise das células. Em seguida, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio a cada tubo e realizou-se vigorosa agitação. Os tubos foram encubados a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos e realizou-se centrifugação por 15 minutos a 4 °C e 13000 rpm. A fase superior (aquosa) foi coletada e o RNA foi precipitado com adição de álcool isopropílico (Merck, Alemanha) por 10 minutos. Posteriormente uma nova centrifugação foi realizada a 4°C e 13000 rpm por 10 minutos. Realizou-se lavagem com etanol 75% (Merck, Alemanha), seguida de centrifugação de 10 minutos a 4 °C e 7500 rpm. O RNA foi diluído em água MilliQ autoclavada. A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm em equipamento Nanodrop (Thermofisher, EUA). As proporções de absorbância 260/280 e 260/230 foram realizadas com o intuito de se avaliar a pureza das amostras. As amostras de RNA passaram por reação de transcrição utilizando-se o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

A transcrição reversa do RNA total isolado foi realizada utilizando 1 μ g de RNA total de cada amostra, transcriptase reversa (Superscript III, Invitrogen, EUA) e Oligo dT (12-18) primer (Invitrogen, EUA) em presença de inibidores de Rnase (Rnase OUT, Invitrogen, EUA) em um volume final de 20 μ L, sendo a ordem e as etapas de incubação realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante dos reagentes. As amplificações por qPCR foram realizadas em duplicatas. As reações foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real (SYBR™ GoTaq MasterMix, Promega) adicionados dos conjuntos de primers específicos para cada gene. As amplificações foram realizadas pelo equipamento QuantStudio1 e os dados, analisados pelo StepOne Software v2.3.

Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes de variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de CT, se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção escolhido. Os resultados individuais expressos em valores de CT foram transferidos para planilhas para realização da análise por $2^{-\Delta\Delta CT}$.

5.5. Seleção de partícula para estudos subsequentes

Afim de prosseguir com os experimentos relacionados ao estímulo de produção de colágeno comparado ao Radiesse®, CaHA utilizada de maneira injetável, e com estudos de permeação cutânea *in vitro* e irritabilidade cutânea, a partícula de melhor desempenho foi selecionada.

5.6. Ensaios *in vitro* com fibroblastos humanos e células mononucleares de sangue periférico

Para ensaios de viabilidade celular, expressão de genes relacionados à síntese de colágeno e processo inflamatório e produção de colágenos foram utilizadas culturas de fibroblastos humanos de cultura primária, adquiridas pelo protocolo aceita no comitê de ética em pesquisa número 30175020.0.0000.5558 e células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

Os fibroblastos humanos foram cultivados em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, EUA), suplementado com 10% v.v. de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, EUA), além de 1 % v.v. de solução de penicilina/estreptomicina (1.000 U/mL) (Invitrogen, Grand Island, NY). As PBMC foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Alemanha), suplementado com 10% v.v. de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, EUA), além de 1 % v.v. de solução de penicilina/estreptomicina (1.000 U/mL) (Invitrogen, Grand Island, NY). Ambas as linhagens foram mantidas em estufa a 5 % de CO_2 , 37 °C e 95 % de umidade.

5.6.1. Isolamento das PBMC

Para cultivo das PBMC, foi necessária a realização do isolamento prévio das células a partir do sangue total. Para tal, utilizando uma pipeta sorológica, transferiu-se todo o volume de sangue total coletado para um tubo falcon de 50 mL. Em seguida, diluiu-se o sangue total em PBS 1x em uma proporção 1:2 e homogeneizou-se a amostra lentamente com auxílio de uma pipeta sorológica. Em um tubo falcon de 15 mL, adicionou-se 3 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, Alemanha) e, posteriormente, adicionou-se lentamente 8 mL do sangue diluído, de maneira a não permitir que ambos se misturem.

Após a adição do sangue total, centrifugou-se a amostra a 1100 rpm durante 25 minutos a temperatura ambiente. Com o auxílio de pipeta Pasteur, separou-se o halo de células mononucleares em tubos falcon de 50mL e adicionou-se PBS 1x afim de dobrar

o volume de amostra. Em seguida, centrifugou-se novamente a amostra a 1200 rpm durante 10 minutos. Descartou-se então o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 5 mL de PBS 1x. Em seguida, centrifugou-se novamente a amostra nas mesmas condições. Descartou-se mais uma vez o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 1000 μ L de meio RPMI. Realizou-se então a contagem celular com auxílio da câmara de Neubauer.

5.6.2. Viabilidade celular em fibroblastos humanos e PBMC

Para determinação da toxicidade e concentração de uso, realizou-se ensaio de viabilidade celular em culturas de fibroblastos humanos e PBMC através da análise da redução do sal MTT em cristais de formazan pela ação de desidrogenases mitocondriais. 7×10^3 fibroblastos humanos e $2,5 \times 10^5$ PBMC foram plaqueadas em poços de placa de 96 poços (TPP, EUA) e mantidas em meio de cultura DMEM e RPMI suplementados com 10% v.v de SBF e 1% v.v. de solução de penicilina/estreptomicina (1.000 U/mL), respectivamente, e mantidas em estufa a 5% de CO_2 , a 37°C e 95% de umidade. Foram adicionadas Nano CaHA Lac e Radiesse® em concentrações de 0,25% a 0,0020%, diluídas a partir de uma solução estoque de 1% de suspensão em água destilada estéril, para tratamento das células. O controle de 100% de viabilidade celular foi representado por poços de célula sem nenhum tratamento, incubadas apenas com meio de cultura. Os tratamentos foram mantidos 48 horas. Cada grupo experimental foi avaliado em triplicata.

Após o período de incubação, realizou-se a análise de viabilidade celular conforme descrito no item 5.4.1.

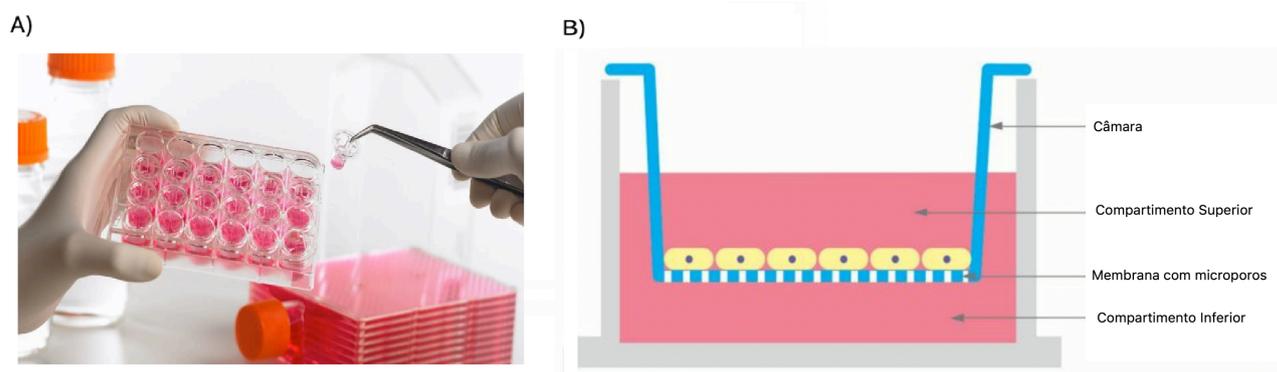
5.6.3. Avaliação da expressão gênica

Para análise dos genes colágeno 1 (COL 1), colágeno 3 (COL 3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e do gene constitutivo Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle, foi realizada o co-cultivo dos fibroblastos humanos e PBMC com posterior tratamento com Nano CaHA Lac e Radiesse® a 0,0313% (m.v.). Para tal, utilizou-se um *transwell* com poro de 0,4 μ m de tamanho de poro em placa de 12 poços, onde plaqueou-se 7×10^3 células de fibroblastos humanos fora da câmara e $2,5 \times 10^6$ de PBMC dentro da câmara. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Alemanha), suplementado com 10% v.v. de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, EUA), além de 1 % v.v.

de solução de penicilina/estreptomicina (1.000 U/mL) (Invitrogen, Grand Island, NY) com volume final de 1500 μ l, sendo 500 μ L dentro câmara e 1000 μ l fora da câmara.

Após 48 horas de tratamento, foi realizado o isolamento do RNA total das células de cada condição utilizando-se o reagente Trizol (Gibco) e seguindo-se as instruções do fabricante, conforme descrito no item 5.4.4.

Figura 6. *Transwell*: (A) Placa de 12 poços com *transwell*; (B) Esquema ilustrativo



Fonte: https://www.corning.com/tw/zh_tw/products/life-sciences/products/permeable-supports/transwell-snapwell-netwell-falcon-permeable-supports.html

5.6.4. Avaliação de produção de colágeno

Para avaliação da produção de colágeno, 2×10^5 células de fibroblastos humanos de cultura primária foram plaqueados em poços de placa de 24 poços (TPP, EUA) e mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% v.v de SBF e 1% v.v. de solução de penicilina/estreptomicina (1.000 U/mL), em estufa a 5% de CO_2 , a $37^\circ C$ e 95% de umidade. Foram adicionadas as Nano CaHA Lac e o Radiesse® na concentração de 0,0313%, diluídas a partir de uma solução estoque de 1% de suspensão em água destilada estéril, para tratamento das células. O controle negativo foi representado por poços de célula incubadas com DMEM, sem tratamento, e o controle positivo por células tratadas com ácido ascórbico. Os tratamentos foram mantidos por 48 horas em triplicata.

Após as 48 horas de tratamento, coletou-se o sobrenadante das células e o reservou para posterior manejo. Adicionou-se então 2 mL de PBS em cada poço e realizou-se a raspagem da camada celular com auxílio de um *cell scraper*. As células suspensas em PBS foram então coletadas e as amostras de sobrenadante e raspado da camada celular foram sonicadas 3 vezes por 15 segundos em sonicador X, com intervalos de 30 segundos, amplitude de 50% (3000 rpm) e mantidas em gelo.

Em seguida, 9 mL de solução aquosa saturada a 25% de sulfato de amônio foi adicionada aos tubos sonicados e a solução mantida sob agitação constante por 24 horas a 4 °C. As soluções foram centrifugadas a 40.000 x g por 30 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes descartados. Posteriormente, os pellets foram solubilizados em 2 mL de ácido acético 0,5 M. Adicionou-se então 1 ml da solução corante Sirius Red (100 µg/mL) a 100 µl das amostras do raspado da camada celular e do sobrenadante, agitando a solução no vortex por 5 segundos.

Após repouso de 30 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 30.000 x g rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O pellet foi eluído em 1 mL de hidróxido de potássio (KOH) a 0,1 M e adicionou-se 100 µL de cada amostra em uma placa de 96 poços.

Uma curva padrão de colágeno tipo I foi produzida a partir da diluição do padrão de colágeno (Sigma) em corante Sirius Red (100 µg/mL), onde adiciona-se 200 µL da diluição nos poços e realiza-se uma diluição seriada (100 µL) em 100 µL ácido acético 0,5M nos demais poços. Para a análise da absorbância, a leitura foi realizada em leitor de microplacas (Bio-Tec PowerWave, HT, EUA) a 540 nm.

5.7. Microagulhamento em pele de orelha de porco

Visando a posterior avaliação da permeação da CaHA após a realização da técnica de microagulhamento como promotor de permeação, foi realizada a padronização da técnica em pele de orelha de porco e posterior análise de sua histologia.

Utilizando o dispositivo de microagulhamento automático (dermapen), foram realizados microfuros na pele de orelha de porco, contendo tecido adiposo, derme, epiderme e folículos pilosos, após a passagem das microagulhas automatizadas durante 10 vezes em sentido perpendicular a pele com profundidades pré-determinadas em 0,25 mm, 0,5 mm, 1,0 mm, 1,5 mm e 2,0 mm.

As microagulhas automatizadas foram previamente embebidas em corante para observação macroscópica da profundidade da lesão. Após a realização do protocolo, as peles foram lavadas com água ultrapura para retirada do excesso do corante.

5.8. Análise histológica da pele de orelha de porco danificada

Análises histológicas da pele intacta e das peles danificadas foram conduzidas para comparação do grau da lesão em comparação à profundidade pré-determinada. Para isso, todas as amostras foram imediatamente fixadas em formol tamponado a 4% por 24 h e armazenadas em temperatura de 4°C. Uma vez fixadas, as amostras foram transferidas para etanol a 70%, permanecendo por 30 minutos. Após esse período as amostras foram transferidas para etanol a 90% por mais 30 minutos e, assim, esse mesmo procedimento foi realizado por mais 3 vezes para a solução etanólica 100%.

O etanol foi então substituído por uma mistura de xilol:etanol (1:1) por 30 minutos e, posteriormente, a mistura de xilol:etanol foi substituída por xilol em 3 ciclos de 30 minutos cada um. Logo em seguida, os tecidos foram embebidos em parafina. Os blocos de parafina resultantes foram cortados em micrótomo (3 μ m) montado em lâminas de vidro e corado com hematoxilina e eosina.

5.9. Método Analítico

Afim de quantificar o cálcio contido na CaHA em estudos de permeação cutânea, realizou-se a validação de método analítico pela técnica de espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS), utilizando um espectrômetro de absorção atômica de chama Varian AA 240FS (Agilent Technologies, EUA) com uma fonte de chama de ar-acetileno, suporte de óxido nítrico e lâmpada de cálcio com 422,7 nm de comprimento de onda, em pele de orelha de porco e em ácido nítrico 2%.

5.9.1. Preparo de solução estoque

Soluções estoque de cálcio foram preparadas com em ácido nítrico 2%, em triplicata, em concentrações de 10 μ g/mL, utilizando solução padrão de cálcio para ICP (Sigma-Aldrich, Alemanha). Essas soluções foram mantidas em geladeira (2° – 8°C) para posterior utilização na validação do método analítico.

5.9.2. Digestão da pele de orelha de porco

Realizou-se a digestão da matriz biológica pela técnica adaptada de decomposição de óleos para análise de metais por FAAS ou ICP (EPA, 1996). Para isso, as peles de orelha de porco, previamente separadas do tecido adiposo, foram cortadas em pequenos pedaços e colocadas em contato com 4,5 mL de ácido sulfúrico e 1,5 mL de peróxido de

hidrogênio por 15 minutos, sob agitação magnética, originando uma forte reação exotérmica. Em seguida, 2 mL de ácido nítrico foram adicionados e a solução foi mantida em agitação magnética por 5 minutos. Objetivando completar a reação de digestão da matriz biológica, 10 mL de ácido clorídrico foram adicionados e a solução permaneceu sob aquecimento a 80 °C e agitação magnética por 1 hora e 30 minutos.

Após o processo de digestão, as soluções foram transferidas para um balão volumétrico de 25 mL e seu volume completado com água MilliQ (Illkirch Graffenstaden, France). A amostra foi então diluída em ácido nítrico 2% e filtrada em filtro hidrofílico PTFE 0,45 µm previamente a análise em FAAS.

5.9.3. Validação de método analítico

O método foi validado baseado nas diretrizes do *International Conference of Harmonisation* (ICH) M10 para validação de método bioanalítico e a RDC N° 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), considerando os parâmetros de linearidade, efeito matriz, seletividade, precisão e exatidão.

5.9.3.1. Linearidade e Efeito Matriz

Análises quantitativas envolvendo matrizes complexas como matriz biológica são passíveis de interferência na quantificação dos analitos envolvidos, gerando um possível efeito matriz. Por essa razão, afim de minimizar erros experimentais, duas curvas analíticas foram construídas, em triplicata, a partir da solução estoque nas concentrações 0,0; 0,4; 0,8; 1,0, 1,25 e 2,0 µg/mL, sendo uma utilizando ácido nítrico 2% como solvente e outra acrescida de 0,5 mL de pele digerida conforme item 5.6.2 ao solvente.

As curvas analíticas foram obtidas de acordo com a relação entre a concentração da amostra injetada e a absorbância fornecida pelo equipamento. Os dados foram ajustados pelo método de regressão linear, originando uma reta no formato $y = ax + b$, em que (a) corresponde ao coeficiente angular da reta e (b) ao coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear (r), e o método foi considerado linear ou não de acordo com o parâmetro mínimo aceitável de $r = 0,99$ (ANVISA, 2017).

Para determinar a significância do efeito matriz que os interferentes poderiam causar na sinalização, avaliou-se o paralelismo entre as duas curvas analíticas construídas (ANVISA, 2017). Adicionalmente, foi realizada a quantificação em triplicata

dos pontos 0,2 e 1,25 µg/mL, ponto baixo e ponto alto respectivamente, a partir da solução estoque, utilizando ácido nítrico 2% acrescido de 0,5 mL de seis lotes de pele de orelha de porco distintas, digeridas conforme item 5.6.2 (ICH, 2022).

5.9.3.2. Seletividade

Para avaliar a seletividade do método analítico, utilizou-se amostras obtidas de seis matrizes biológicas individuais e distintas após processo contido no item 5.6.2. As amostras continham 0,2 µg/mL solução estoque padrão, ponto mínimo da curva analítica da matriz biológica, acrescida de 0,5 mL das seis matrizes biológicas individuais e distintas após processo de digestão contido no item 5.9.2. Afim de garantir a seletividade do método, as respostas atribuíveis a componentes interferentes não devem ser superiores a $\pm 20\%$ da concentração teórica.

5.9.3.3. Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração que um analito pode ser detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificado como um valor exato. É determinado por cálculo teórico (ICH, 2005) a partir das curvas de calibração por meio da Equação 1:

$$LD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S}$$

(Equação 1)

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão. Assim como o LD, é determinado por cálculo teórico por meio da Equação 2:

$$LQ = 10 \times \frac{\sigma}{S}$$

(Equação 2)

Em ambas as equações: σ é o desvio padrão dos valores de intercepção do eixo y , e S é o coeficiente angular.

5.9.3.4. Precisão e Exatidão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade (intra-ensaio) foi verificada a partir de amostras preparadas em cinco níveis de concentração da curva de calibração na matriz: 0,2; 0,4; 0,6; 1,0 e 1,25 µg/mL em triplicata. Já a precisão intermediária (inter-ensaio) foi avaliada em dias distintos pelo mesmo analista. As mesmas concentrações foram utilizadas e em triplicata. A exatidão do método foi determinada para as concentrações analisadas no ensaio de precisão. Foi verificado o grau de concordância entre os resultados individuais do método proposto em relação a um valor teórico tido como verdadeiro.

Os resultados de precisão foram expressos por meio do coeficiente de variação (CV), calculado de acordo com a Equação 3, e a exatidão foi expressa a partir da razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica.

$$CV = \left(\frac{\sigma}{m} \right) \times 100$$

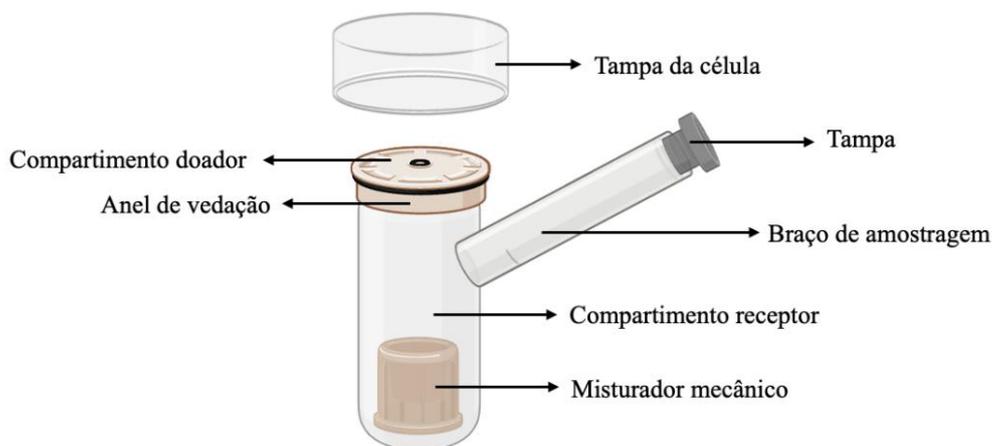
(Equação 3)

Onde: σ é o desvio padrão dos resultados obtidos e m é a média

5.10. Avaliação *in vitro* de permeação cutânea do Hidroxiapatita de Cálcio

Os estudos de permeação *in vitro* foram realizados em células de difusão verticais com área de difusão de 1,5 cm² acopladas ao sistema Phoenix®DB-6 (Teledyne Hanson Inc., Chatsworth, CA, EUA) em três condições distintas: passiva, com iontoforese e após microagulhamento automático com microagulhas de 2,0 mm de comprimento.

Figura 7. Representação da célula de difusão do tipo Phoenix™.



Fonte: COSTA, 2023.

5.10.1. Permeação Passiva

As células foram montadas com as peles de orelha suína com o estrato córneo voltado para cima. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 e o compartimento doador foi preenchido com 1000 μ L das suspensões de Nano CaHA Lac 1% (m.v.) em tampão fosfato pH 7,4. Após a aplicação das formulações, as células foram mantidas em condições de temperatura a 32 ± 1 °C, sob agitação magnética a 300 rpm por um período de 12 horas. Este ensaio foi realizado em sextuplicata.

Após o ensaio de permeação, as peles totais passaram pelo processo de digestão conforme item 5.9.2 e a hidroxiapatita de cálcio foi quantificada por FAAS conforme método previamente validado e descrito no item 5.9.

5.10.2. Iontoforese

5.10.2.1. Preparo de eletrodos

Os ensaios de permeação cutânea in vitro foram conduzidos com utilizando eletrodos positivos de prata (Ag) e negativos de cloreto de prata (AgCl). Para o preparo, fios de prata de aproximadamente 4 cm foram cortados e uma das pontas foi dobrada para formar uma alça. Inicialmente, foram obtidos os eletrodos de AgCl, em que as alças dos fios de prata foram imersas no AgCl fundido em um cadinho de porcelana e o processo foi repetido até que se formasse um depósito do AgCl na alça. Em seguida, para se obter os eletrodos de Ag (Figura 10B), parte dos eletrodos de AgCl foram montados em circuito elétrico. Esses eletrodos de AgCl foram colocados no cátodo (-) e fios de platina foram colocados no ânodo (+) e submersos em solução salina saturada. Após a montagem do circuito, a fonte de energia ficou ligada durante 24 horas com corrente elétrica ajustada para 0,2 mA. Dessa forma, o AgCl foi reduzido à Ag, formando um depósito de Ag no eletrodo (REIS et al., 2019).

5.10.2.2. Permeação com iontoforese

O experimento de permeação com iontoforese foi conduzido com aplicação de corrente elétrica conduzida com auxílio de eletrodos Ag/AgCl positivos e negativos (GREEN et al., 1991; MATOS et al., 2020). As células foram montadas com as peles de orelha suína com o estrato córneo voltado para cima. O compartimento receptor foi

preenchido com 15 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 e o compartimento doador foi preenchido com 1000 µL das suspensões de Nano CaHA Lac 1% (m.v.) em tampão fosfato pH 7,4. Após a aplicação das suspensões, as células foram mantidas em condições de temperatura a 32 ± 1 °C, sob agitação magnética a 300 rpm. O transporte de Nano CaHA Lac do compartimento anódico foi realizado durante um período de 6 horas a uma densidade de corrente constante de 0,5 mA/cm². Após 6 horas de experimento, a corrente elétrica foi retirada e o experimento de permeação seguiu de maneira passiva por mais 6 horas, totalizando 12 horas de ensaio de permeação. Este ensaio foi realizado em sextuplicata.

Após o ensaio de permeação, as peles totais passaram pelo processo de digestão conforme item 5.9.2 e a hidroxiapatita de cálcio foi quantificada por FAAS conforme método previamente validado e descrito no item 5.9.

5.10.2.3. Permeação após microagulhamento automático

As peles de orelha suína foram previamente microagulhadas com dispositivo de microagulhamento automático e agulhas de 2 mm de diâmetro conforme técnica descrita no item 5.7. As células foram montadas com as peles de orelha suína com o estrato córneo voltado para cima. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 e o compartimento doador foi preenchido com 1000 µL das suspensões de Nano CaHA Lac 1% (m.v.) em tampão fosfato pH 7,4. Após a aplicação das formulações, as células foram mantidas em condições de temperatura a 32 ± 1 °C, sob agitação magnética a 300 rpm por um período de 12 horas. Este ensaio foi realizado em sextuplicata.

Após o ensaio de permeação, as peles totais passaram pelo processo de digestão conforme item 5.9.2 e a hidroxiapatita de cálcio foi quantificada por FAAS conforme método previamente validado e descrito no item 5.9.

5.11. Avaliação *in vitro* do potencial irritativo

O grau de irritação das Nano CaHA Lac 1% (m.v.) dispersas em tampão fosfato pH 7,4 foi avaliado utilizando ensaio em membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados, *Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane* (HET-CAM).

Para tal, cada casca de ovo foi aberta na lateral da câmara de ar e 300 µL da suspensão teste foram adicionados diretamente na superfície da membrana corioalantóica.

Após 20 segundos, a membrana foi cuidadosamente lavada com solução salina para retirada da amostra. A membrana corioalantóica foi então monitorada visualmente por 5 minutos afim de constatar hiperemia, hemorragia e coagulação. As fotografias foram registradas com lupa binocular e câmera de celular (DOS SANTOS et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2022; TOLENTINO et al., 2021). Utilizou-se NaCl a 0,9% (p/v) e NaOH 1 mol/L como controles positivos e negativos, respectivamente.

O tempo necessário para a ocorrência das reações foi registrado em minutos, e estão apresentados na Tabela 2. O cálculo do índice de irritabilidade foi realizado utilizando a Equação 4:

$$II = \frac{(301 - HE) \times 5}{300} + \frac{(301 - HP) \times 7}{300} + \frac{(301 - CO) \times 9}{300}$$

(Equação 4)

Onde: II = índice de irritabilidade; HE = tempo de ocorrência de hemorragia (s); HP = tempo de ocorrência para hiperemia (s); e CO = tempo para ocorrência de coagulação/opacidade (s).

Tabela 2. Escala para teste de HET-CAM conforme efeitos observados ao longo de 5 min.

Efeito	Tempo (min)		
	0,0 – 0,5	0,5 – 2,0	2,0 – 5,0
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

A classificação usada para avaliar quanto ao potencial irritativo das formulações no ensaio HET-CAM está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Classificação final das formulações analisadas considerando a pontuação cumulativa ao grau de irritabilidade no HET-CAM.

Índice de Irritabilidade	Classificação
0 – 0,9	Não Irritante (NI)
1,0 – 4,9	Irritante Leve (IL)
5,0 – 8,9	Irritante Moderado (IM)
9,0 – 21,0	Irritante Severo (IS)

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Obtenção de nanopartícula e micropartícula

Objetivando realizar a aplicação tópica de CaHA com ou sem o uso da iontoforese e do microagulhamento, suspensões de CaHA em água foram produzidas. Para tal, micropartículas e nanopartículas foram obtidas utilizando técnicas de atomização e secagem por Spray Dryer e secagem por pulverização por Nanospray Dryer.

A Commercial CaHA de 10 μm foi previamente solubilizada em água acidificada com ácido acético (pH 3) por apresentar uma baixa solubilidade em água. A solubilidade do analito em questão é pH dependente, sendo solúvel em pH ácido (SAALFELD *et al.*, 1994). A escolha do ácido acético com função de ajuste de pH da solução foi por este ser considerado um ácido fraco, de pKa 4,76, garantindo assim a preservação dos equipamentos utilizados para obtenção das nanopartículas e micropartículas (SERJEANT; DEMPSEY, 1979).

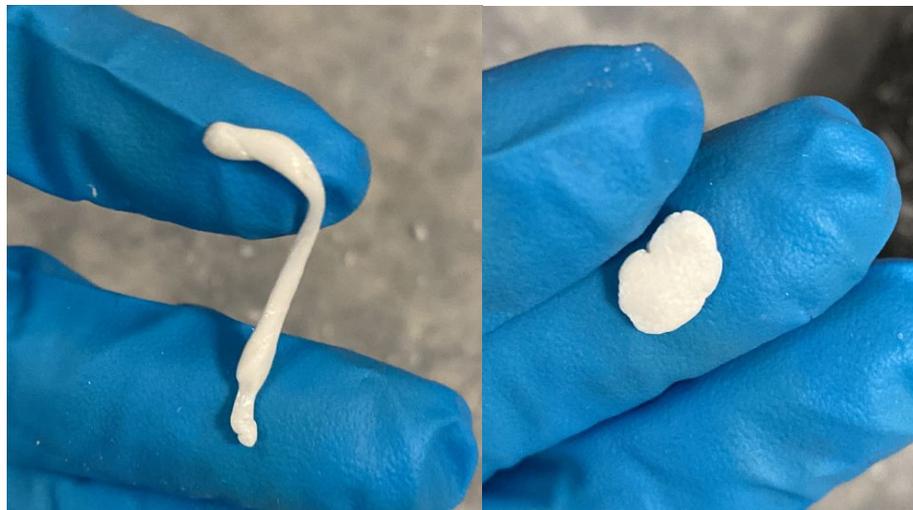
Afim de melhorar a dispersão em água da CaHA, foram realizados testes com aerosil (dióxido de silício coloidal), sacarose, amido e lactose monohidratada, acrescentados separadamente à solução. Apesar da sacarose, do amido e da lactose apresentarem ação aglutinante, esses excipientes possuem dupla função e também atuam como antiagregantes (GIL, 2007). Uma melhor dispersão da CaHA em água poderia auxiliar na prevenção da formação de nódulos, recentes ou tardios, por acúmulo ou agregação de partículas de CaHA após a aplicação (KADOUCH, 2017).

O uso do aerosil (dióxido de silício coloidal) foi descartado devido a sua insolubilidade em água e em solução ácida. Após aquecimento a 110 °C, houve a agregação da Commercial CaHA com a sacarose (Figura 6), impedindo sua utilização nos métodos de secagem propostos.

Tanto o amido e quanto a lactose resistiram ao aquecimento a 110 °C, porém as partículas com amido apresentaram, macroscopicamente, sua dispersão em água

dificultada quanto comparadas às partículas com lactose. Assim, a lactose monohidratada foi o excipiente de escolha para prosseguimento dos experimentos.

Figura 8. Commercial CaHA com sacarose agregadas após aquecimento a 110 °C.



6.1.1. Nanospray drying

Nanopartículas foram obtidas a partir da solução de Commercial CaHA supracitada afim de diminuir seu tamanho e assim promover uma melhor permeação cutânea do ativo, possibilitando sua aplicação tópica, utilizando o método proposto no item 5.1.1 (ASSADPOUR; MAHDI JAFARI, 2019; GRATIERI *et al.*, 2008).

Visando sua melhor dispersão em suspensão aquosa, a lactose monohidratada foi adicionada, previamente à secagem, a 10% (m.m) da massa de CaHA utilizada em solução. Além disso, também se obteve nanopartículas adicionadas de lactose posteriormente a secagem. 10% (m.m) da massa de CaHA obtida após a secagem foi adicionada e misturadas com auxílio do vórtex. Ambas nanopartículas foram obtidas utilizando o método proposto no item 5.1.1, afim de aumentar a estabilidade e dispersão em água da CaHA.

Ao final, foram obtidas três amostras distintas: nanopartícula obtidas de solução contendo Commercial CaHA (Nano CaHA), nanopartículas obtidas de solução de Commercial CaHA, com a lactose misturada posteriormente a secagem (Nano CaHA Lac Mix) e nanopartículas obtidas de solução contendo Commercial CaHA e lactose, adicionada previamente a secagem (Nano CaHA Lac).

6.1.2. Spray drying

Utilizando o método proposto no item 5.1.2, micropartículas de Commercial CaHA adicionadas de lactose 10% (m.m) da massa de CaHA utilizada em solução foram obtidas. O uso da técnica de atomização e secagem por spray dryer possibilita a diminuição do tamanho de partícula de fármacos e, por se tratar de um processo de secagem rápido e econômico, é escalonável para ambientes industriais (SOSNIK, SEREMETA, 2015; SILVA et al., 2003).

Assim, produziu-se micropartículas com lactose (Micro CaHA), com o mesmo propósito de possibilitar a aplicação tópica de CaHA, melhorar a dispersão aquosa e sua estabilidade, além de avaliar possíveis variações no efeito biológico em culturas celulares quando comparadas às nanopartículas e a Commercial CaHA.

6.2. Caracterização de nanopartícula e micropartícula

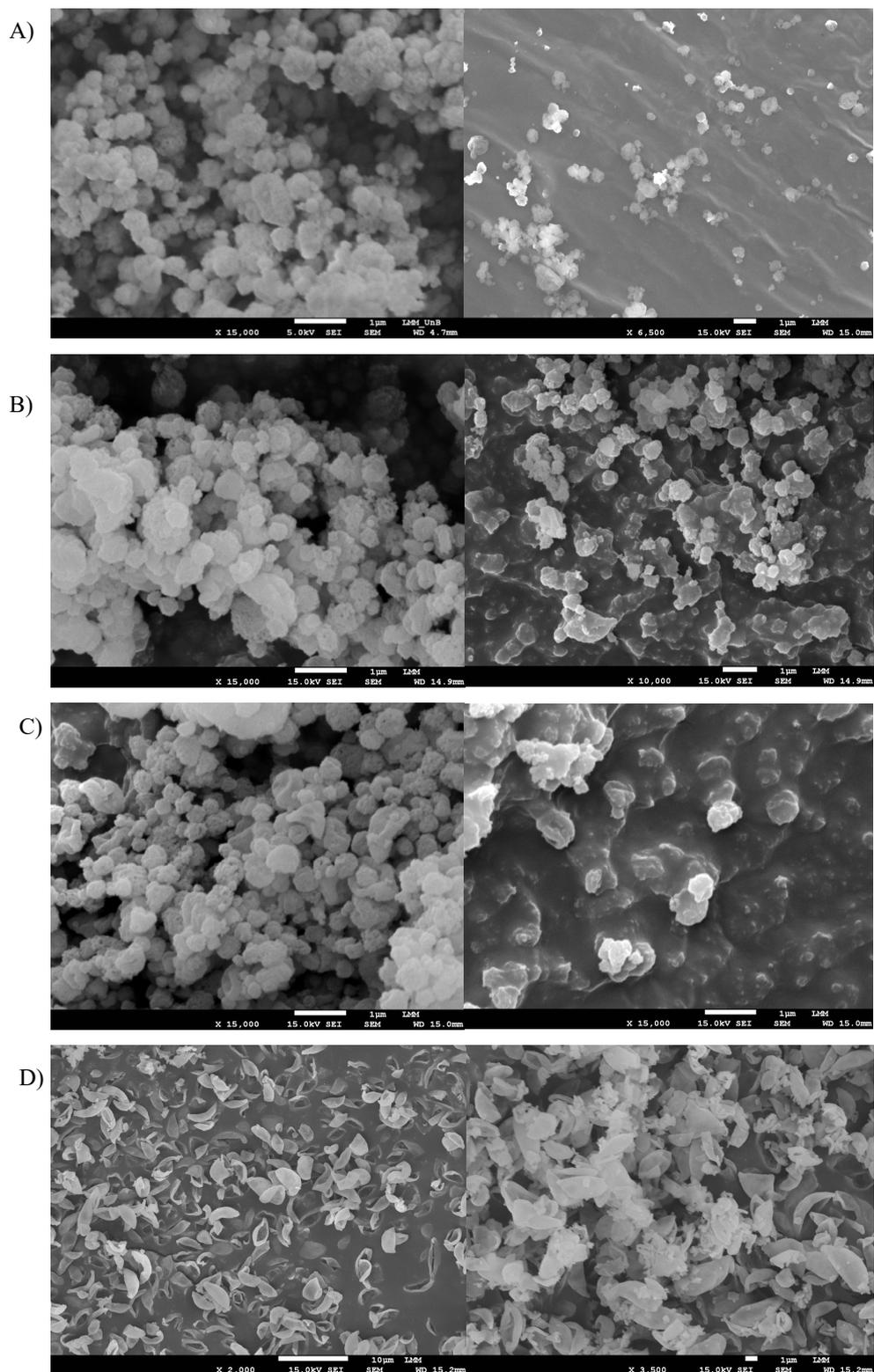
6.2.1. Morfologia

A morfologia das partículas obtidas foi analisada por MEV e as fotomicrografias capturadas estão presentes na Figura 7.

De maneira geral, todas as nanopartículas obtidas (Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix e Nano CaHA Lac) apresentam formato esférico, com superfície levemente rugosa e tamanhos variados, porém inferiores à 1 μm de diâmetro. Tal morfologia é semelhante a apresentada em estudos anteriores para nanopartículas a base de cálcio (KAWAI *et al.*, 2011).

Já as micropartículas (Micro CaHA) apresentaram uma heterogeneidade em sua morfologia, sendo semelhantes a pétalas, e diâmetro maior (1-10 μm) quando comparadas às partículas produzidas pela técnica de nanospray drying. A forma como a CaHA é sintetizada influencia no seu diâmetro e morfologia (KUMTA *et al.*, 2005b; PHAM MINH *et al.*, 2013). Sendo assim, os parâmetros de atomização e secagem também possivelmente causem influência semelhante.

Figura 9. Fotomicrografia das partículas obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) Nano CaHA; (B) Nano CaHA Lac Mix; (C) Nano CaHA Lac; (D) Micro CaHA.



6.2.2. Tamanho, potencial zeta e PDI

A Tabela 4 apresenta os resultados de tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das partículas obtidas por Nanospray Drying e Spray Drying.

Tabela 4. Resultados das análises de tamanho de gotícula, potencial zeta e PDI das nanopartículas obtidas a partir da média de 3 determinações \pm desvio padrão.

Amostra	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
Micro CaHA	2239,33 \pm 309,46	0,3 \pm 0,03	- 3,20
Nano CaHA	829,45 \pm 27,08	0,6 \pm 0,06	+ 1,45
Nano CaHA Lac Mix	504,07 \pm 0,25	0,3 \pm 0,11	+ 2,25
Nano CaHA Lac	566,13 \pm 39,79	0,1 \pm 0,04	+ 1,97

O potencial zeta das partículas foi mensurado, sendo + 1,45, + 2,25 e +1,97 mV para Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix e Nano CaHA Lac, respectivamente, e - 3,20 mV para Micro CaHA. Foi possível observar um potencial zeta negativo para Micro CaHA, conforme esperado e em concordância com literatura para CaHA (CARVALHO *et al.*, 2017; DOS SANTOS, 2013; YOUNG *et al.*, 1997). Porém, nota-se que o potencial zeta das nanopartículas passou de negativo para ligeiramente positivo. O potencial zeta da CaHA é influenciado pela mudança de pH da amostra, ocorrendo a mudança de negativo para positivo conforme há a acidificação do meio (CARVALHO *et al.*, 2017). Portanto, a alteração desse nas nanopartículas obtidas está condizente com a literatura, já que Commercial CaHA foi solubilizada em água acidificada (pH 3) anteriormente a obtenção das nanopartículas pela técnica de nanospray drying. Entretanto, apesar de também ter sido solubilizada em água acidificada (pH 3) previamente a secagem, a Micro CaHA permaneceu com o potencial zeta levemente negativo.

Todas as partículas produzidas pela técnica de nanospray drying apresentaram tamanhos de escala nanométrica (Tabela 4). Já a Micro CaHA apresentou um tamanho micrométrico, acima de 1000 nm (2239,33 \pm 309,46 nm). A técnica de Spray Drying não é capaz de proporcionar a obtenção de partículas de tamanho nanométrico (ASSADPOUR; MAHDI JAFARI, 2019), porém foi possível reduzir o tamanho de partícula da Commercial CaHA, que conforme descrito pelo fabricante varia de 8 a 12 μ m. O PDI das amostras foi de 0,3 \pm 0,03, 0,6 \pm 0,06, 0,3 \pm 0,11 e 0,1 \pm 0,04 para Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix e Nano CaHA Lac, respectivamente. Quanto mais próximo este valor está de 0, mais monodispersas e com menor variação de tamanho as amostras se apresentam (MOGHIMIPOUR; SALIMI; EFTEKHARI, 2013). O PDI mais elevado observado na Nano CaHA somado com seu tamanho maior, quando

comparada a Nano CaHA Lac Mix e Nano CaHA Lac, levanta a hipótese de que essas partículas se aglomeram ao serem suspensas em meio líquido e que lactose agiu como antiagregante, conforme esperado.

Formulações contendo partículas de tamanho nanométrico e monodispersas são promissoras para a aplicação tópica da CaHA.

6.3. Análise térmica

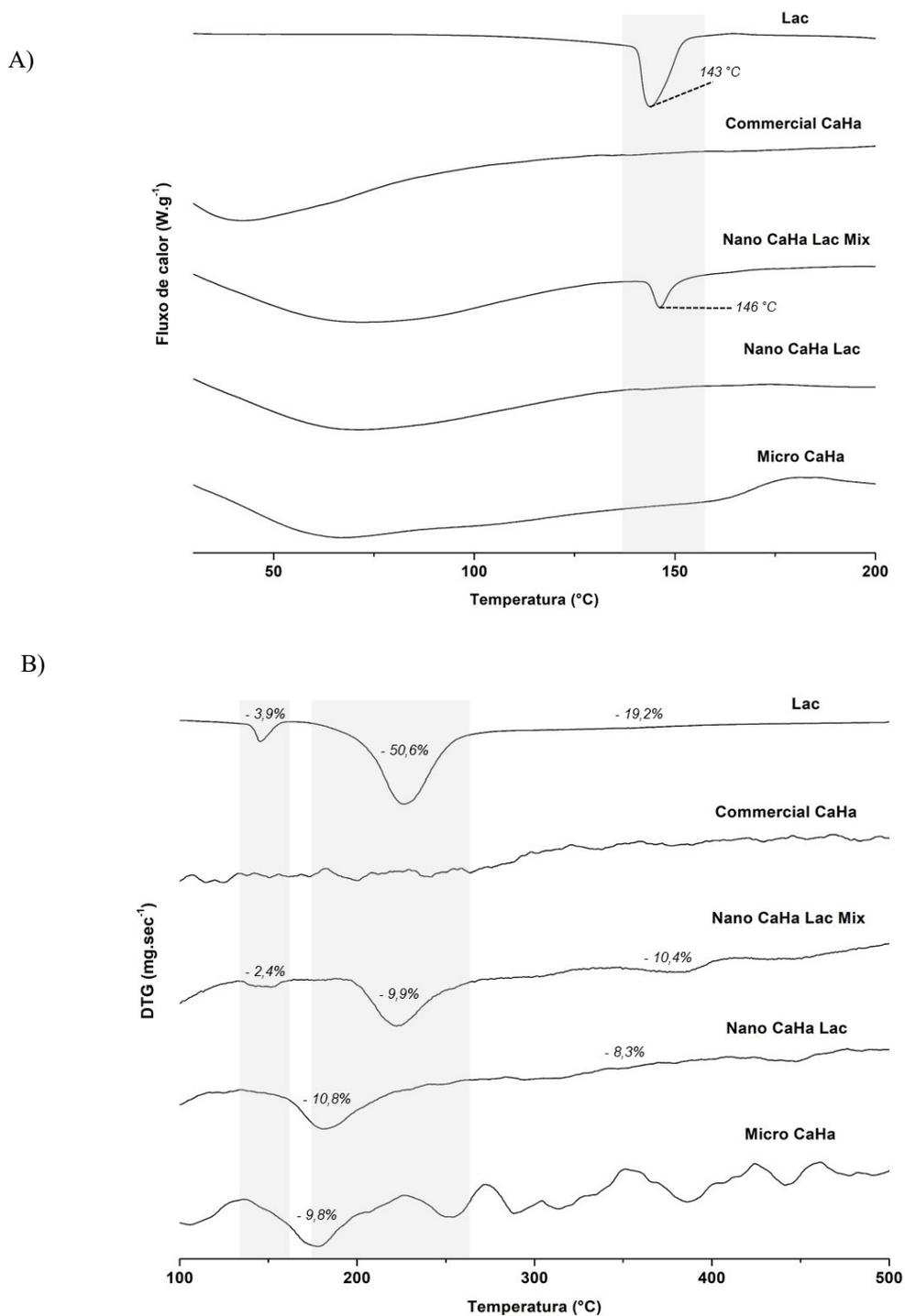
O comportamento térmico da Commercial CaHA, lactose, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Micro CaHA foi avaliado por DSC e TG. A técnica de DSC foi utilizada para medir as alterações de entalpia que ocorrem devido a alterações nas propriedades físicas e químicas de um material em função da temperatura ou do tempo. Já a técnica de TG, para avaliar a degradação térmica dos componentes da partícula isolados e associados. Os resultados podem ser observados na Figura 8.

É possível observar (Figura 8A) que não há evento de fusão na Commercial CaHA, apenas há uma perda de água a 42,29 °C. Já a lactose, apresenta evento de fusão a 146,21°C. Quando avaliamos a Nano CaHA Lac Mix, um evento de fusão também a 146,21 °C, além do evento de perda de água observado na Commercial CaHA. Esse fato demonstra que a lactose adicionada após a obtenção da nanopartícula de CaHA pela técnica de nanospray dryer permanece cristalina. Por outro lado, ao analisar a Nano CaHA Lac e a Micro CaHA, percebe-se que não há mais o evento de fusão da lactose. Isso confirma a interação entre a Commercial CaHA e a lactose ao serem pulverizadas e secas em conjunto na técnica de nanospray drying e spray drying, impedindo assim que lactose permaneça cristalina e apontando que a mistura está amorfa.

A Figura 8B demonstra que a Commercial CaHA não é degradada nas condições avaliadas, mesmo em altas temperaturas (500 °C). Já a lactose passa por dois eventos de degradação, a 134 °C e a 165 °C. Ao avaliar a Nano CaHA Lac Mix, observa-se a soma dos eventos ocorridos com a Commercial CaHA e a lactose, confirmando que não houve uma interação entre os materiais. Tal dado sugere que a lactose permanece cristalina ao ser apenas adicionada posteriormente a pulverização e secagem da CaHA por nanospray drying, corroborando os dados obtidos na análise de DSC. Já na análise da Nano CaHA Lac e Micro CaHA, é possível observar a perda de água inicial e apenas um evento de degradação da lactose. Tais análises confirmam a interação dos ativos ao passarem em

conjunto pela pulverização e secagem por nanospray drying e spray drying, conforme observado em estudos anteriores (LIMA *et al.*, 2021).

Figura 10. Análise térmico da lactose (Lac), Commercial CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Micro CaHA por (A) DSC e (B) TG.

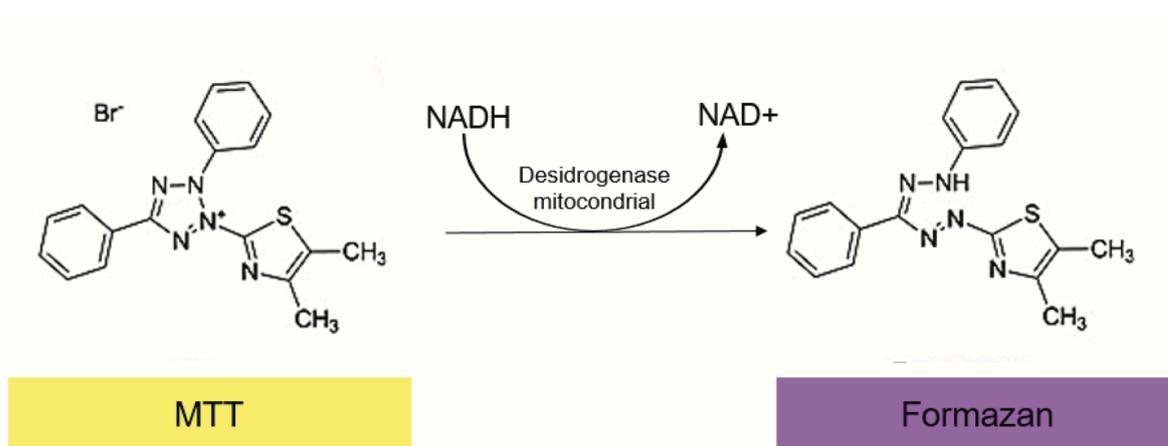


6.4. Ensaios *in vitro* com fibroblastos humanos

6.4.1. Viabilidade Celular

O ensaio de redução de MTT a cristais de formazan foi realizado visando verificar a atividade mitocondrial, um fator preditor da viabilidade celular de HaCaT e fibroblastos humanos, tratados com suspensões de Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose em água destilada estéril. Este ensaio foi conduzido para definir uma concentração ideal não tóxica de tratamento de ambas linhagens celulares para realização de experimentos posteriores.

Figura 11. Reação de redução de MTT a cristais de formazan.

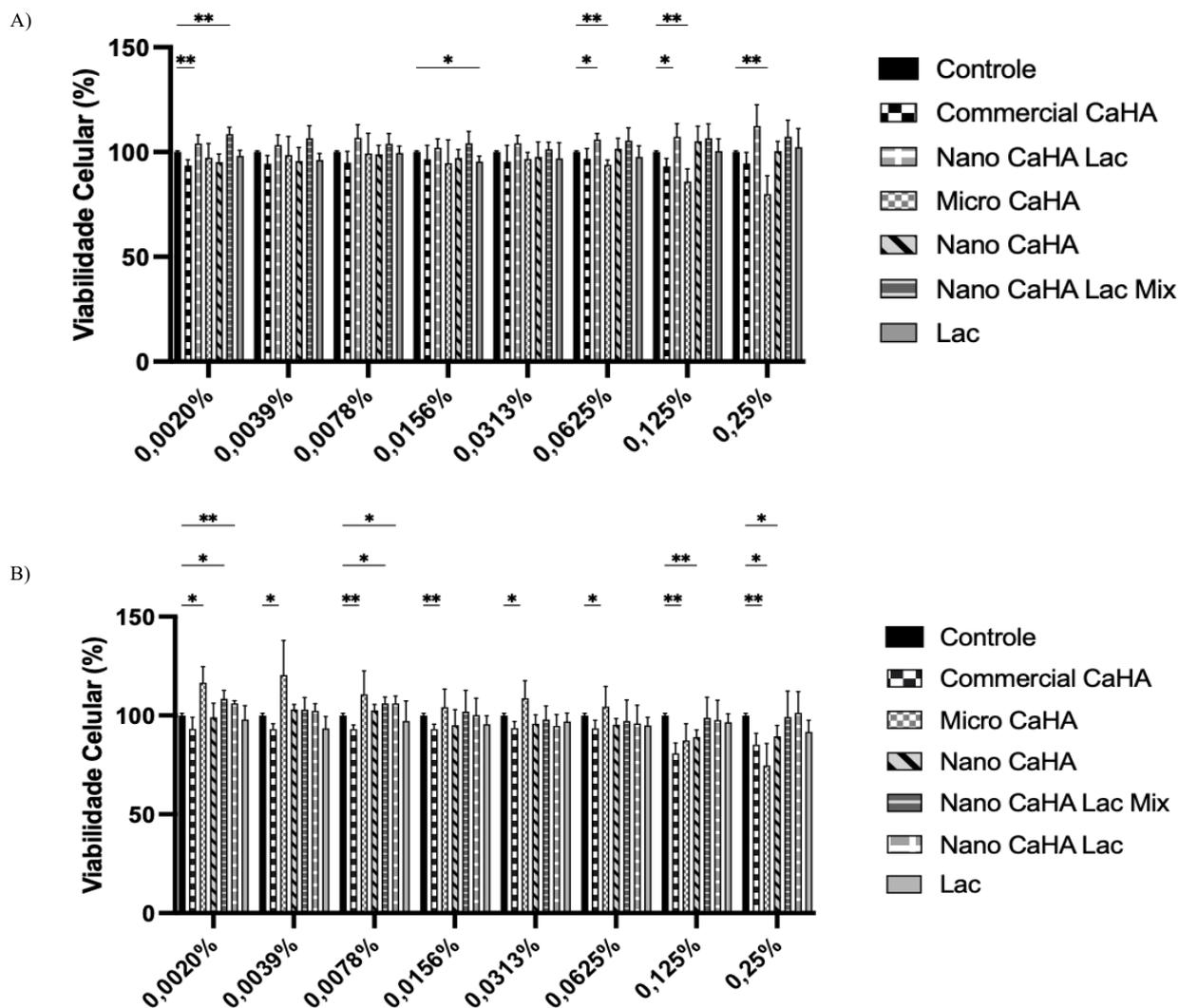


Fonte:(MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018).

Os resultados obtidos pela técnica de MTT em fibroblastos humanos nos períodos de 24 e 48 horas estão apresentados nas Figura 12A e 12B. Nota-se que Micro CaHA apresentou uma maior diminuição da viabilidade celular quando comparada aos outros tratamentos após 24 horas de ensaio, em concentrações mais elevadas (0,125% e 0,25%). Além disso, com 48 horas de tratamento, Commercial CaHA também apresentou citotoxicidade nas mesmas concentrações. Tais achados estão em conformidade com o encontrado em estudos anteriores, uma vez que estes demonstraram que não há citotoxicidade de CaHA em fibroblastos humanos até 0,1% de concentração (COURDEROT-MASUYER *et al.*, 2016). Assim, a concentração de 0,0625% foi selecionada para prosseguimento dos estudos.

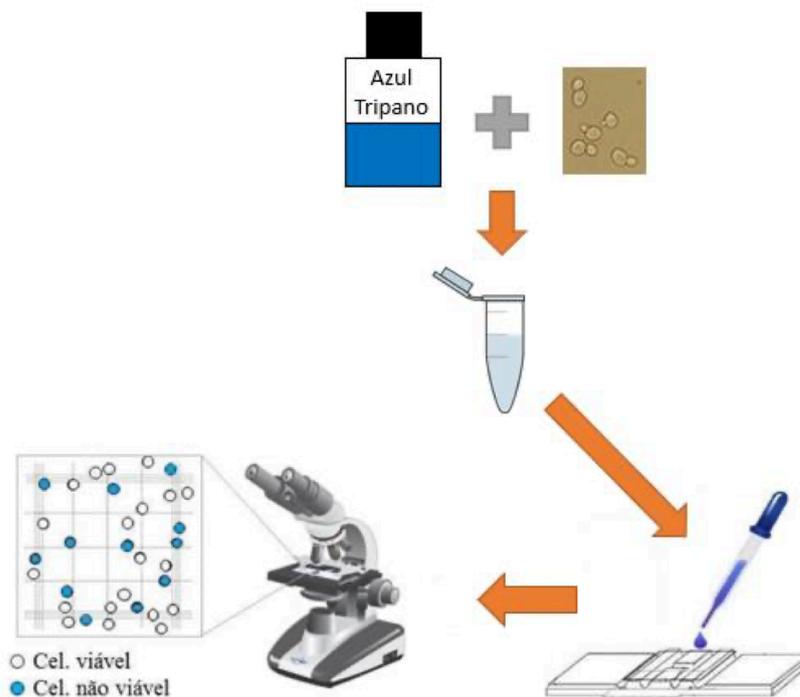
Figura 12. Viabilidade celular dos Fibroblastos humanos pela técnica de MTT na presença de tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac). (A) 24 horas; (B) 48 horas. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorbância de triplicatas biológicas em

duplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *.



Devido às dificuldades experimentais frente aos ensaios de MTT, para confirmar os impactos dos tratamentos em outros parâmetros de viabilidade celular de ambas as linhagens celulares na concentração escolhida, realizou-se o ensaio de azul de tripan após o tratamento por 48 horas com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose a 0,0065%. Neste ensaio é possível determinar o número de células viáveis presentes por meio da avaliação da integridade de membrana. A diferenciação das células viáveis e não viáveis se dá através de sua coloração, uma vez que somente as células que apresentam membrana não íntegra são invadidas pelo azul de tripan e ficam coradas (STROBER, 2015).

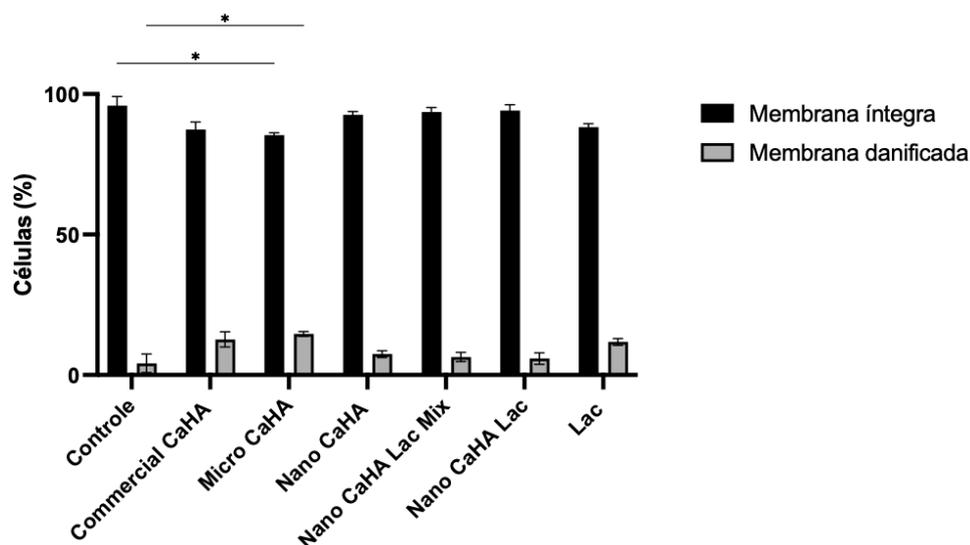
Figura 13. Ensaio de azul de tripan para avaliação da integridade de membrana plasmática.



Fonte: (RODRIGUES, 2019)

Os resultados estão apresentados na Figura 14. É possível observar que apenas para Micro CaHA, em fibroblastos humanos, houve diferença estatística em relação ao controle na viabilidade celular, diminuindo em 8,5% as células com membrana íntegra. Já para os outros tratamentos, a concentração de 0,0065% não influenciou a viabilidade celular, confirmando a biocompatibilidade da CaHA com essas linhagens celulares conforme apresentado em estudos anteriores (COURDEROT-MASUYER et al., 2016; WOLLINA; WIEGAND; HIPLER, 2018). Assim, a concentração de 0,0065% foi selecionada para dar continuidade aos ensaios celulares.

Figura 14. Viabilidade celular pela técnica de Azul de Tripan na presença de tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac). Fibroblastos humanos. O gráfico representa a média e o desvio-padrão das células contabilizadas de triplicatas biológicas em duplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *.

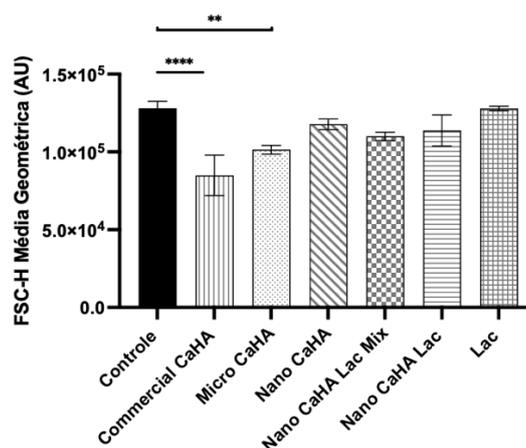


6.4.2. Citometria de fluxo

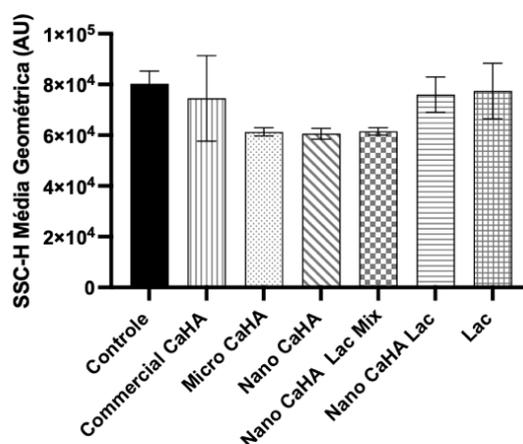
Utilizou-se a técnica de citometria de fluxo para avaliação da morfologia celular dos fibroblastos humanos na presença de tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) após 48h de incubação. O FSC-H origina informações relacionadas ao tamanho celular, enquanto o SSC-H é fornece dados sobre a quantidade e densidade dos grânulos da célula (JOANITTI; AZEVEDO; FREITAS, 2010; BRAGA et al., 2016; OMBREDANE et al., 2022). Os dados estão apresentados na Figura 15.

Figura 15. Análise morfológica de tamanho celular de fibroblastos humanos por citometria de fluxo na presença de tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) após 48h de incubação. (A) Tamanho celular (FSC-H); (B) Granularidade (SSC-H). O gráfico representa a média geométrica e o desvio-padrão das células contabilizadas de triplicatas biológicas em duplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *.

A)



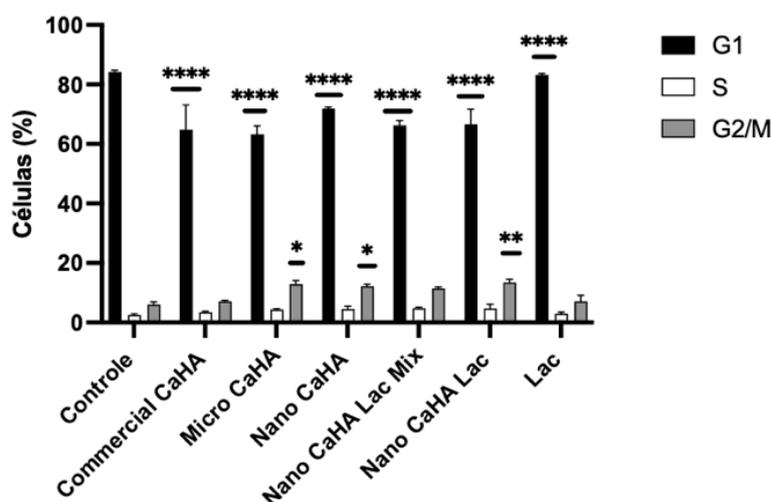
B)



Observa-se que há uma diminuição do tamanho celular dos fibroblastos ao serem expostos ao tratamento com Commercial CaHA e Micro CaHA (Figura 15A). A redução do tamanho celular pode ser um indicativo de citotoxicidade do tratamento (JOANITTI; AZEVEDO; FREITAS, 2010; OMBREDANE *et al.*, 2022). Este dado está em concordância com o observado na mensuração dos fibroblastos com membranas íntegras e danificadas apresentado no ensaio de azul de tripan para Micro CaHA. Tal fato pode ser um indicativo de que o maior tamanho de partícula e a sua morfologia acarretem em uma maior citotoxicidade celular. Por outro lado, não há diferenças estatísticas significativas na quantidade e densidade dos grânulos celulares, indicando assim que não há alteração no interior dos fibroblastos humanos tratados (Figura 15B).

Avaliou-se a ação do tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) após 48h de incubação nas fases G1, S e G2/M no ciclo celular dos fibroblatos humanos. Os dados estão apresentados na Figura 16.

Figura 16. Análise por citometria de fluxo da ação do tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) após 48h de incubação nas fases G1, S e G2/M no ciclo celular dos fibroblatos humanos. O gráfico representa a média e o desvio-padrão das células contabilizadas de triplicatas biológicas em duplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *.

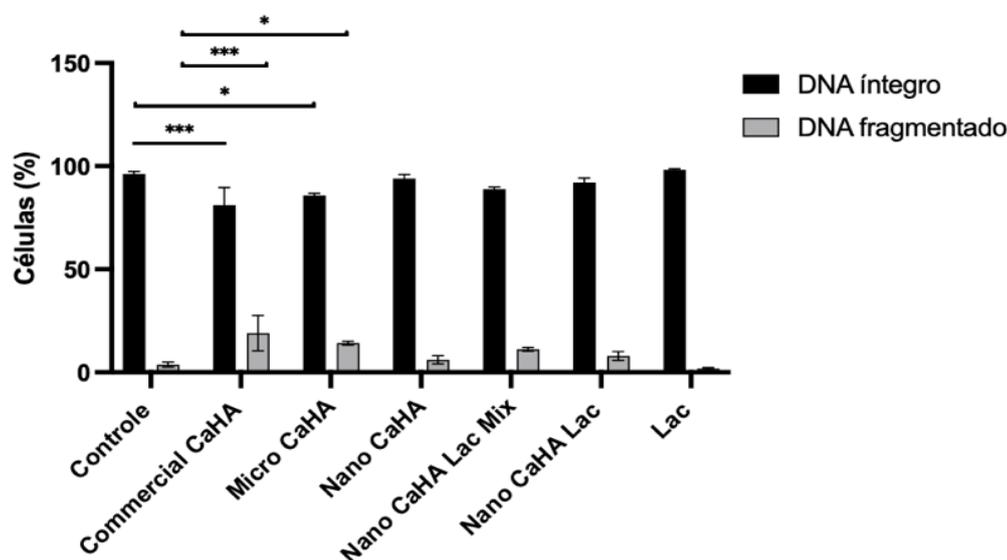


Todos os tratamentos reduziram a quantidade de células em fase G1 do ciclo celular. Além disso, Micro CaHA, Nano CaHA e Nano CaHA Lac aumentaram a quantidade de fibroblastos na fase G2/M. Esse dado aponta um aumento na proliferação celular das células tratadas com essas partículas (JOANITTI; AZEVEDO; FREITAS, 2010; OMBREDANE *et al.*, 2022). Tal dado abre precedentes para induzir a conclusão de que a forma de produção das partículas por spray drying e nanospray drying pode contribuir para um aumento da proliferação de fibroblastos. Nano CaHA Lac Mix não apresentou aumento na fase G2/M, mesmo também sendo pulverizada e seca por nanospray drying. Porém, essa partícula é revestida por lactose após a secagem. Como a lactose também não apresentou aumento nessa fase do ciclo celular, pode-se inferir que ela inibiu as células de tal ação.

A proliferação de fibroblastos após o tratamento com CaHA injetável é esperada, sendo um dos pontos cruciais para o aumento do estímulo da produção de colágeno (KIM, 2019; VAN LOGHEM; YUTSKOVSKAYA; WERSCHLER, 2015). O aumento da proliferação de fibroblastos por partículas de menor tamanho, quando comparado ao tamanho de partícula comercial (25 a 45 μm), é um bom indicativo de que o tamanho reduzido não influenciará negativamente no tratamento de flacidez cutânea.

Por fim, avaliou-se a fragmentação de DNA após a ação do tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) em fibroblastos humanos após 48h de incubação conforme apresentado na Figura 17.

Figura 17. Análise de fragmentação de DNA por citometria de fluxo da ação do tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) em fibroblastos humanos após 48h de incubação. O gráfico representa a média e o desvio-padrão das células contabilizadas de triplicatas biológicas em duplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *.

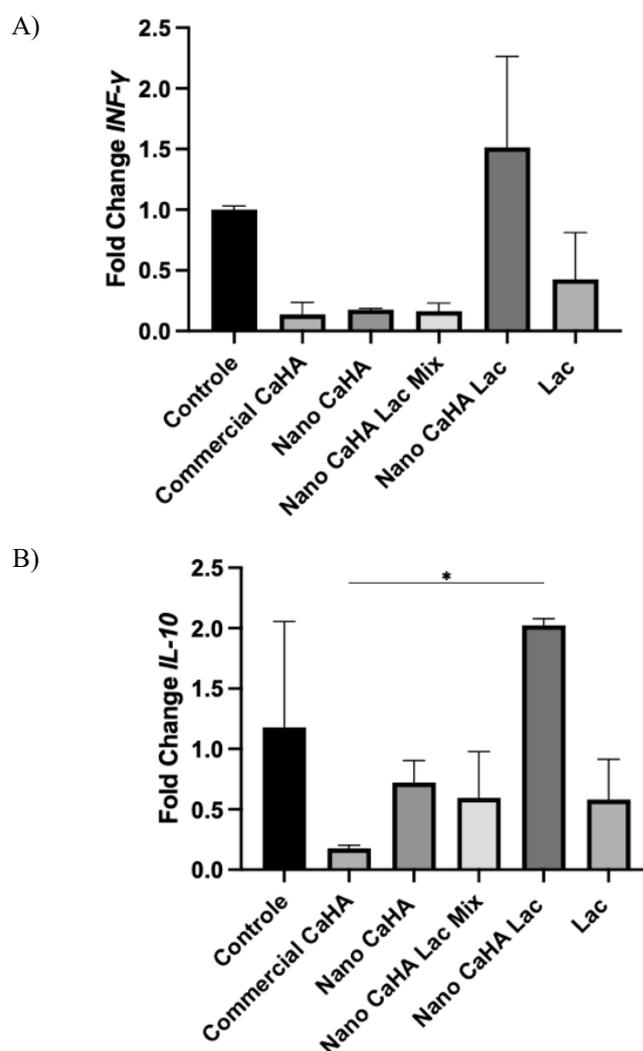


É possível observar que Commercial CaHA e Micro CaHA apresentam redução da quantidade de células com DNA íntegro e aumento na quantidade de células com DNA fragmentado. Tal dado aponta para uma genotoxicidade dos tratamentos em questão (JOANITTI; AZEVEDO; FREITAS, 2010; OMBREDANE *et al.*, 2022). Mais uma vez, pode-se inferir que o maior tamanho de partícula e a sua morfologia acarretam em uma maior toxicidade celular. Apesar de aumentar a genotoxicidade, sabe-se que a Commercial CaHA não apresenta mutagenicidade em células germinativas. Além disso, as células humanas possuem mecanismos para detectar e corrigir danos celulares, como a reversão direta, reparação por excisão e a reparação de ruptura de cadeias duplas caso haja alguma mutagenicidade da Micro CaHA (CHATTERJEE; WALKER, 2017; SÁEZ, 2018).

6.4.3. Avaliação de expressão gênica preliminar

Sabe-se que a CaHA de 25 a 45 μm de diâmetro utilizada de maneira injetável induz a produção de colágeno (COLEMAN et al., 2008; VAN LOGHEM; YUTSKOVSKAYA; WERSCHLER, 2015; GRAIVIER et al., 2018; DE ALMEIDA et al., 2019b). Afim de avaliar o estímulo de produção de colágeno e a resposta inflamatória das partículas obtidas, realizou-se um ensaio preliminar de avaliação de expressão gênica de COL1, COL4, COL6, INF- γ e IL-10 em fibroblastos humanos tratados com Commercial CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) por 48 horas, na concentração de 0,065%. Os resultados estão apresentados na Figura 18.

Figura 18. Avaliação da expressão gênica relativa de genes envolvidos na resposta imuno pela ação do tratamento com Commercial CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) em fibroblastos humanos após 48h de incubação, através da técnica de qPCR. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *. (A) INF- γ ; (B) IL-10.



Após a injeção de Hidroxiapatita de Cálcio (CaHA) na derme, inicia-se o processo inflamatório inicial. Os fibroblastos secretam fatores de crescimento, estimulam a migração de células proliferativas e inflamatórias para a região e mediam a produção de colágeno e matriz extracelular. Os monócitos são transformados em macrófagos e migram para o local através de dois processos: pela absorção de proteínas da superfície do corpo estranho e adesão dos macrófagos e pela ação das IL-4 e IL-13 (via alternativa), produzidos pelos linfócitos tipo TH2. (KIM, 2019; VAN LOGHEM; YUTSKOVSKAYA; WERSCHLER, 2015).

Estudos têm demonstrado que a ativação de macrófagos depende do estímulo de citocinas inflamatórias produzidas por linfócitos auxiliares ou células NK, em especial o INF- γ . O INF- γ contribui na resposta inflamatória aguda e principalmente na crônica, atraindo macrófagos e aumentando o número de células fagocitárias no local da inflamação. Nesse processo, quando ocorre um aumento da ativação dos macrófagos M1 (via clássica) em relação aos macrófagos M2 (via alternativa), há um reparo tecidual deficiente (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; CRUZ et al, 2017).

A ativação da via alternativa envolve o estímulo de macrófagos pelas interleucinas IL-4 e IL-13, que leva ao aumento nos níveis de citocina anti-inflamatória IL-10 e induz o reparo tecidual eficiente. No organismo, a resposta imunológica pró-inflamatória geralmente é seguida pela resposta imunológica anti-inflamatória. Durante a evolução do reparo tecidual e neocolagênese, há a alternância de momentos de maior lise celular com os de reposição celular e de matriz extracelular, assim como de apoptose e indução mitótica. Esse balanço permite a formação de um novo tecido saudável. A IL-10 é um dos mais conhecidos sinalizadores negativos da inflamação, limitando a resposta inflamatória e auxiliando o reparo tecidual (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; CRUZ et al., 2017).

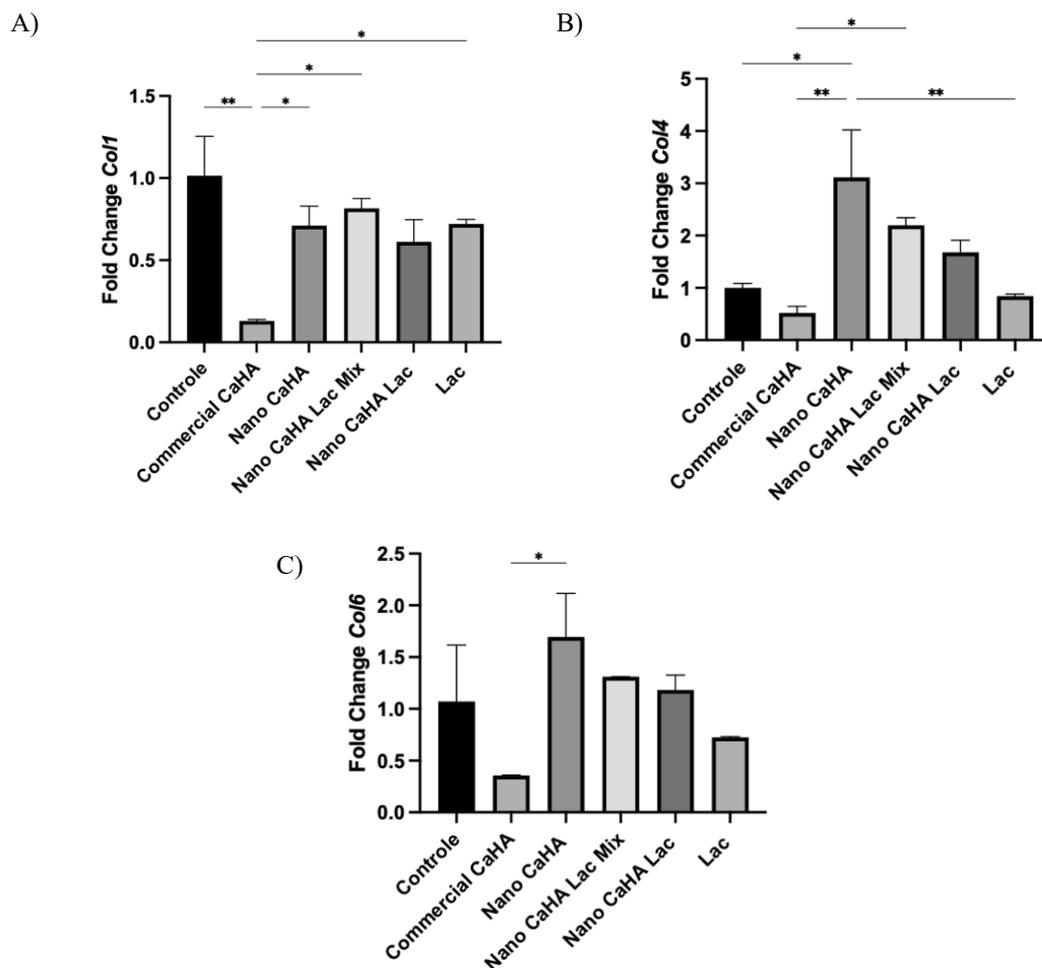
Estudos anteriores demonstraram a supressão de INF- γ e IL-10 por nanopartículas de CaHA adquiridas comercialmente (RAKSHIT et al., 2020). Entretanto, os dados observados nas Figura 18A e 18B demonstram que, após o contato das partículas obtidas com os fibroblastos humanos in vitro, observa-se que não há aumento ou supressão da expressão gênica de ambos os genes comparadas ao controle com diferença estatística significativa.

É possível observar que há um aumento da expressão gênica estatisticamente significativa de IL-10 por Nano CaHA Lac, quando comparada a Commercial CaHA. Apesar da ausência de diferença estatística, observa-se também o aumento da expressão

gênica de INF- γ por Nano CaHA Lac quando comparada a Commercial CaHA. Além disso, Nano CaHA Lac também aumentou a expressão gênica de ambos os genes quando comparado ao controle, apesar da ausência de diferença estatística. O desvio padrão elevado nas análises realizadas pode impactar na ausência de diferença estatística significativa nos achados.

Baseado nos dados aqui apresentados, é possível inferir que o tamanho da partícula de CaHA, além da sua interação com a lactose após pulverização e secagem pela técnica de nanospray drying, modula a resposta inflamatória. Além disso, a ativação da via alternativa com maior eficácia poderá resultar em um reparo tecidual mais eficiente e um colágeno mais bem formado pela Nano CaHA Lac, sendo assim um achado positivo para a indução de produção de colágeno.

Figura 19. Avaliação da expressão gênica relativa de colágeno pela ação do tratamento com Commercial CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac) em fibroblastos humanos após 48h de incubação, através da técnica de qPCR. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *. (A) Col1; (B) Col4; (C) Col6.



Afim de confirmar a função rejuvenescedora das partículas em questão, avaliou-se também sua influência na expressão de Col1, Col4 e Col6, conforme apresentado na Figura 19, para testes iniciais de estímulo de produção de colágeno das partículas em questão.

Sabe-se que a derme é composta por uma grande matriz extracelular rica em colágeno, sendo a proteína mais abundante na pele. Esta proteína é essencial para resistência e integridade mecânica da pele. Com o envelhecimento, a sua densidade na derme reduz significativamente. A rede de colágeno se torna cada vez mais fragmentada, apresentando fibras mais curtas e menos organizadas, além do acúmulo de fragmentos de colágeno degradado. Tal fato está associado a uma redução da espessura dérmica e aumento da flacidez tissular (PAPAIORDANOU et al., 2022).

Existem 28 tipos diferentes de colágeno. O colágeno tipo I é o mais abundante na pele, tendões, ossos, sendo composto por fibras flexíveis e de alta força tênsil. É o maior componente da matriz extracelular. Já o tipo IV está presente na lâmina densa da camada

basal e o tipo VI é formado por uma rede microfibrilar, sendo o mediador da arquitetura e composição da matriz extracelular (PAPAIORDANOU *et al.*, 2022).

É possível observar que houve uma supressão da expressão de Col1 pela ação de Commercial CaHA. Estudos anteriores demonstraram que há uma supressão da expressão gênica de Col1 por ação de CaHA de tamanho nanométrico adquirida comercialmente (RAKSHIT *et al.*, 2020). Apesar de possuírem tamanhos de partículas diferentes, ambas as CaHA foram adquiridas no mesmo local (Sigma Aldrich). Tal fato abre precedentes para inferirmos que a forma de produção de ambas interfere na expressão gênica de Col1.

Não houve diferença estatística significativa entre o controle e a ação de Nano CaHA, Nano CaHa Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose na expressão gênica de Col1, além de nenhuma diferença estatística significativa na produção de Col6 após exposição a todos os tratamentos. É possível observar em estudos *in vitro* que, por se tratar de um colágeno tardio, o aumento da expressão gênica de Col1 se dá após 72 horas de exposição (NOWAG *et al.*, 2023).

Por fim, observa-se um aumento da expressão gênica de Col4 pela ação de Nano CaHA. Além disso, é possível se observar a supressão na expressão gênica de todos os tipos de colágeno analisados (Col1, Col4 e Col6) quando comparamos Commercial CaHA com os outros tratamentos. Tal dado abre precedentes, mais uma vez, para inferirmos que a forma de produção de CaHA pode influenciar na expressão gênica de colágeno, sendo que a pulverização e secagem por nanospray drying se mostra como uma técnica vantajosa de produção de partículas de CaHA para o tratamento de flacidez cutânea.

6.5. Seleção de partícula para estudos subsequentes

Partículas de tamanho nanométrico e micrométrico, com e sem lactose, foram obtidas pelas técnicas de nanospray drying e spray drying, respectivamente. Por meio de técnicas de análise térmica constatou-se a interação da Lactose com a Commercial CaHA quando pulverizadas e secas em conjunto pela técnica de nanospray drying (Nano CaHA Lac).

Foi avaliado o efeito das partículas em relação ao aumento de proliferação celular, fragmentação de DNA e expressão gênica de genes relacionados à produção de colágeno (Col 1, Col 4 e Col 6) e processos inflamatórios (IL-10 e INF- γ) em culturas de fibroblastos humanos, apontando que as partículas nanométricas aumentam a divisão

celular e expressão gênica de genes relacionados à inflamação e produção de colágeno em fibroblastos.

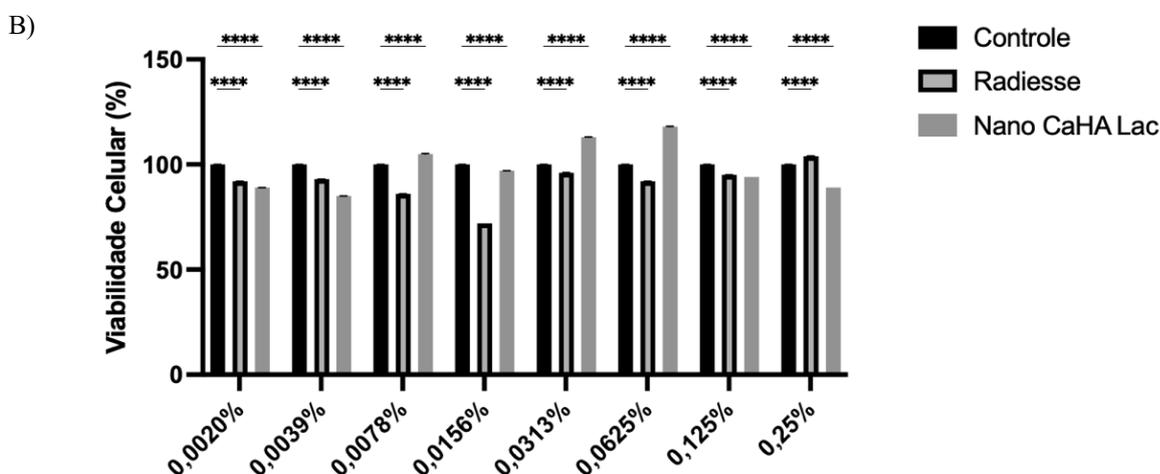
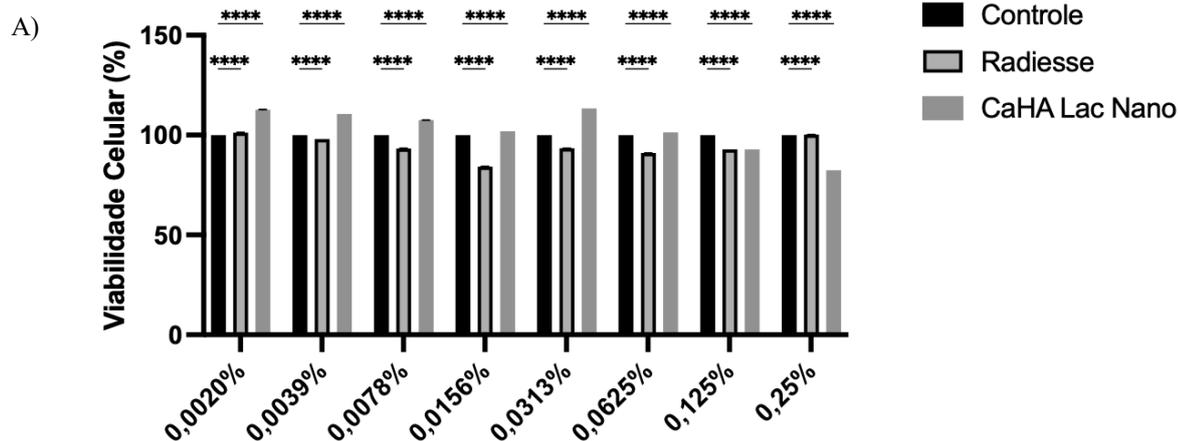
A partir dessas análises, pode-se inferir que o tamanho de partícula, a interação da lactose com a CaHA pela técnica de pulverização e secagem, além dos seus efeitos em fibroblastos humanos, se apresentam como indícios positivos para o uso de Nano CaHA Lac como indutor de produção de colágeno por meio da aplicação tópica passiva e também com o uso de iontoforese e microagulhamento como técnicas promotoras de permeação, sendo a partícula escolha para prosseguimento dos estudos.

6.6. Ensaio *in vitro* com fibroblastos humanos e PBMC

6.6.1. Viabilidade celular em fibroblastos humanos e PBMC

Conforme realizado anteriormente com as demais partículas, o ensaio de redução de MTT a cristais de formazan foi novamente conduzido afim de definir uma concentração ideal não tóxica de tratamento de fibroblastos humanos e PBMC, com Nano CaHA Lac e Radiesse® por 48 horas, para realização de experimentos posteriores. Tal ensaio visa verificar a atividade mitocondrial, um fator preditor da viabilidade celular, em ambas as linhagens celulares. Os resultados obtidos pela técnica de MTT em fibroblastos humanos e PBMC no período de 48 horas estão apresentados nas Figura 20A e 20B, respectivamente.

Figura 20. Viabilidade celular dos Fibroblastos humanos pela técnica de MTT na presença de tratamento com Commercial CaHA, Micro CaHA, Nano CaHA, Nano CaHA Lac Mix, Nano CaHA Lac e Lactose (Lac). (A) 24 horas; (B) 48 horas. O gráfico representa a média e o desvio-padrão da absorbância de triplicatas biológicas em duplicatas técnicas, normalizadas em relação ao controle de 100% de viabilidade. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *.



É possível observar que a Nano CaHA Lac, conforme observado anteriormente, e o Radiesse® mantém a viabilidade celular acima de 85% nas células tratadas com ambos os tratamentos até a concentração de 0,0625%, no período de 48 horas (Figura 20A). Tais achados estão em conformidade com o encontrado em estudos anteriores, uma vez que estes demonstraram que não há citotoxicidade de CaHA em fibroblastos humanos até 0,1% de concentração (COURDEROT-MASUYER *et al.*, 2016; WOLLINA; WIEGAND; HIPLER, 2018).

Observa-se que 0,0313% tanto a Nano CaHA Lac como o Radiesse® mantém a viabilidade celular das PBMC após 48 horas de tratamento, não apresentando citotoxicidade (Figura 20B). Estudos anteriores demonstraram o cultivo de PBMC expostos ao tratamento com hidroxiapatita de cálcio de 0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ por até 21 dias (COSTA-RODRIGUES *et al.*, 2014), corroborando assim a ausência de citotoxicidade apresentada na figura 20B.

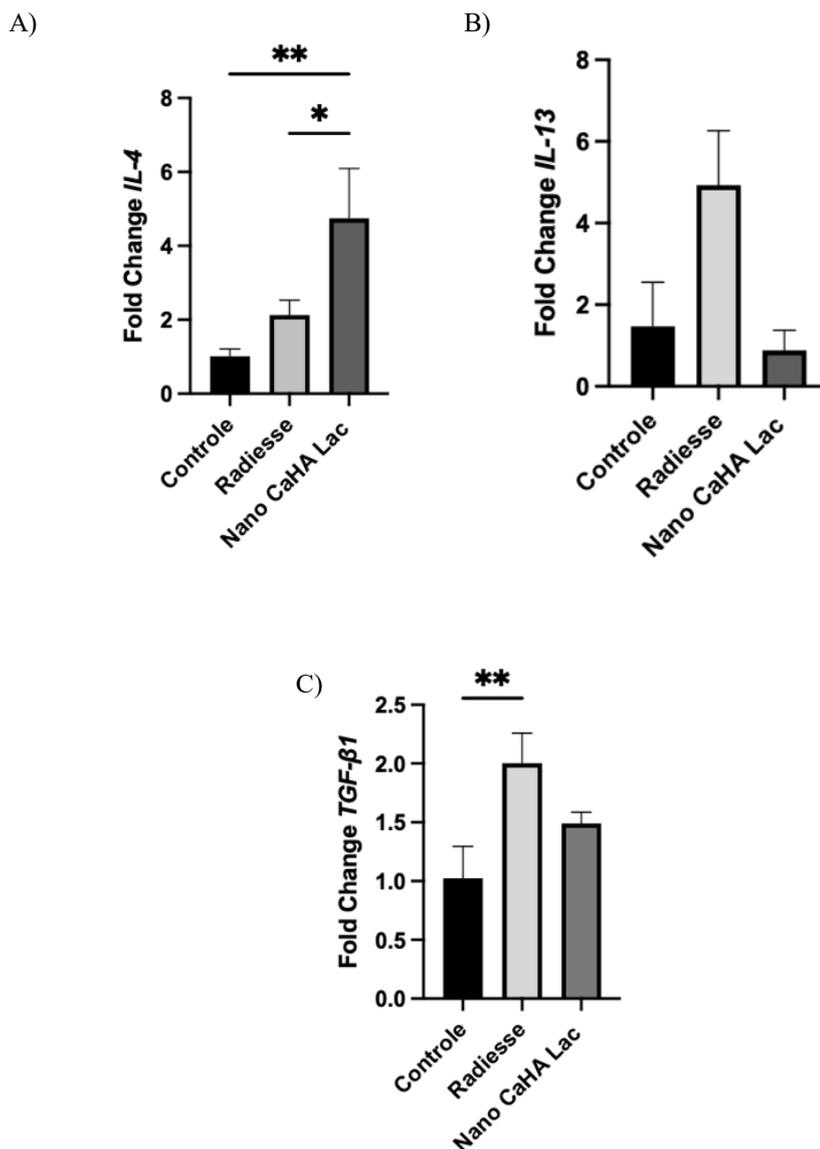
Ainda é possível observar que a 0,0313% há um aumento de aproximadamente 13% da viabilidade celular tanto de fibroblastos humanos como PBMC tratados com Nano CaHA Lac. Entretanto, nessa concentração não há aumento de viabilidade celular nos grupos tratados com Radiesse®. O aumento da viabilidade celular é indicativo de um possível aumento da proliferação celular, sendo um achado interessante quando se pretende aumentar a produção de colágeno, uma vez que a injeção intradérmica de hidroxiapatita de cálcio aumenta a proliferação celular ao seu redor (KIM, 2019; VAN LOGHEM; YUTSKOVSKAYA; WERSCHLER, 2015). Assim, a concentração de 0,0313% foi selecionada para prosseguimento dos estudos.

6.6.2. Avaliação da expressão gênica

Afim de mimetizar de maneira mais efetiva a resposta inflamatória inicial e ação de indução de produção de colágeno por CaHA demonstrada em estudos anteriores (KIM, 2019; VAN LOGHEM; YUTSKOVSKAYA; WERSCHLER, 2015), realizou-se a cocultura de fibroblastos humanos e PBMC, com auxílio do *transwell*, possibilitando a sinalização celular entre os dois tipos celulares.

Primeiramente, avaliou-se a expressão gênica de IL-4, IL-13 e TGF- β . após o tratamento da cocultura celular com 0,0313% de Radiesse® e Nano CaHA Lac. Os resultados estão apresentados na Figura 21A, 21B e 21C.

Figura 21. Avaliação da expressão gênica relativa de colágeno pela ação do tratamento com Radiesse® e Nano CaHA Lac em PBMC após 48h de incubação, através da técnica de qPCR. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *. (A) IL-4; (B) IL-13; (C) TGF- β .



Apesar da biocompatibilidade de CaHA, sabe-se que após sua aplicação há uma resposta inflamatória inicial por uma reação de corpo estranho e posterior estímulo de produção de colágeno. Inicialmente, os monócitos são transformados em macrófagos e migram para o local da aplicação através da absorção de proteínas da superfície do corpo estranho e adesão dos macrófagos. Seguidamente, há a ação das IL-4 e IL-13, produzidos pelos linfócitos tipo TH2, para ativação e migração dos fibroblastos e posterior produção de colágeno visando o reparo tecidual (CORDUFF, 2023; KIM, 2019).

Estudos anteriores relatam que partículas de tamanho reduzido ($< 10 \mu\text{m}$) são facilmente fagocitadas pelos macrófagos (KIM, 2019), não necessitando da ação de IL-4 e IL-13 para formação de células gigantes (CUNHA et al, 2020). Porém, é possível observar o aumento da expressão gênica de IL-4 das PBMC tratadas com Nano CaHA Lac em relação controle e ao grupo tratado com Radiesse® na mesma concentração,

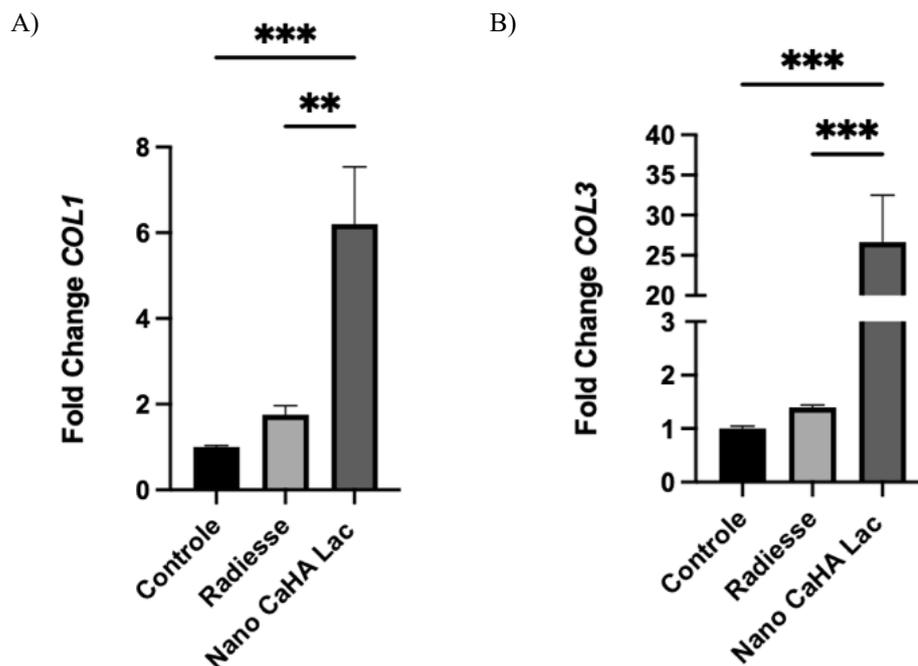
mesmo com tamanho nanométrico (Figura 21A). Tal fato nos permite inferir que a Nano CaHA Lac modula de maneira mais efetiva a resposta inflamatória relacionada ao estímulo de produção de colágeno quando comparada ao padrão ouro Radiesse®. Entretanto, isso não é observado em nenhum grupo experimental em relação a expressão gênica de IL-13 (Figura 21B).

Apesar da participação importante da IL-4 e IL-13 no estímulo da produção de colágeno e consequente melhora da flacidez cutânea, sua produção exagerada e desregulação pode gerar o aparecimento de fibroses teciduais. Entretanto, evidências demonstram que a hiper-regulação de IL-4 e IL-13 é mediada pela ação de TGF- β , uma potente citocina profibrótica. É possível observar na Figura 21C que o Radiesse® aumenta a expressão gênica de TGF- β quando comparado ao controle. Em contrapartida, a Nano CaHA Lac mantém a expressão gênica semelhante ao controle. Tal dado nos permite inferir que a Nano CaHA Lac apresenta menor possibilidade de produzir fibroses teciduais quando comparado ao Radiesse®, sendo sugestiva de melhorar a produção de colágeno de maneira mais segura e eficaz.

Sabe-se que após a aplicação de CaHA, inicialmente há a formação de colágeno do tipo III ao redor das partículas. Com a degradação da CaHA, o colágeno tipo III vem sendo substituído pelo colágeno do tipo I (CORDUFF, 2023; KIM, 2019). Estudos clínicos e *in vitro* demonstram o aumento da produção de colágeno tipo III e tipo I após o tratamento com Radiesse®, sendo considerado eficaz no tratamento da flacidez cutânea (AMSELEM, 2015; GRAIVIER *et al.*, 2018; KADOUCH, 2017; NOWAG *et al.*, 2023; RAKSHIT *et al.*, 2020).

Entretanto, é possível observar nas Figuras 22A e 22B que o tratamento com Radiesse® não aumentou a expressão gênica de colágeno tipo I e tipo III quando comparado ao controle. Entretanto, a Nano CaHA Lac aumentou em mais de 3,5 vezes a expressão gênica de colágeno tipo I e em mais de 19 vezes a produção de colágeno tipo III quando comparada ao controle e ao Radiesse®. Tal dado nos permite inferir que, mesmo com o tamanho reduzido, a Nano CaHA Lac apresenta potencial indutor de produção de colágeno e consequente ação no tratamento da flacidez cutânea.

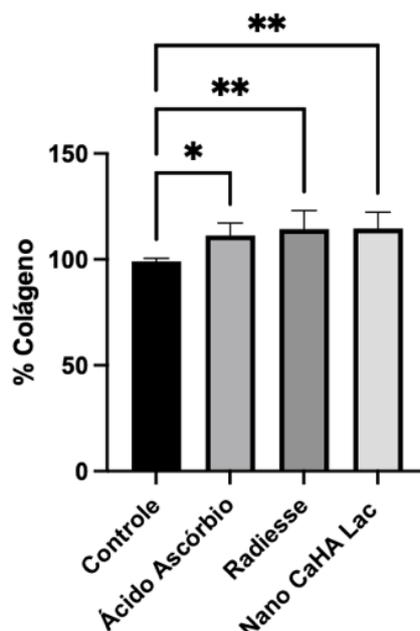
Figura 22. Avaliação da expressão gênica relativa de colágeno pela ação do tratamento com Radiesse® e Nano CaHA Lac em fibroblastos humanos após 48h de incubação, através da técnica de qPCR. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *. (A) COL1; (B) COL3.



6.6.3. Avaliação de produção de colágeno

Afim de confirmar o potencial indutor de produção de colágeno pelos tratamentos propostos, avaliou-se a produção de colágeno tipo I em fibroblastos humanos após o tratamento com 0,0313% de Nano CaHA Lac e Radiesse®. Utilizou-se o ácido ascórbico (50 µg/mL) como controle positivo devido a sua ação indutora de produção de colágeno reconhecida (MURAD *et al.*, 1981; PINNELL, 1985).

Figura 23. Avaliação da produção de colágeno tipo I em fibroblastos humanos após 48 horas de tratamento com Radiesse® e Nano CaHA Lac. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo enquanto os fibroblastos humanos não tratados foram considerados como controle negativo. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ ****; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *.



Na Figura 23 é possível observar que há um aumento de aproximadamente 14% na concentração de colágeno tipo I produzido pelos grupos tratados com Radiesse® e Nano CaHA Lac em relação ao controle. Além disso, não há diferença estatística significativa entre os dois grupos de tratamento e em relação ao controle positivo.

Nota-se que, ao comparar-se com os estudos de análise de expressão realizados anteriormente, apesar do Radiesse® não aumentar a expressão gênica de colágeno tipo I, ele estimula a produção da proteína quando em contato direto com os fibroblastos humanos, assim como observado em estudos anteriores (NOWAG *et al.*, 2023).

Estudos anteriores demonstraram que há uma supressão da expressão gênica de colágeno tipo I por ação de CaHA de tamanho nanométrico (RAKSHIT *et al.*, 2020). Além disso, dados apresentados previamente neste estudo demonstraram que não houve o aumento da expressão gênica de colágeno tipo I por Nano CaHA Lac a 0,065% em relação ao controle em culturas isoladas de fibroblastos humanos, ao contrário do observado quando em co-cultura com PBMC.

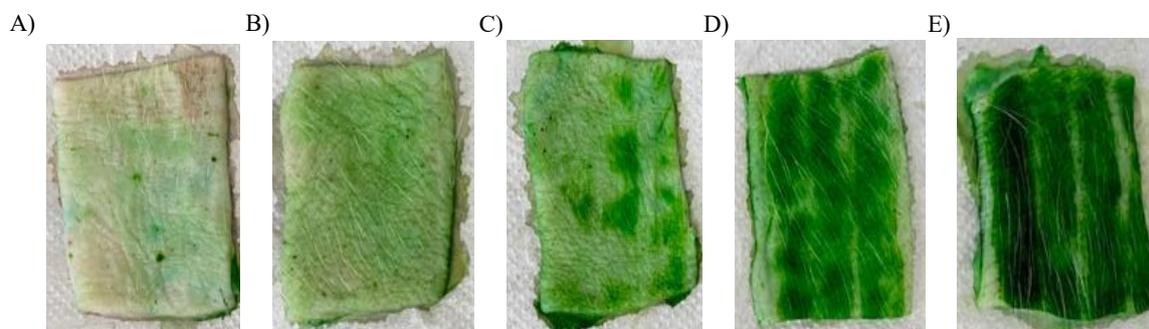
Entretanto, conforme supracitado, é possível observar na Figura 22 o aumento da produção da proteína colágena tipo I no tratamento de cultura de fibroblastos humanos isolados com Nano CaHA Lac a 0,0313%. Tal fato pode estar relacionado a possível proliferação celular observada nessa concentração no item 6.6.1. Os dados obtidos então confirmam mais uma vez o potencial indutor de produção de colágeno de Nano CaHA Lac, possibilitando seu uso para tratamento de flacidez cutânea.

6.7. Microagulhamento em pele de orelha de porco

Após a realização da técnica de microagulhamento em pele de orelha de porco, utilizando microagulhas automatizadas previamente embebidas em corante, é possível observar que quanto maior a profundidade pré-determinada para penetração das microagulhas na pele, uma maior quantidade de pigmento que permanece retido nas camadas da pele após a sua lavagem (Figura 24). Tal fato abre precedentes para se inferir que a lesão causada no estrato córneo é diretamente proporcional ao calibre da microagulha utilizada.

Apesar de ser possível verificar, macroscopicamente, que a profundidade dos microcanais aumenta de acordo com o aumento da profundidade escolhida, análises histológicas de estudos prévios apontam que os microcanais gerados com agulhas de menores comprimentos (0,25 a 1 mm) são mais condizentes com a profundidade proposta quando comparadas a de agulhas mais longas (1,5 a 2,5 mm) (SASAKI, 2017).

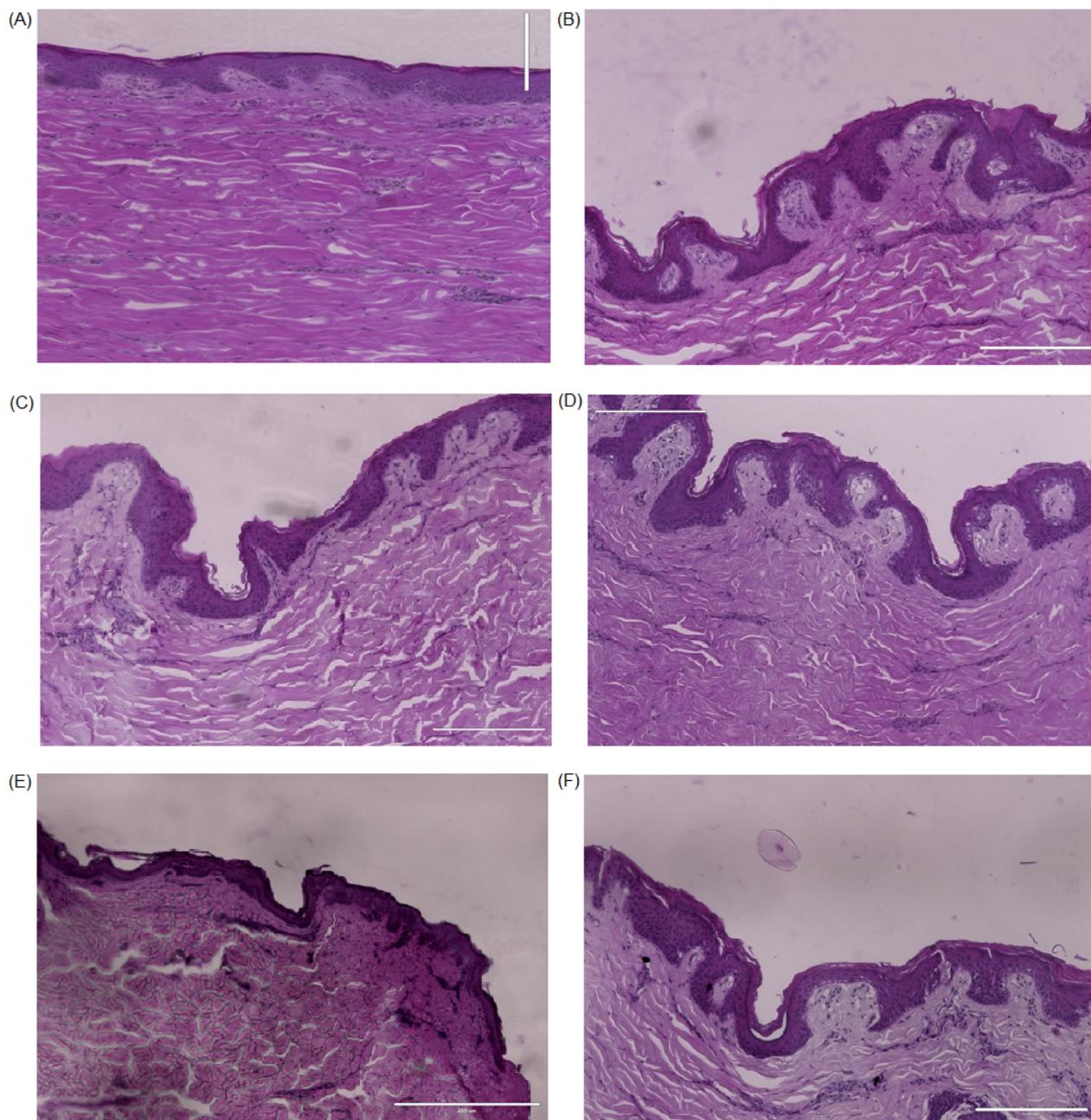
Figura 24. Pele de orelha de porco após realização de microagulhamento automatizado com dermapen, com ponteiros previamente embebidas em corante, em diferentes profundidades. (A) 0,25 mm; (B) 0,5 mm; (C) 1,0 mm; (D) 1,5 mm; (E) 2,0 mm.



6.8. Análise histológica da pele de orelha de porco danificada

Após avaliação macroscópica da lesão causada pelo uso das microagulhas automatizadas, análises histológicas foram realizadas para confirmação.

Figura 25. Análise histológica da pele de orelha de porco coradas com hematoxilina e eosina em aumento de 20x. (A) Pele íntegra. (B) 0,25 mm. (C) 0,5 mm (D) 1,0 mm (E) 1,5 mm (F) 2,0 mm.



É possível observar que, quando comparadas a pele íntegra (Figura 25A), todas as profundidades de microagulhas foram capazes de lesionar o estrato córneo. Entretanto, quanto maior a profundidade da microagulha utilizada, maior a lesão gerada. A lesão é identificada através do desprendimento do estrato córneo do restante da epiderme. A técnica de microagulhamento utilizada neste estudo apresenta resultados de lesão de pele de orelha de porco similares ao apresentado pela técnica de tape stripping utilizando dez, para microagulhas com menor profundidade, e vinte fitas, para microagulhas de maior profundidade (BARBALHO et al., 2021).

Após aplicação da técnica de microagulhamento em seres humanos em ensaios clínicos, observa-se perfurações na epiderme por meio de estudos histológicos realizados *ex vivo* (SASAKI, 2017). Mesmo sendo observada lesões no estrato córneo após o microagulhamento neste estudo, não foi possível observar perfurações na região. Essa discordância de resultados pode estar relacionada a diferenças nas técnicas de aplicação, já que no estudo anterior são realizadas vinte passagens com o dispositivo nas direções verticais, horizontais e diagonais enquanto no aqui apresentado são realizadas apenas dez passagens em sentido vertical. Além disso, há uma diferença de tensão observada na pele em testes *in vitro* com pele de orelha de porco quando comparada a pele humana em ensaios clínicos, podendo também interferir nos resultados encontrados.

6.9. Método Analítico

Afim de avaliar a permeação da CaHA nas camadas da pele de orelha de porco, faz-se necessário quantificar o Ca presente nesse ativo. A FAAS é uma das técnicas com maior precisão para quantificação de Ca em fluidos biológicos (SENA; BOWERS, 1988). Estudos mostram sua quantificação em cabelos (DOS SANTOS *et al.*, 2018), ossos (SCANCAR *et al.*, 2000), sêmen (SØRENSEN *et al.*, 1999) e soro humano (TIETZ *et al.*, 1994).

A validação do método analítico teve como objetivo comprovar que o método é adequado à finalidade a que se destina, mediante critérios estabelecidos pela legislação vigente, além de produzir resultados confiáveis (ANVISA, 2017; ICH, 2022).

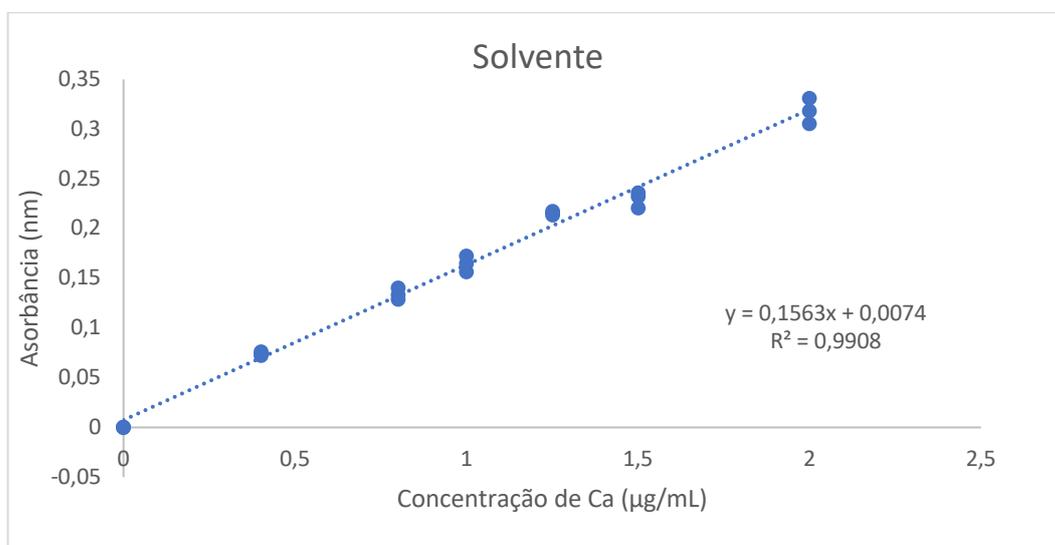
6.9.1. Linearidade e Efeito Matriz

A linearidade é a capacidade de se obter respostas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra através de um método analítico, dentro de um intervalo determinado. Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar pelo menos cinco concentrações do analito em, no mínimo, triplicata amostral (ANVISA, 2017).

As concentrações escolhidas foram 0,0; 0,4; 0,8; 1,0; 1,25; 1,5 e 2,0 µg/mL, utilizando ácido nítrico 2% como solvente. Tais concentrações foram selecionadas pois a faixa ótima de trabalho para a quantificação de Ca por FAAS é entre 0,01 a 3,0 µg/mL (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017), apresentando uma relação linear em toda a faixa estabelecida para o método.

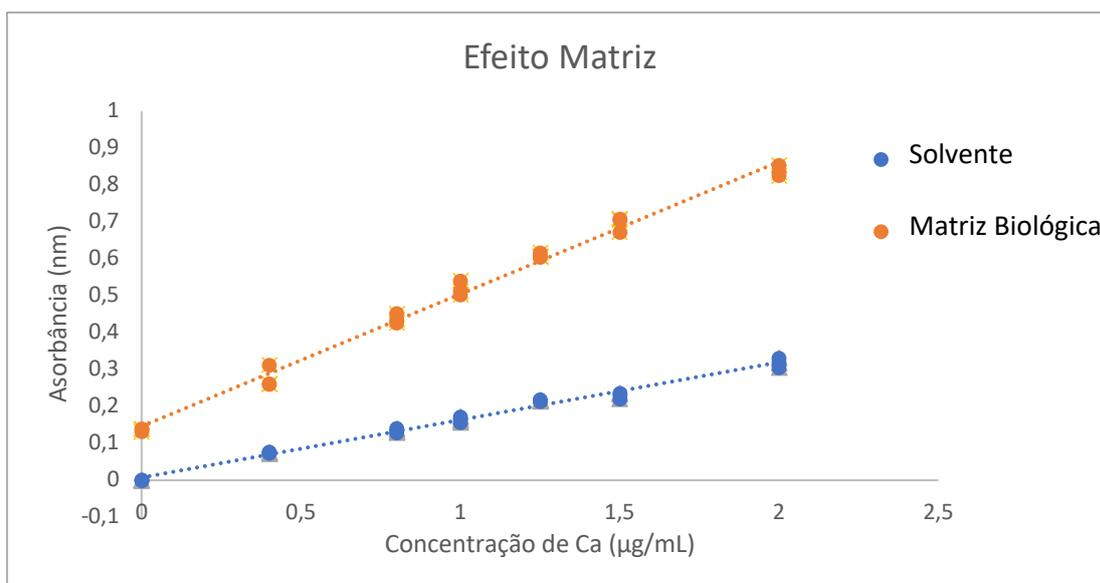
Conforme apresentado na Figura 26, a curva apresentou proporcionalidade entre a absorbância e a concentração dentro de uma faixa de concentrações definida. O cálculo de regressão linear da curva em solvente resultou na equação $y = 0,1563x + 0,0074$, na qual y representa a absorbância e x a concentração de cálcio em $\mu\text{g/mL}$. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9908, estando assim o coeficiente de correlação linear acima de 0,990, de acordo com as diretrizes padronizadas pela ANVISA (2017).

Figura 26. Curva analítica em ácido nítrico 2% obtidas pela análise de concentrações de 0,0 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata; equação da reta: $y = 0,1563x + 0,0074$; $R^2 = 0,9908$.



Sabe-se que é possível ocorrer interferências químicas na chama de ar-acetileno, assim como o aumento do sinal na quantificação de Ca por FAAS pela presença em excesso de sódio ou potássio, suprimindo ou amplificando a ionização do analito (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017). Afim de avaliar um possível efeito matriz, construiu-se então duas curvas analíticas conforme descrito no item 5.9.3.1.

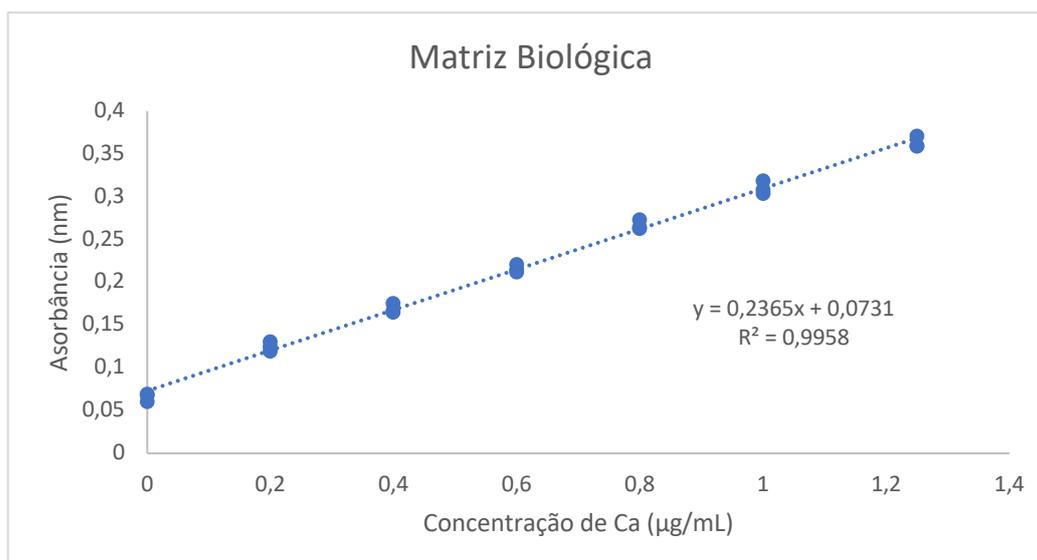
Figura 27. Correspondência entre as curvas em ácido nítrico 2% (solvente) e a curva em solvente acrescida de 0,5 mL de matriz biológica, realizadas em triplicata. Equação da reta: $y = 0,1563x + 0,0074$. $R^2 = 0,9908$; Equação da reta: $y = 0,3584x + 0,1461$. $R^2 = 0,9919$ para Matriz Biológica.



É possível observar na Figura 27 um paralelismo entre as curvas de solvente e adicionadas de 0,5 mL de matriz biológica, onde não há nenhum ponto em comum entre ambas as retas. Nota-se que quando em contato com a matriz biológica, a absorbância de Ca na mesma concentração que em solvente é amplificada. Essa interferência pode estar relacionada com a presença de Ca na pele, assim como de outros minerais. Tal fato configura a interferência da matriz biológica para quantificação do analito em questão, configurando o efeito matriz (ANVISA, 2017).

Afim de evitar a ação do efeito matriz na quantificação de Ca em ensaios posteriores, avaliou-se a linearidade do método quando em contato com a matriz biológica. Para tal, construiu-se curvas analíticas, em triplicata, nas concentrações de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,25 µg/mL da solução estoque em ácido nítrico 2% adicionada de 0,5 mL de matriz biológica.

Figura 28. Curva analítica em ácido nítrico 2% acrescido de 0,5 mL de matriz biológica, obtidas pela análise de concentrações de 0,0 a 1,25 µg/mL, em triplicata; equação da reta: $y = 0,2365x + 0,0731$; $R^2 = 0,9958$.



Conforme apresentado na Figura 28, a curva também apresentou proporcionalidade entre a absorbância e a concentração dentro de uma faixa de concentrações definida. O cálculo de regressão linear da curva em solvente resultou na equação $y = 0,2365x + 0,0731$ na qual y representa a absorbância e x a concentração de cálcio em $\mu\text{g/mL}$. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9958, estando assim o coeficiente de correlação linear acima de 0,990, de acordo com as diretrizes padronizadas pela ANVISA (2017).

Para confirmação da interferência da matriz biológica na sinalização e quantificação de Ca pelo método proposto, o efeito matriz foi então calculado a partir da análise do ponto baixo (0,2 $\mu\text{g/mL}$) e do ponto alto (1,25 $\mu\text{g/mL}$) acrescidos de 0,5 mL de matriz biológica, em triplicata, obtidas a partir de seis lotes distintos de orelha de porco (ICH, 2022). Os dados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 5. Valores de concentração real, precisão e exatidão da concentração teórica do ponto baixo e ponto alto da curva analítica em ácido nítrico 2% acrescida de 0,5 mL de matriz biológica para avaliação de efeito matriz.

Conc. Teórica	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
0,2	$0,2466 \pm 0,0180$	7,3	134,45
1,25	$1,5675 \pm 0,0292$	1,86	127,24

Observa-se que há uma amplificação de 34,45% de Ca mensurado, com coeficiente de variação (CV) 7,30%, no ponto baixo e de 27,24% no ponto alto, com CV 1,86%, a partir da regressão linear obtida nas amostras ausentes de acréscimo da matriz

biológica. Tais dados confirmam o efeito matriz indicado pelo paralelismo das retas identificado previamente, pois está acima do limite de exatidão de $\pm 15\%$ e com CV inferior a 15%, conforme determinado pelo ICH (2022).

A partir de tais dados, a validação do método analítico prosseguiu utilizando-se as concentrações de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ da solução estoque em ácido nítrico 2% adicionada de 0,5 mL de matriz biológica.

6.9.2. Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método analítico em identificar e quantificar o analito de interesse, de forma inequívoca, na presença de impurezas, diluentes e componentes da matriz (ICH, 2022, ANVISA, 2017). O objetivo do método analítico neste trabalho é quantificar o Ca contido na Nano CaHA Lac na presença da matriz biológica, após ensaios de permeação cutânea.

A utilização de lâmpada de 422,7 nm de comprimento de onda é seletiva para quantificação de Ca por FAAS. Porém, conforme descrito anteriormente, observa-se a presença de Ca na matriz biológica e presença de efeito matriz. Afim de demonstrar a seletividade do método, mesmo em contato com a matriz biológica, verificou-se a ausência de significância na quantificação no ponto baixo da curva analítica (0,2 $\mu\text{g/mL}$). Os dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 6. Valores de concentração real, precisão e exatidão da concentração teórica do ponto baixo da curva analítica em ácido nítrico 2% acrescida de 0,5 mL de matriz biológica.

Conc. Teórica	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
0,2	0,1874 \pm 0,0218	11,66	93,70

Observa-se que o coeficiente de variação (CV) para quantificação de Ca com concentração teórica de 0,2 $\mu\text{g/mL}$, exposto a seis matrizes biológicas individuais e distintas, foi de 11,66%. Já o grau de concordância entre os resultados obtidos em relação a concentração teórica foi de 93,70%. Tais achados confirmam a seletividade do método para quantificação de Ca quando em contato com a matriz biológica em questão, uma vez que são inferiores a $\pm 20\%$ (ICH, 2022).

6.9.3. Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) de um método corresponde a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão (ANVISA, 2017).

Tabela 7. Limites de detecção e quantificação de Ca em ácido nítrico 2% acrescido de 0,5 mL de matriz biológica.

Conc. Teórica	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
LD	0,0078
LQ	0,0235

O LD e LQ foram calculados através da Equação 2 e Equação 3, respectivamente, citadas na metodologia e expressos na tabela acima. O LD foi igual 0,0078 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ a 0,0235 $\mu\text{g/mL}$. A partir destes dados, confirma-se a alta sensibilidade do método inferida a partir da faixa de trabalho ideal de 0,01 a 3,0 $\mu\text{g/mL}$ para quantificação de Ca por FAAS utilizando lâmpada de comprimento de onda 422,7 nm (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017), sendo capaz de quantificar Ca, mesmo em pequenas quantidades, na matriz biológica proposta. Assim, este método viabiliza a quantificação de Nano CaHA Lac por meio da quantificação de Ca após ensaios de permeação cutânea.

6.9.4. Precisão e Exatidão

A precisão de um método analítico é baseada na proximidade entre os resultados obtidos a partir de amostras distintas e preparadas de maneira independente, utilizando o mesmo método. É expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (ANVISA, 2017).

Neste trabalho foram determinadas a repetibilidade e precisão intermediária, através de 5 concentrações em triplicata. Utilizou-se como concentrações o ponto baixo, até 3 vezes o ponto baixo, de 30 a 50% da curva analítica, até 75% do ponto alto e o ponto alto. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 6, em função do coeficiente de variação (CV%). De acordo com a legislação vigente, esses valores não podem ultrapassar 20% no ponto baixo e 15% nos demais pontos (ICH, 2022). A precisão para quantificação de Ca na matriz biológica de 1,215% a 11,392%, classificando o método como preciso.

A exatidão é obtida por meio do grau de concordância entre os resultados experimentais obtidos do método em estudo em relação à concentração teórica tida como verdadeira. Para ensaios bioanalíticos, é permitido um intervalo de $\pm 20\%$ para o ponto baixo e $\pm 15\%$ para os demais pontos (ICH, 2022). O intervalo não ultrapassou 11% em nenhuma das análises, classificando o método como exato.

Tabela 8. Valores de precisão e de exatidão intra e interensaio do método analítico para o Ca em ácido nítrico 2% acrescida de 0,5 mL de matriz biológica.

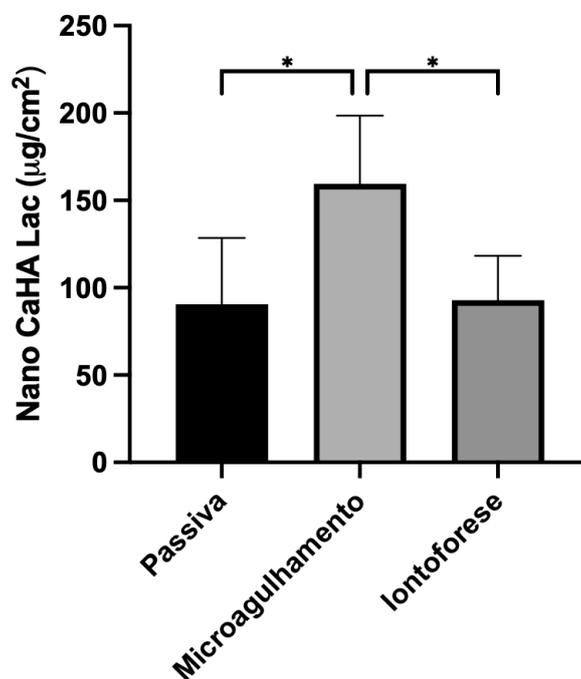
Dia	Conc. Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
1	0,2	$0,1998 \pm 0,017$	8,585	100,077
	0,4	$0,372 \pm 0,042$	11,392	107,601
	0,6	$0,542 \pm 0,023$	4,325	110,769
	1,0	$0,883 \pm 0,039$	4,430	113,260
	1,25	$1,220 \pm 0,090$	7,357	102,494
2	0,2	$0,215 \pm 0,016$	7,663	93,027
	0,4	$0,418 \pm 0,012$	2,874	95,744
	0,6	$0,666 \pm 0,016$	2,384	90,157
	1,0	$0,966 \pm 0,012$	1,215	103,508
	1,25	$1,205 \pm 0,036$	3,017	103,708

6.10. Avaliação *in vitro* de permeação cutânea do Hidroxiapatita de Cálcio

A via tópica é utilizada como via de administração de diversos ativos dermatológicos de ação local, porém sua permeação depende de diversas características, como o tamanho de partícula reduzido (OH *et al.*, 2019). Além disso, o uso de algumas técnicas como microagulhamento e iontoforese pode facilitar a permeação cutânea desses ativos (GRATIERI *et al.*, 2008; MATOS *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2014; TAUM-MAHMOOD *et al.*, 2013).

Afim de avaliar a permeação de Nano CaHA Lac nas camadas da pele, ensaios *in vitro* de permeação cutânea da suspensão de Nano CaHA Lac 1% (m.v.) em tampão fosfato foram realizados em pele de orelha de porco por 12 horas de forma passiva, posteriormente a realização de microagulhamento e com a aplicação de iontoforese por 6 horas seguidas de permeação passiva por mais 6 horas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 29.

Figura 29. Estudo de permeação passiva, após microagulhamento e com iontoforese com densidade de corrente $0,5 \text{ mA/cm}^2$ da suspensão de Nano CaHA Lac 1% (m.v.) Análise estatística por ANOVA, (*) $p \leq 0,05$.



Após os ensaios de permeação, afim de quantificar a Nano CaHA Lac permeada, realizou-se a quantificação de Ca presente na Nano CaHA Lac por meio de método previamente validado por FAAS. Sabe-se, baseado no peso molecular de CaHA (1004,6 g/mol) e de Ca (40,078 g/mol), que a suspensão de Nano CaHA Lac 1% possui 3590,5 µg de Ca. Logo, a quantidade máxima de Ca permeada seria de 2400 µg/cm². Esse valor corresponde então a 36% da Nano CaHA Lac permeada.

Os dados apresentados na Figura 29 demonstram que houve permeação de $90,5 \pm 38,9 \text{ µg/cm}^2$ de Nano CaHA Lac de forma passiva, de $159,4 \pm 39,2 \text{ µg/cm}^2$ utilizando o microagulhamento realizado previamente ao ensaio e de $92,9 \pm 25,4 \text{ µg/cm}^2$ com a aplicação de iontoforese por 6 horas associada a 6 horas posteriores de permeação passiva. A quantidade máxima de Nano CaHA Lac a ser permeada após o ensaio poderia ser de 6666,7 µg/cm². Logo, os valores mensurados correspondem a 1,36%, 2,39% e 1,39% da quantidade máxima de Nano CaHA Lac que poderia ser permeada a partir da sua suspensão a 1% (m.v.).

O uso do microagulhamento visa criar microporos no estrato córneo e na epiderme viável, facilitando a permeação de moléculas de alto peso molecular, macromoléculas, cosméticos, peptídeos e vacinas de maneira minimamente invasiva e segura pela pele

(REIS *et al.*, 2014; SASAKI, 2017). O microagulhamento, isolado ou em conjunto com outros promotores de permeação, aumenta consideravelmente a permeação de moléculas tanto em experimentos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* (TUAN-MAHMOOD *et al.*, 2013). Os dados apresentados na Figura 29 demonstram que há um aumento de 76,13% na quantidade de Nano CaHA Lac permeada em pele de orelha de porco, previamente microagulhada com microagulhas a 2,0 mm de profundidade, por 12 horas quando comparada a permeada passivamente. A técnica de microagulhamento danifica o estrato córneo, conforme observado neste estudo e descrito em estudos anteriores (REIS *et al.*, 2014; SASAKI, 2017). Acredita-se que o tamanho de partícula reduzido de Nano CaHA Lac associado ao dano ao estrato córneo causado pelo microagulhamento influenciou no aumento da permeação quando comparada à permeação passiva.

A utilização da iontoforese para aplicação tópica de ativos faz com que o estrato córneo deixe de ser a principal barreira de penetração de moléculas hidrofílicas, carregadas ou não, que passam a utilizar vias de baixa resistência como alternativas. Essa permeação pode ser explicada pela eletromigração e pela eletrosmose. A eletromigração é o movimento ordenado dos íons na presença da corrente elétrica. Já a eletrosmose gera o aumento do transporte de cátions e de compostos não carregados, induzido por um fluxo de solvente na direção ânodo-cátodo. O movimento de moléculas positivas ocorre afim de neutralizar as cargas negativas da pele em condições fisiológicas normais, e como consequência carrega um volume de solvente contendo as moléculas neutras não dissolvidas (ANDRADE *et al.*, 2023; GRATIERI *et al.*, 2008; GUY *et al.*, 2000; MATOS *et al.*, 2017).

Os dados apresentados na Figura 29 demonstram que não há diferença estatística significativa na quantidade de Nano CaHA Lac permeada com o uso da iontoforese por 6 horas em conjunto com a permeação passiva por mais 6 horas, em comparação a permeação passiva por 12 horas. Acredita-se que a eletrosmose não foi favorecida devido ao tamanho de Nano CaHA Lac ($566,16 \pm 39,79$ nm), uma vez que sua contribuição para o movimento de partículas apresenta maior influência em partículas grandes (ANDRADE *et al.*, 2023).

Sabe-se que partículas de tamanho micrométrico, alto peso molecular e hidrofílicas apresentam dificuldade para permear o estrato córneo (SHAKER *et al.*, 2019b; VITORINO *et al.*, 2015), não sendo assim possível a aplicação tópica de Radiesse®. Portanto, a única via de administração de CaHA até então utilizada para fins de bioestimulação de colágeno é a via injetável. Entretanto, procedimentos injetáveis

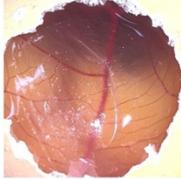
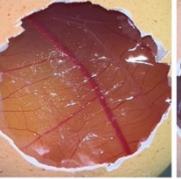
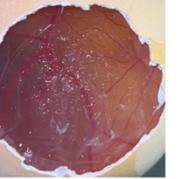
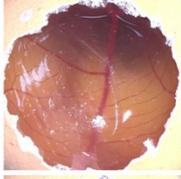
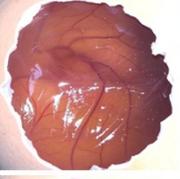
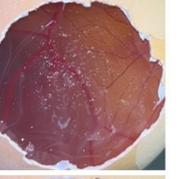
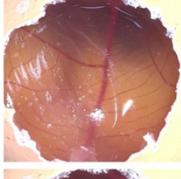
apresentam possibilidade de gerar complicações e intercorrências como comprometimento vascular e formação de nódulos, não estando relacionadas a CaHA em si, mas principalmente à erros de aplicação (KADOUCH, 2017; KASSIR *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2016).

Os dados obtidos através dos ensaios de permeação *in vitro* nos permitem inferir que o uso da Nano CaHA Lac proporcionou a permeação de CaHA através do estrato córneo devido ao seu tamanho de partícula reduzido. Logo, a administração de CaHA pela via tópica se torna viável com a utilização da Nano CaHA Lac em suspensão, se mostrando como uma alternativa mais segura ao uso injetável de CaHA para o tratamento de sinais do envelhecimento.

6.11. Avaliação *in vitro* do potencial irritativo

O método de HET-CAM é amplamente utilizado por se tratar de uma alternativa aos *in vivo* de avaliação de irritabilidade cutânea. Este método consiste na aplicação direta da amostra na membrana cório-alantoide de ovos fecundados para observação de reações vasculares adversas como hemorragia, hiperemia e coagulação após tempos pré-determinados (DELGADO *et al.*, 2023; LUEPKE, 1985). Os resultados da caracterização do potencial irritativo das suspensões de Nano CaHA Lac 1% em comparação aos controles positivo e negativo estão apresentados na Figura 30.

Figura 30. Sequência ilustrativa das imagens do ensaio de HET-CAM demonstrando o efeito do controle negativo (NaCl 0,9%), controle positivo (NaOH 1 mol/L) e triplicata experimental de Nano CaHA Lac 1% (m.v.) na membrana cório-alantoide nos tempos 0 seg, 30 seg, 2 min e 5 min.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Controle positivo	Controle negativo
Antes					
30"					
2'					
5'					
II	0	0	0	17	0

As imagens foram capturadas antes da exposição e após 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos de exposição da membrana cório-alantoide às amostras testadas. Observa-se que o controle negativo não apresentou nenhuma reação vascular adversa durante todo o experimento, sendo então caracterizado como não irritante por apresentar índice de irritabilidade 0. Já o controle positivo apresentou diversas alterações vasculares na membrana. É possível observar o aumento da vascularização e calibre dos vasos com 30 segundos de experimento, além de alteração da coloração associada ao rompimento dos vasos e extravasamento de sangue a partir de 2 minutos. Com isso, o controle positivo gerou um índice de irritabilidade 17 e foi classificado como irritante severo.

É possível observar que todas as amostras de Nano CaHA Lac 1% (m.v.) apresentaram efeito semelhante ao desempenhado pelo controle negativo, não apresentando nenhuma alteração vascular ao longo de todo o experimento. Assim, foi então caracterizada como não irritante por apresentar índice de irritabilidade 0. Este resultado está em conformidade com o descrito anteriormente na literatura. Além de ser

considerada biocompatível, Coelho e colaboradores (2019) avaliaram o potencial irritativo por meio do ensaio de HET-CAM de uma suspensão de nanopartículas de hidroxiapatita de cálcio em meio α -MEM (3,1%), sendo considerada não irritante (COELHO *et al.*, 2019).

7. RESUMO DOS RESULTADOS

Partículas de tamanho nanométrico e micrométrico, com e sem lactose, foram obtidas pelas técnicas de nanospray drying e spray drying, respectivamente. Por meio de técnicas de análise térmica constatou-se a interação da Lactose com a Commercial CaHA quando pulverizadas e secas em conjunto pela técnica de nanospray drying, gerando a formulação Nano CaHA Lac, e pela técnica de Spray Dryer, gerando a formulação Micro CaHA. Ensaios preliminares *in vitro* em culturas de fibroblastos humanos revelaram que as partículas nanométricas aumentam a divisão celular e expressão gênica de genes relacionados à inflamação e produção de colágeno. A partir desses dados, optou-se pela Nano CaHA Lac para prosseguimento dos estudos.

A partir de co-culturas de fibroblastos humanos e PBMC, observou-se um maior aumento na expressão gênica de genes relacionados ao perfil inflamatório que proporciona a produção de colágeno, além do aumento da expressão gênica de colágeno tipo 1 e colágeno tipo 3 pelas Nano CaHA Lac em comparação ao produto comercial atualmente utilizado de maneira injetável (Radiessse®) e o controle de células não tratadas. Observou-se também o aumento da produção de colágeno tipo 1 pelos fibroblastos humanos tratados com Nano CaHA Lac em relação ao controle de células não tratadas.

Visando promover o aumento da permeação cutânea de Nano CaHA Lac, realizou-se a aplicação de microagulhamento automático na pele de orelha de porco e através da análise macroscópica com o uso de microagulhas de 2,0 mm de profundidade, condição que proporcionou dano comprovado por avaliação histológica.

Afim de quantificar o Ca contido na CaHA em estudos de permeação *in vitro* posteriores, um método analítico por FAAS foi validado e pode-se observar que, mesmo com a presença de cálcio na matriz biológica, é possível recuperar e quantificar o Ca da CaHA após digestão da pele. Avaliou-se então a permeação de Nano CaHA Lac de maneira passiva, após microagulhamento com 2,0 mm de profundidade e com uso da iontoforese aplicado à pele intacta. Foi possível constatar que a iontoforese não apresentou diferença estatística significativa para permeação de Nano CaHA Lac quando

comparada a permeação passiva. Porém, a associação com microagulhamento aumentou em 76,13% a permeação de Nano CaHA Lac quando comparada a forma passiva. Assim, percebe-se que o tamanho de partícula reduzida possibilita a permeação cutânea de CaHA tanto de maneira passiva como após o uso do microagulhamento por meio da via tópica. Por fim, comprovou-se que a suspensão de Nano CaHA Lac é não irritante para aplicação tópica.

8. CONCLUSÃO

O presente trabalho desenvolveu com sucesso uma formulação cosmética que possibilita a aplicação tópica da Hidroxiapatita de Cálcio, formulada como nanopartículas de lactose. A formulação denominada Nano CaHA Lac apresenta-se como uma alternativa eficaz e segura para aplicação tópica de CaHA tanto de maneira passiva, quanto após o microagulhamento, visando estimular a produção de colágeno e realizar o tratamento de sinais do envelhecimento como a flacidez cutânea.

9. REFERÊNCIAS

AGILENT TECHNOLOGIES. Flame Atomic Absorption Spectrometry, **Method Development ePrimer**. 2017

AMSELEM, M. Radiesse®: A novel rejuvenation treatment for the upper arms. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 9, p. 9–14, 2015.

ANDRADE, J. F. M.; CUNHA-FILHO, M.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T. Iontophoresis for the cutaneous delivery of nanoentrapped drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 20, n. 2, p. 785-79, 2023.

ANVISA. **Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA**. 2017.

ASPS. **PLASTIC SURGERY STATISTICS REPORT 2020**. 2020.

ASSADPOUR, E.; MAHDI JAFARI, S. Advances in Spray-Drying Encapsulation of Food Bioactive Ingredients: From Microcapsules to Nanocapsules. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n. 1, 2019.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 2005.

BARBALHO, G. N.; MATOS, B. N.; ESPIRITO SANTO, M. E. L.; SILVA, V. R. C.; CHAVES, S. B.; GELFUSO, G. M.; CUNHA-FILHO, M.; GRATIERI, T. In vitro skin model for the evaluation of burn healing drug delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 62, 2021.

BERTUCCELLI, G.; ZERBINATI, N.; MARCELLINO, M.; KUMAR, N. S. N.; HE, F.; TSEPAKOLENKO, V.; CERVI, J.; LORENZETTI, A.; MAROTTA, F. Effect of a quality-controlled fermented nutraceutical on skin aging markers: An antioxidant-control, double-blind study. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 3, p. 909–916, 2016.

BORBA, A.; MATAYOSHI, S. **Técnicas de rejuvenescimento facial: toxina botulínica e MD Codes™**. Buzz Editora, 2018.

BRAGA, K. M. da S.; PIMENTA, V. de S. C.; RODRIGUES, F. A.; DOS SANTOS, T. P.; DE ARAÚJO, E. G. Citometria de fluxo: histórico, princípios básicos e aplicações em pesquisa. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 23, p. 304–319, 22 jun. 2016.

BRAZ, A. V.; SAKUMA, T. H. **Atlas de Anatomia e Preenchimento Global da Face**. 2017.

BÜCHI, L. A. Nano Spray Dryer B-90 HP. **Operation manual**. 2017.

BÜCHI, L. A. **Spray drying**. Disponível em: <<https://www.buchi.com/pt/spray-drying>>. Acesso em: 5 jun. 2023.

C. TEIXEIRA, M. A.; PICCIRILLO, C.; TOBALDI, D. M.; PULLAR, R. C.; LABRINCHA, J. A.; FERREIRA, M. O.; L. CASTRO, P. M.; E. PINTADO, M. M. Effect of preparation and processing conditions on UV absorbing properties of hydroxyapatite-Fe₂O₃ sunscreen. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 141–149, 2017.

CARVALHO, J. A. E.; FERREIRA, R. G. R.; BEZERRA, M. R.; HENRIQUES, A. B. Caracterização, estudo do potencial zeta e da flotabilidade de apatita e vermiculita. **XXVII Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa**, 2017.

CHAO, Y. Y.; KIM, J. W.; KIM, J.; KO, H.; GOLDIE, K. Hyperdilution of caha fillers for the improvement of age and hereditary volume deficits in east asian patients. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 11, p. 357–363, 2018.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 5p. 2-63. 2017.

COELHO, C. C.; GRENHO, L.; GOMES, P. S.; QUADROS, P. A.; FERNANDES, M. H. Nano-hydroxyapatite in oral care cosmetics: characterization and cytotoxicity assessment. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

COLEMAN, K. M.; VOIGTS, R.; DEVORE, D. P.; TERMIN, P.; COLEMAN, W. P. Neocollagenesis after injection of calcium hydroxylapatite composition in a canine model. **Dermatologic Surgery**, v. 34, n. SUPPL 1, p. 53–55, 2008.

CORDUFF, N. Introducing aesthetic regenerative scaffolds: An immunological perspective. **Journal of Cosmetic Dermatology**. 2023.

COSTA-RODRIGUES, J.; SILVA, A.; SANTOS, C.; ALMEIDA, M. M.; COSTA, M. E.; FERNANDES, M. H. Complex effect of hydroxyapatite nanoparticles on the differentiation and functional activity of human pre-osteoclastic cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 12, p. 3590–3600, 2014.

COURDEROT-MASUYER, C.; ROBIN, S.; TAUZIN, H.; HUMBERT, P. Evaluation of lifting and antiwrinkle effects of calcium hydroxylapatite filler. In vitro quantification of contractile forces of human wrinkle and normal aged fibroblasts treated with calcium hydroxylapatite. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 15, n. 3, p. 260–268, 2016.

CRUZ, I. B. M. da; SEVERO, A. L.; AZZOLIN, V. F.; GARCIA, L. F. M.; KUHN, A.; LECH, O. Potencial regenerativo do tecido cartilaginoso por células-tronco mesenquimais: atualização, limitações e desafios. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 52, n. 1, p. 2–10, 2017.

DABROWSKA, A. K.; ROTARU, G. M.; DERLER, S.; SPANO, F.; CAMENZIND, M.; ANNAHEIM, S.; STÄMPFLI, R.; SCHMID, M.; ROSSI, R. M. Materials used to simulate physical properties of human skin. **Skin Research and Technology**, v. 22, n. 1, p. 3–14, 2016.

DE ALMEIDA, A. T.; FIGUEREDO, V.; DA CUNHA, A. L. G.; CASABONA, G.; COSTA DE FARIA, J. R.; ALVES, E. V.; SATO, M.; BRANCO, A.; GUARNIERI, C.; PALERMO, E. Consensus Recommendations for the Use of Hyperdiluted Calcium

Hydroxyapatite (Radiesse) as a Face and Body Biostimulatory Agent. **Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open**, v. 7, n. 3, p. 1–9, 2019a.

DE ALMEIDA, A. T.; FIGUEREDO, V.; DA CUNHA, A. L. G.; CASABONA, G.; COSTA DE FARIA, J. R.; ALVES, E. V.; SATO, M.; BRANCO, A.; GUARNIERI, C.; PALERMO, E. Consensus Recommendations for the Use of Hyperdiluted Calcium Hydroxyapatite (Radiesse) as a Face and Body Biostimulatory Agent. **Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open**, v. 7, n. 3, p. 1–9, 2019b.

DOS SANTOS, A. B.; KOHLMEIER, K. A.; ROCHA, M. E.; BARRETO, G. E.; BARRETO, J. A.; DE SOUZA, A. C. A.; BEZERRA, M. A. Hair in Parkinson's disease patients exhibits differences in Calcium, Iron and Zinc concentrations measured by flame atomic absorption spectrometry – FAAS. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 47, p. 134–139, 2018.

DOS SANTOS, M. F. Sistemas baseados em amido termoplástico:pectina contendo hidroxiapatita nanoestruturada visando liberação de fósforo em meio aquoso. **Universidade Federal de São Carlos**, 2013.

EPA, U. S. E. P. A. Acid digestion of oils for metals analysis by atomic absorption or icp spectrometry. **Teste Method 303**, 1996.

FIUME, E.; MAGNATERRA, G.; RAHDAR, A.; VERNÉ, E.; BAINO, F. Hydroxyapatite for biomedical applications: A short overview. **Ceramics**. 2021.

GANCEVICIENE, R.; LIAKOU, A. I.; THEODORIDIS, A.; MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. Skin anti-aging strategies. **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 3, 2012.

GIL, E. de S. Excipientes: suas aplicações e controle físico-químico. **Pharmabooks**, 2007.

GRAIVIER, M. H.; LORENC, Z. P.; BASS, L. M.; FITZGERALD, R.; GOLDBERG, D. J. Calcium Hydroxyapatite (CaHA) Indication for Hand Rejuvenation. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 38, n. April, p. S24–S28, 2018.

GRATIERI, T.; MARTINS GELFUSO, G.; FONSECA, R.; LOPEZ, V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**. 2008.

GUY, R. H.; KALIA, Y. N.; BEGONA DELGADO-CHARRO, M.; MERINO, V.; LOPEZ, A.; MARRO, D. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. **Journal of Controlled Release**. 2000.

ICH. International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use. **ICH HARMONISED GUIDELINE BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION AND STUDY SAMPLE ANALYSIS M10**. 2023.

JENKINS, G.; WAINWRIGHT, L. J.; HOLLAND, R.; BARRETT, K. E.; CASEY, J. Wrinkle reduction in post-menopausal women consuming a novel oral supplement: A double-blind placebo-controlled randomized study. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 36, n. 1, p. 22–31, 2014.

JOANITTI, G. A.; AZEVEDO, R. B.; FREITAS, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Cancer Letters**, v. 293, n. 1, p. 73–81, 2010.

KADOUCH, J. A. Calcium hydroxylapatite: A review on safety and complications. **Journal of Cosmetic Dermatology**. 2017.

KASSIR, M.; GUPTA, M.; GALADARI, H.; KROUMPOUZOS, G.; KATSAMBAS, A.; LOTTI, T.; VOJVODIC, A.; GRABBE, S.; JUCHEMS, E.; GOLDUST, M. Complications of botulinum toxin and fillers: A narrative review. **Journal of Cosmetic Dermatology**. 2020.

KAWAI, K.; LARSON, B. J.; ISHISE, H.; CARRE, A. L.; NISHIMOTO, S.; LONGAKER, M.; LORENZ, H. P. Calcium-based nanoparticles accelerate skin wound healing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229–234, 2011.

KIM, J. Multilayered injection of calcium hydroxylapatite filler on ischial soft tissue to rejuvenate the previous phase of chronic sitting pressure sore. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 12, p. 771–784, 2019.

KUMTA, P. N.; SFEIR, C.; LEE, D. H.; OLTON, D.; CHOI, D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: Novel synthesis and characterization. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 1, p. 65–83, 2005a.

KUMTA, P. N.; SFEIR, C.; LEE, D. H.; OLTON, D.; CHOI, D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: Novel synthesis and characterization. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 1, p. 65–83, 2005b.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine (United Kingdom)**, v. 41, n. 6, p. 317–320, 2013.

LATREILLE, J.; KESSE-GUYOT, E.; MALVY, D.; ANDREEVA, V.; GALAN, P.; TSCHACHLER, E.; HERCBERG, S.; GUINOT, C.; EZZEDINE, K. Association between dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids and severity of skin photoaging in a middle-aged Caucasian population. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n. 3, p. 233–239, 2013.

LIMA, S. G. B.; PINHO, L. A. G.; SA-BARRETO, L. L.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M. Granules of finasteride and cyclodextrin obtained by hot-melt extrusion to target the hair follicles. **Powder Technology**, v. 391, p. 311–320, 2021.

LORENC, Z. P.; BASS, L. M.; FITZGERALD, R.; GOLDBERG, D. J.; GRAIVIER, M. H. Physiochemical Characteristics of Calcium Hydroxylapatite (CaHA). **Aesthetic Surgery Journal**, v. 38, n. April, p. S8–S12, 2018.

MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **Comunicado Técnico 427 Embrapa**, 2018.

MATOS, B. N.; MELO, L. M. A.; PEREIRA, M. N.; REIS, T. A.; CUNHA-FILHO, M.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Iontophoresis on minoxidil sulphate-loaded chitosan nanoparticles accelerates drug release, decreasing their targeting effect to hair follicles. **Quimica Nova**, v. 40, n. 2, p. 154–157, 2017.

MOGHIMIPOUR, E.; SALIMI, A.; EFTEKHARI, S. Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 1, p. 63–71, 2013.

MUKHERJEE, S.; DATE, A.; PATRAVALE, V.; KORTING, H. C.; ROEDER, A.; WEINDL, G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. **Clinical interventions in aging**, v. 1, n. 4, p. 327–348, 2006.

MURAD, S.; GROVE, D.; LINDBERG, K. A.; REYNOLDS, G.; SIVARAJAH, A.; PINNELT, S. R. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid (prolyl hydroxylation/lysyl hydroxylation/human skin fibroblasts). **Biochemistry**. 1981.

NOWAG, B.; CASABONA, G.; KIPPENBERGER, S.; ZÖLLER, N.; HENGL, T. Calcium hydroxylapatite microspheres activate fibroblasts through direct contact to stimulate neocollagenesis. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 426–432, 2023.

OH, L.; YI, S.; ZHANG, D.; SHIN, S. H.; BASHAW, E. In Vitro Skin Permeation Methodology for Over-The-Counter Topical Dermatologic Products. **Therapeutic Innovation and Regulatory Science**, 2019.

OMBREDANE, A. S.; SILVA, L. R. A.; ARAUJO, V. H. S.; COSTA, P. L.; SILVA, L. C.; SAMPAIO, M. C.; LIMA, M. C. F.; VEIGA JUNIOR, V. F.; VIEIRA, I. J. C.; AZEVEDO, R. B.; JOANITTI, G. A. Pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) nanoemulsion alters cell proliferation and damages key organelles in triple-negative breast cancer cells in vitro. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 153, 2022.

PAPAIORDANOU, F.; DE-OLIVEIRA, G. P.; HEXSEL, D.; VATTIMO, A. C. A. Collagen and skin: from the structure to scientific evidence of oral supplementation. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 14, 2022.

PHAM MINH, D.; TRAN, N. D.; NZIHOU, A.; SHARROCK, P. One-step synthesis of calcium hydroxyapatite from calcium carbonate and orthophosphoric acid under moderate conditions. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 4, p. 1439–1447, 2013.

PINNELL, S. R. Regulation of Collagen Biosynthesis by Ascorbic Acid: A Review. **The yale journal of biology and medicine**. 1985.

QUAN, T.; LITTLE, E.; QUAN, H.; QIN, Z.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Elevated matrix metalloproteinases and collagen fragmentation in photodamaged human skin: Impact of altered extracellular matrix microenvironment on dermal fibroblast function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 5, p. 1362–1366, 2013.

RAKSHIT, M.; GAUTAM, A.; TOH, L. Z.; LEE, Y. S.; LAI, H. Y.; WONG, T. T.; NG, K. W. Hydroxyapatite particles induced modulation of collagen expression and secretion in primary human dermal fibroblasts. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 4943–4956, 2020.

REIS, T. A. R.; BARRETO, L. C. L. de S.; CUNHA-FILHO, M. S. S. da; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Microagulhas: estado da arte e aplicações médicas. **Brasília Med**, v. 51, n. 2, p. 159–168, 2014.

RODRIGUES, S. C. C. Avaliação dos efeitos citotóxicos em *Saccharomyces cerevisiae* exposta a cianotoxinas. **Universidade de Lisboa**, 2019.

SAALFELD, U.; MEENEN, N. M.; JIBES, T. T.; SAALFELD, H. Solubility behaviour of synthetic hydroxyapatites in aqueous solution: influence of amorphous constituents on pH value. **Biomaterials**, v. 15, n. 11, 1994.

SÁEZ, G. T. DNA injury and repair systems. **International Journal of Molecular Sciences**, 018.

SALVADOR, M. M. G.; CECHINEL-ZANCHETT, C. C. Nutricosméticos em desordens estéticas: foco na acne e envelhecimento cutâneo. **Archives of health investigation**, v. 8, n. 12, 2020.

SASAKI, G. H. Micro-Needling Depth Penetration, Presence of Pigment Particles, and Fluorescein-Stained Platelets: Clinical Usage for Aesthetic Concerns. **Aesthetic surgery journal**, v. 37, n. 1, p. 71–83, 2017.

SCANCAR, J.; MILACIC, R.; BENEDIK, M.; BUKOVEC, P. Determination of trace elements and calcium in bone of the human iliac crest by atomic absorption spectrometry. **Clinica Chimica Acta**. 2000.

SENA, S. F.; BOWERS, G. N. Measurement of Ionized Calcium in Biological Fluids: Ion-Selective Electrode Method. **Methods in enzymology**, v. 158, p. 320–334, 1988.

SERJEANT, E.; DEMPSEY, B. Ionisation constants of organic acids in aqueous solution. 1979.

SHAKER, D. S.; ISHAK, R. A. H.; GHONEIM, A.; ELHUONI, M. A. Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 3, 2019a.

SHAKER, D. S.; ISHAK, R. A. H.; GHONEIM, A.; ELHUONI, M. A. Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. **Scientia Pharmaceutica** 2019b.

SHI, X. H.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. M.; LEI, Z. Y.; LIU, T.; FAN, D. L. Complications from Nasolabial Fold Injection of Calcium Hydroxylapatite for Facial Soft-Tissue Augmentation: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 36, n. 6, p. 712–717, 2016.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n. 1, 2003.

SØRENSEN, M. B.; BERGDAHL, I. A.; HENRIK, N.; HJØLLUND, I.; PETER, J.; BONDE, E.; STOLTENBERG, M.; ERNST, E. Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. **Molecular Human Reproduction**. p.331-337, 1999.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Science**. 2015.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, p. A3.B.1-A3.B.3, 2015.

STROJEWSKI, D.; KRUPA, A. Spray drying and nano spray drying as manufacturing methods of drug-loaded polymeric particles. **Polimery w medycynie**. 2022.

TIETZ, N. W.; MOORE, L. J.; MACHLAN, L. A.; BOWERS, G. N.; FASSET, J. D.; WHITE, V. E.; CALI, J. P.; BOWERS, G.; YOUNG, D. S.; PICKUP, J. F.; JACKSON, M. J.; PRICE, E. M.; BROWN, S. S.; KÜLPMANN, W. R.; RUSCHKE, D.; BÜTTNER, J.; PASCHEN, K.; NORDMEYER, F. R.; HANSEN, L. D.; EATOUGH, D. J.; ROLLINS, D. R.; LAMB, J. D.; HAN, K.; KOCH, W. F.; LC-GC; KOCH, W. F. Ion Chromatography as Potential Reference Methodology for the Determination of Total Calcium and Magnesium in Human Serum **Analithical Chemistry**. v. 66, n. 14, 1994.

TRACY, L.; RIDGWAY, J.; NELSON, J. S.; LOWE, N.; WONG, B. Calcium hydroxylapatite associated soft tissue necrosis: A case report and treatment guideline.

Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, v. 67, n. 4, p. 564–568, 2014.

TUAN-MAHMOOD, T. M.; MCCRUDDEN, M. T. C.; TORRISI, B. M.; MCALISTER, E.; GARLAND, M. J.; SINGH, T. R. R.; DONNELLY, R. F. Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2013.

URDIALES-GÁLVEZ, F.; DELGADO, N. E.; FIGUEIREDO, V.; LAJO-PLAZA, J. V.; MIRA, M.; MORENO, A.; ORTÍZ-MARTÍ, F.; DEL RIO-REYES, R.; ROMERO-ÁLVAREZ, N.; DEL CUETO, S. R.; SEGURADO, M. A.; REBENAQUE, C. V. **Treatment of Soft Tissue Filler Complications: Expert Consensus Recommendations**. *Aesthetic Plastic Surgery*, 2018.

VAN LOGHEM, J.; FUNT, D.; PAVICIC, T.; GOLDIE, K.; YUTSKOVSKAYA, Y.; FABI, S.; SIEBENGA, P.; THUIS, J.; HKEIK, J.; KADOUCHE, J.; PRAGER, W.; AZIB, N.; CASABONA, G.; DAYAN, S.; BAY AGUILERA, S.; SNOZZI, P.; SAEED, P. Managing intravascular complications following treatment with calcium hydroxylapatite: An expert consensus. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 11, p. 2845–2858, 2020.

VAN LOGHEM, J.; YUTSKOVSKAYA, Y. A.; WERSCHLER, WM. P. Calcium hydroxylapatite Over a Decade of Clinical Experience. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 8, n. 1295–1296, p. 11, 2015.

VITORINO, C.; DE, C.; FARMACÊUTICOS, E.; SOARES, M.; SOUSA, J.; PAIS, A. Permeação cutânea: desafios e oportunidades. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 36, n. 3, p. 337–348, 2015.

WOLLINA, U.; WIEGAND, C.; HIPLER, U. C. Calcium Hydroxylapatite Microspheres - Biocompatibility and Clinical Effects. **Georgian medical news**, n. 278, p. 62–68, 2018.

YOUNG, A.; SMISTAD, G.; KARLSEN, J.; ROLLA, G.; RYKKE, M. Zeta potentials of human enamel and hydroxyapatite as measured by the coulter® delsa 440. **Adv Dent Res** **11**. 1997.