



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO



CAMPUS DIADEMA

CAROLINA ANDREA LEIVA DAL SIN FIORE

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SEGURANÇA E PERMEAÇÃO
DE FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO CAFEÍNA E
BUBBLES ESTIMULADAS PELO ULTRASSOM**

DIADEMA

2019

CAROLINA ANDREA LEIVA DAL SIN FIORE

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SEGURANÇA E PERMEAÇÃO DE
FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO CAFEÍNA E *BUBBLES*
ESTIMULADAS PELO ULTRASSOM**

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Santos Lopes

Co-orientadora: Profa. Dra. Vânia Rodrigues Leite e Silva

DIADEMA

2019

Fiore, Carolina Andrea Leiva Dalsin

Avaliação *in vitro* da segurança e permeação de formulação tópica contendo cafeína e *bubbles* estimuladas pelo ultrassom, Carolina Andrea Leiva Dalsin
Fiore, Diadema, 2019.

96f.

Dissertação (Mestrado em Ciências- Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, 2019.

Orientador: Patrícia Santos Lopes

Co-Orientador: Vânia Rodrigues Leite e Silva

1. Cafeína. 2. *Bubbles*. 3. Métodos *in vitro*. 4. Segurança. 5. Permeação.

I. Título

CDD: 615.7

DEDICATÓRIA

À minha família, que sempre apoiou, incentivou e lutou ao meu lado para a conquista desse
título

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha existência e por toda a história que me permite construir.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Sinceros agradecimentos à CAPES pela bolsa de mestrado e pelo apoio à pesquisa.

Ao amor da minha vida, André Fiore, que acreditou no meu sonho, aguentou todos os percalços que o trajeto trouxe e agora compartilha mais este importante momento de vitória.

Aos meus pais, José e Célia, exemplos de vida e meu alicerce, a quem devo tudo o que sou, e que não mediram esforços para me ajudar a finalizar todos os desafios que o mestrado demandou.

Às minhas filhas, Isabela e Beatriz, razão da minha existência e minhas fontes de expiração, a quem desejo deixar o legado de que nada é impossível, basta querer.

Aos meus irmãos, Sara, Felipe, José Gabriel e Tomás, meu cunhado Leonardo, minha cunhada Camila e minhas amadas sobrinhas Alice e Joana, que compreenderam meu momento, me ampararam e ajudaram no que foi preciso.

Aos meus sogros, Ângelo e Odila, por todo apoio e ajuda que deram para que eu pudesse realizar os trabalhos.

À Profa Dra Patrícia Santos Lopes, que me aceitou como orientada e me deu a oportunidade de voltar à universidade. Aprendi a admirá-la e descobri ser uma pessoa maravilhosa, amante da profissão e de seus alunos. Muito obrigada por contribuir com o meu amadurecimento, pela orientação, confiança, exemplo e incentivo nos muitos momentos que esmoreci.

À Profa Dra Vania Rodrigues Leite e Silva, que me confiou as *bubbles* e me apresentou para a equipe da Austrália. Sua história, trajetória e conquistas me inspiraram e confirmaram a máxima de que, se acreditar, tudo é possível. Seguir em frente, sempre!

Ao Prof. Dr. Harendra S. Parekh, Dr. Sachin Tachur, Karnarker R. Tupally e toda equipe da universidade de Queensland que sempre foram solícitos aos meus questionamentos.

À empresa Embrafarma e à minha grande amiga Miriele, que doaram amostra de cafeína suficiente para realização de todos os experimentos deste trabalho.

À Profa Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, professora do curso de Farmácia da Unicamp, que nos cedeu *vials* com linhagem Hecat.

À Profa Ana Carolina Ribeiro, da Universidade Anhembi Morumbi, que gentilmente nos cedeu o uso do ultrassom diagnóstico para visualização da capacidade ecogênica das *bubbles*.

Ao Dr. César Isaac e equipe do Hospital 9 de Julho, pela doação da pele usada nos experimentos de permeação.

A todos colegas e amigos que a UNIFESP me trouxe em especial Júlia, Andreza, Fúlvio, Caroline Cianga, Yasmin, Carolina Carrieri, Marisa, Rosinês, Alison, Marina, Palloma. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma com esse trabalho, confirmando que uma pesquisa acadêmica só é possível com colaboração. Minha gratidão e carinho a vocês.

Aos Profs Newton, Márcio Andreo e Marcelo Duque que acrescentaram muito com suas análises, avaliações, críticas e sugestões desde o início do mestrado.

Às empresas Pensabio e Spectris do Brasil, especialmente à Geisi, Marcos e Henrique que não fazem dimensão da colaboração e diferencial que deram a este estudo.

Aos meus amigos, que foram pacientes nos momentos que abdiquei compartilhar em prol deste título.

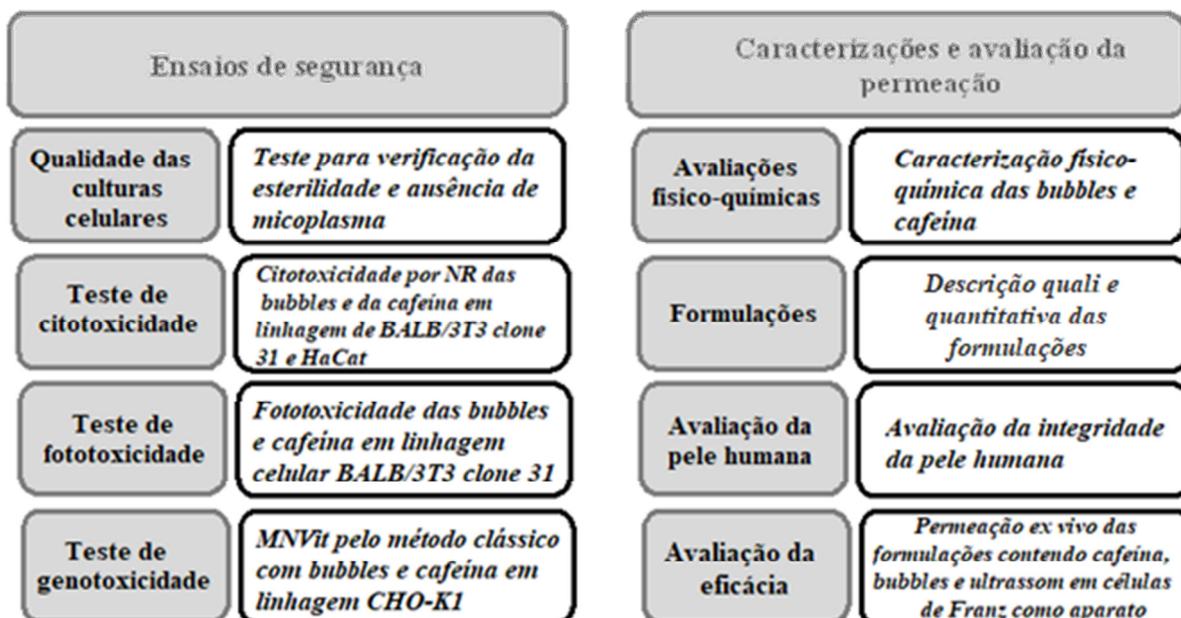
“Nada é suficientemente bom. Então vamos fazer o que é certo, dedicar o melhor de nossos esforços para atingir o inatingível, desenvolver ao máximo os dons que Deus nos concedeu, e nunca parar de aprender.”

Ludwig van Beethoven

Prefácio

O presente trabalho estuda a aplicação das *bubbles* por via tópica e com finalidade cosmética que faz parte de colaboração com a equipe do Prof. Dr. Harendra Parekh, professor sênior da escola de Farmácia da Universidade de Queensland, Austrália. Este grupo aprofunda conhecimento sobre a ação e aplicação das *bubbles*, realizando ampla linha de estudos voltados para a melhoria da entrega de fármacos (THAKUR et al., 2017). O presente trabalho complementa a linha de pesquisa trazendo informações com foco na aplicação tópica, uma vez que as referências sobre o assunto são escassas. As *bubbles* utilizadas em todos os experimentos foram produzidas e fornecidas pela equipe de Queensland, que detém a tecnologia e a patente.

Para uma melhor compreensão, os resultados deste trabalho foram apresentados em dois capítulos distintos. O capítulo 1 abrange dados de segurança encontrados nos ensaios *in vitro* aplicados para avaliação da citotoxicidade, fototoxicidade e genotoxicidade das *bubbles* e da cafeína. O capítulo 2 apresenta informações sobre as características físico-química das *bubbles* e a eficácia utilizando ensaios *ex-vivo* de permeação. A aplicação dos ensaios foi conduzida conforme o fluxograma de atividades a seguir:



Lista de Ilustrações

Figura 1-1. Imagem de garrafas com cultura de Balb/3T3 clone A31 e imagem capturada de visualização em microscópio invertido caracterizando confluência.	21
Figura 1-2. Equipamento de ultrassom utilizado nos experimentos deste estudo que emite ondas ultrassônicas para aplicação em tratamentos estéticos e, neste estudo, para o estímulo das <i>bubbles</i> ; ..	22
Figura 1-3. Esquema representativo do preparo para ensaio de citotoxicidade e fototoxicidade nas placas de 96 poços. Sendo: B = branco; CC = Controle de células; C1 – C8 = 8 concentrações da substância em teste (células + amostra).	23
Figura 1-4. Fotografia da câmara de fototoxicidade utilizada no ensaio com a porta aberta e as microplacas posicionadas.	26
Figura 1-5. Amostras prontas para serem adicionadas à cultura (A); Kit de coloração utilizada no ensaio (B); bercinho para lâminas contendo os três corantes na sequência de aplicação (C); lâminas secando após serem coradas (D).	28
Figura 1-6. Citotoxicidade da cafeína e <i>bubbles</i> sobre células Balb 3T3 clone 31 após 48 horas de incubação. A. Cafeína livre; B. <i>Bubble</i> livre C. <i>Bubble</i> associada ao ultrassom D. Cafeína associada às <i>Bubbles</i> . E. Cafeína associada às <i>Bubbles</i> expostas ao ultrassom Os dados representam a média ± desvio padrão de dois ensaios independentes. As concentrações indicadas nos gráficos (D) e (E) correspondem as mesmas concentrações aplicadas na avaliação isolada, partindo da concentração inicial para cafeína 12mg/mL (log 2,09 µM) e <i>bubbles</i> 160mg/mL (log 5,2 mg/mL) seguidas de diluições 1:2.	31
Figura 1-7. Citotoxicidade da cafeína e <i>bubbles</i> sobre células HaCat após 48 horas de incubação. A. Cafeína livre; B. <i>Bubbles</i> livre C. Cafeína associada às <i>Bubbles</i> D. <i>Bubble</i> associada ao ultrassom E. Cafeína associada às <i>Bubbles</i> expostas ao ultrassom. F. Controle (Triton X-100). Os dados representam a média ± desvio padrão de dois ensaios independentes. As concentrações indicadas nos gráficos (C) e (E) correspondem às mesmas concentrações aplicadas na avaliação isolada, partindo da concentração inicial para cafeína 24mg/mL (log 2,09 µM) e <i>bubbles</i> 160mg/mL (log 5,2 mg/mL) seguidas de diluições 1:2.	33
Figura 1-8. Porcentagem de viabilidade celular de Balb/3T3 clone 31 frente às diferentes concentrações após a exposição a luz UVA e ao abrigo A. Cafeína livre; B. <i>Bubble</i> livre C. <i>Bubble</i> associada ao ultrassom D. Cafeína associada às <i>Bubbles</i> expostas ao ultrassom. E. Controle (Norfloxacin). Os dados representam a média ± desvio padrão de dois ensaios independentes. As concentrações indicadas nos gráficos (D) e (E) correspondem a mistura da cafeína e <i>bubbles</i> partindo da concentração inicial para cafeína 24mg/mL (log 2,09 µM) e <i>bubbles</i> 160mg/mL (log 5,2 mg/mL) seguidas de diluições 1:47.	37
Figura 1-9. Imagem visualizada em microscópio eletrônico (Primo Star, Zeiss®) de células CHO-K1 submetidas ao teste MNvit, com aumento da objetiva 40x. Célula mononucleada amostra Mitomicina (A), células binucleadas amostra NaCl com S9 (B), célula binucleada com um micronúcleo amostra <i>bubble</i> (C), célula binucleada com dois micronúcleos amostra cafeína com S9 (D), célula multinucleada amostra <i>bubbles</i> com S9 (E).	40
Figura 1-10. Frequência de micronúcleos (%) em células binucleadas após exposição das amostras e controles sem ativação metabólica. Controle de células (CC); Controle negativo cloreto de sódio (NaCl); Controle clastogênico mitomicina (Mitom); Controle aneugênico colchicina (Colch); Controle clastogênico benzopireno (Benz); cafeína 0,96 mM (C1); cafeína 1,93mM (C2); cafeína 3,86mM (C3); <i>bubbles</i> 0,005g/mL (B1); <i>bubbles</i> 0,01g/mL (B2); <i>bubbles</i> 0,02g/mL (B3).	42

Figura 2-1: Procedimento de limpeza e preparação da pele humana para utilização nos experimentos de avaliação da permeação <i>in vitro</i> . (A) pele abdominal acondicionada em saco logo após a remoção; (B) pele abdominal com grande quantidade de tecido adiposo; (C) pele “limpa” sem tecido adiposo; (D) pele fragmentada em tamanhos adequados para serem acopladas a célula de Franz.	55
Figura 2-2: sistema aberto empregado nos ensaios <i>in vitro</i> para avaliação da permeação da cafeína estimulada pelo conjunto <i>bubbles</i> e ultrassom. Imagem A apresenta as cinco fileiras de células de Franz vista de cima. Cada fileira representa uma amostra analisada em triplicata. A imagem B apresenta o mesmo sistema visto na lateral frontal	57
Figura 2-3. A. aplicação do ultrassom sobre a pele. O compartimento doador precisou ser removido para que a aplicação fosse realizada. B. aliquota sendo retirada do compartimento receptor e substituída por um volume equivalente de solução de PBS.....	58
Figura 2-4. Espectro de absorção padrão da cafeína obtida em análise por CLAE (Agilent®).....	59
Figura 2-5. Amostras de suspensão contendo <i>bubbles</i> enviadas pelo grupo do professor Austrália para os ensaios em embalagens (A) flaconetes e (B) frasco ampola.....	61
Figura 2-6. Imagem óptica de campo claro obtida em microscópio confocal (Leica®) em aumento de 63x (A) e imagem obtida em microscópio óptico (Zeiss®) em aumento de imersão (100x), revelando subpopulação de nanopartículas (B).	64
Figura 2-7. Distribuição de tamanho de bolhas utilizadas nos experimentos apresentada em gráfico obtido pela NTA.....	65
Figura 2-9. Placa de petri com agar BHI inoculada com amostra “pura” de <i>bubbles</i> . Imagem foi obtida após 48h da inoculação e confirma que não houve crescimento microbiano.....	67
Figura 2-9. Imagem ecogênica comparando antes (A) e após (B) a aplicação das <i>bubbles em</i> solução salina. Imagem obtida em equipamento de ultrassom clínico Philips® HD-7.....	68
Figura 2-10. Formação de espuma após amostra aplicada na placa de petri ser exposta ao ultrassom.	69
Figura 2-11. Quantificação de cafeína nas amostras coletadas nos experimentos que avaliaram a permeação da cafeína estimuladas pelas <i>bubbles</i> estimuladas pelo ultrassom comparadas com controles. A numeração de 1-5 corresponde às formulações aplicadas na pele, sendo 1. Controle negativo (gel puro); 2. Gel+cafeína; 3. Gel+cafeína +US; 4. Gel+cafeína+ <i>bubbles</i> ; 5. Gel+cafeína+ <i>bubbles</i> +US. T3h: amostra de líquido receptor coletada no tempo 3 horas; T24h: amostra de líquido receptor coletada no tempo 24 horas; E: amostra obtida da epiderme; D: amostra obtida da derme e S: amostra correspondente às coletas realizadas na superfície da epiderme, ou seja, swab e tape somadas.	72

Lista de Tabelas

Tabela 1-1. Concentrações de partida (C8) para as amostras aplicadas em cultura de células Balb 3T3 e HaCat. Diluição aplicada 1:2.....	24
Tabela 1-2. Resultados de valores de IC50 da cafeína obtidas no Phototox [®] em cultura celular de Balb 3T3 clone 31 após exposição de amostras com cafeína e <i>bubbles</i>	32
Tabela 1-3. Resultados de valores de IC50 da cafeína obtidas no Phototox [®] em cultura celular de HaCat após exposição de amostras com cafeína e <i>bubbles</i>	34
Tabela 1-4. valores médios de PIF e MPE obtidos nos ensaios de fototoxicidade das amostras expostas a radiação UVA. Valores obtidos no software Phototox [®]	38
Tabela 1-5. Média dos valores de CBPI e RI obtidas no ensaio de genotoxicidade aplicado nas amostras de cafeína e <i>bubbles</i> com e sem S9, NaCl, benzopireno, colchicina, mitomicina C em relação ao controle de células que demonstram a confiabilidade do método.	41
Tabela 2-1. Características das <i>bubbles</i> segundo informações existentes na patente (PAREKH; THAKUR, 2018) obtidas após 56 dias de produção. Estes dados serviram como parâmetro para as análises realizadas neste trabalho.	51
Tabela 2-2. Composição das formulações aplicadas nos ensaios de permeação com as respectivas concentrações, valor final do pH e se houve a aplicação do ultrassom.	53
Tabela 2-3. Resultados da avaliação de perda de água transepidérmica (TEWL) realizada com a sonda Tewameter [®] TM após o descongelamento da pele. Valores indicam que a barreira cutânea das peles utilizadas no experimento não apresentavam danos. Ou mudar esta frase e colocar dados.....	60
Tabela 2-4. Informações comparativas das <i>bubbles</i> usadas nos experimentos deste estudo, obtido com a técnica NTA - <i>Nanoparticle Traking Analysis</i> comparado com valores médios registrados na patente, obtido por técnica similar, DLS - <i>Dynamic light scattering</i> (PAREKH; THAKUR, 2018). Ao lado das amostras consta a informação do período após a fabricação em que a análise foi realizada.	66
Tabela 2-5. Comparação de tamanhos e concentração entre amostras contendo <i>bubbles</i> isolada e outra com associação à cafeína.....	70

Lista de Equações

Equação 1	29
Equação 2	29
Equação 3	29

Lista de abreviaturas e siglas

- 3T3: linhagem celular de fibroblasto embrionário murino
- ANOVA: análise de variância
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC[®]: American Type Culture Collection
- Benz: benzopireno
- CAS: Chemical Abstracts Service
- CB: células binucleadas
- CBPI: Cytokinesis-Block Proliferation Index
- CC: controle de células
- CHO-K1: Chinese Hamster Ovary
- CM: células mononucleadas
- CMu: células multinucleadas
- Colch: colchicina
- COLIPA: *European Cosmetics Association*
- DP: desvio padrão
- DMEM: *Dubelcco's Modified Eagle Medium*
- ECVAM: *European Centre for the Validation of Alternative Methods*
- EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- EP: erro padrão
- IC₁₀: concentração que inibe 10% do crescimento das células desafiadas
- IC₅₀: concentração que inibe 50% do crescimento das células desafiadas
- IC₈₀: concentração que inibe 80% do crescimento das células desafiadas
- Miton: mitomicina
- MN: micronúcleo
- MNvit: ensaio de micronúcleo
- MPE: *Mean Photo Effect*
- NR: *Neutral Red*
- OECD: Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico
- PBS: *Phosphate Buffered Saline*
- PEG: polietilenoglicol

PIF: *Photo Irradiation Fator*

RI: *Replicative Index*

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura – série 1640)

S9: ativação metabólica S9

SFB: soro fetal bovino

US: ultrassom

Sumário

Prefácio	8
Capítulo 1 Avaliação da citotoxicidade, fototoxicidade e genotoxicidade <i>in vitro</i> de cafeína e <i>bubbles</i>	16
Resumo.....	16
1. Introdução	17
2. Objetivos	19
2.1 Geral.....	19
2.2 Específicos	19
3. Material e métodos.....	20
3.1 <i>Bubbles e cafeína</i>	20
3.2 <i>Ensaio de segurança</i>	20
3.2.1 <i>Qualidade das culturas celulares</i>	22
3.2.2 <i>Ensaio de Citotoxicidade</i>	23
3.2.3 <i>Ensaio de Fototoxicidade</i>	24
3.2.4 <i>Ensaio de genotoxicidade</i>	26
4. Resultados e discussão	29
4.1 <i>Qualidade das culturas celulares</i>	29
4.2 <i>Avaliação da citotoxicidade</i>	30
4.3 <i>Avaliação da fototoxicidade</i>	36
4.4 <i>Avaliação da genotoxicidade</i>	39
5. Conclusão.....	44
Capítulo 2 Caracterização físico-química e avaliação da eficácia de permeação da cafeína na presença das <i>bubbles</i> estimuladas pelo ultrassom	45
Resumo.....	45
1. Introdução	46
2. Objetivos	48
2.1 Geral.....	48
2.2 Específicos	48
3. Material e Métodos	48
3.1 <i>Quantificação da cafeína por CLAE</i>	48
3.2 <i>Avaliação da integridade da pele</i>	49

3.3 <i>Bubbles</i>	50
3.4 Formulações aplicadas na avaliação da eficácia das <i>bubbles</i> e parâmetros do ultrassom.....	53
4. Resultados e Discussão	59
4.1 Quantificação da cafeína por CLAE	59
4.2 Avaliação da integridade da pele.....	59
4.3 <i>Bubbles</i>	60
4.4 Formulações	69
4.5 Avaliação da permeação <i>in vitro</i>	71
6. Conclusão.....	75
Conclusão Geral	76
Referências	77
Anexos.....	86

Capítulo 1 Avaliação da citotoxicidade, fototoxicidade e genotoxicidade *in vitro* de cafeína e *bubbles*

Resumo

O desenvolvimento tecnológico de sistemas de liberação com o objetivo de aumentar e controlar a entrega de substâncias ativas apresenta constante evolução. As *bubbles* são sistemas de liberação que contêm gás e possuem características interessantes de entrega. Um grande diferencial das *bubbles* com relação às demais nanopartículas já existentes é que o gás contido nelas pode proporcionar uma função de direcionamento e liberação controlados pelo ultrassom. Existem estudos demonstrando sua eficiência na entrega de fármacos e gases terapêuticos, mas são escassos os estudos discorrendo sobre a aplicação por via tópica ou com finalidade cosmética. A escolha criteriosa de todos os componentes de uma formulação incluindo suas concentrações adequadas é muito importante no desenvolvimento de uma preparação cosmética eficiente e segura e, para tal, os ensaios específicos são necessários e exigidos pela legislação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a segurança da aplicação de cafeína e *bubbles*, isoladas e combinadas, estimuladas e não estimuladas pelo ultrassom, utilizando métodos *in vitro*. Com isso, foram realizados ensaios de viabilidade celular utilizando linhagens Balb/c 3T3 clone A31 e HaCat, fototoxicidade utilizando linhagens Balb/c 3T3 clone A31 e genotoxicidade utilizando linhagens CHO-K1, baseados nos protocolos correspondentes da OECD. A IC50 obtidas em culturas celulares de Balb 3T3 clone 31 e HaCat expostas a cafeína foi de 2,6 e 0,4 mg/mL respectivamente, e quando expostas às *bubbles* não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas. Na avaliação da fototoxicidade, a cafeína e as *bubbles* não apresentaram PIF (*Photo Irradiation Fator*) maior que 1 (um), portanto, foram consideradas não fototóxicas. Em relação ao ensaio do micronúcleo *in vitro* na linhagem CHO-K1, a cafeína e as *bubbles* não foram potencialmente genotóxicos nas concentrações avaliadas. Os resultados foram considerados promissores e demonstram a segurança da aplicação da cafeína e das *bubbles* nas linhagens avaliadas, sendo um grande motivador para a continuidade dos estudos *in vivo*.

Palavras-chave: cafeína, *bubbles*, ultrassom, métodos *in vitro*, segurança.

1. Introdução

As *bubbles* são micelas ou lipossomas unilamelares com até 10 μ m de diâmetro, tipicamente preenchidos com um gás inerte de alto peso molecular e menor solubilidade em água do que o ar, tal como um perfluoropropano (KLIBANOV, 2002; TURÁNEK et al., 2015b). O envólucro é composto por lipídios, polímeros e/ou proteínas e determina a rigidez e, portanto, a estabilidade das bolhas.

As *bubbles* são usadas no campo da ultrassonografia como agentes de contraste, pois o núcleo de gás é altamente ecogênico (ZHENG et al., 2007). Ecogenicidade é um termo usado em ultrassonografia que descreve o quanto um tecido, órgão ou líquido deixa passar ou reflete as ondas sonoras do ultrassom, comparado com tecidos e órgãos próximos.

São caracterizadas por micro/nanopartículas preenchidas com gás inerte altamente ecogênico, ou seja, que é responsivo ao estímulo de ondas ultrassônicas e, portanto, potencializam a visualização das imagens em exames laboratoriais. Investiga-se o uso do ultrassom como método promotor de entrega de substâncias terapêuticas a partir do conceito de que as partículas contendo gás poderiam ser manipuladas pelas ondas sonoras. O ultrassom pode romper as bolhas por um fenômeno conhecido como cavitação inercial, gerando microjatos que propulsionam substâncias de interesse, como medicamentos ou outros gases (oxigênio, óxido nítrico) em células/tecidos circundantes. Com este conceito, as *bubbles* tiveram a aplicação expandida para o campo de distribuição de fármacos, diagnósticos e teranósticos, termo que relaciona terapia e diagnóstico (PAREKH; THAKUR, 2018).

As *bubbles* utilizadas nesse projeto foram produzidas por meio da introdução de gás perfluoropropano (PFC) numa suspensão de micelas ou lipossomas unilamelares compostas por fosfolipídios, que proporciona estabilidade mecânica para a bolha, fazendo-a suportar uma pressão negativa provocada pelo meio e permitindo que o gás do interior esteja em equilíbrio de difusão com o meio externo. Em alguns casos, a estabilidade pode ser aumentada pela adição de uma camada de polímero hidrofílico, como polietilenoglicol (PEG). Este reforço permite que a *bubble* apresente uma elevada capacidade para a carga de gases (FIX; BORDEN; DAYTON, 2015).

A cafeína é um alcaloide, derivado das metilxantinas, consumido como bebida, administrado como medicamento ou aplicado para fins estéticos (LUO; LANE, 2015). O uso dessa substância em formulações cosméticas corporais é usual e corriqueiro para os cuidados da celulite (CHRISTENSEN, 2014). Em contrapartida, a cafeína não possui propriedades de

um penetrante ideal capaz de romper a barreira cutânea, por esse motivo alguns estudos a utilizam como objeto de pesquisa de penetração cutânea (VELASCO et al., 2008).

A cafeína é recomendada pela OECD (Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico) por ter sido extensivamente estudada *in vitro* e *in vivo* (OECD 428, 2004; LUO; LANE, 2015), muitas vezes escolhida como um modelo de fármaco para estudar o desempenho como sistema de entrega de materiais biocompatíveis por causa de suas características físico-químicas (PILLONI et al., 2013).

A toxicidade de determinadas substâncias corresponde à capacidade destas causarem algum efeito nocivo aos seres vivos. As avaliações de toxicidade abrangem ensaios efetuados nas matérias-primas, formulações em desenvolvimento e produtos acabados, aos quais são aplicados testes *in vivo* e/ou *in vitro* (MATHIJSSSEN; SPARREBOOM; VERWEIJ, 2014)

A história da avaliação da segurança de formulações cosméticas apresentou uma evolução de conceitos com relação ao uso de animais e crescentemente, o uso de animais está sendo substituído por métodos alternativos. Algumas vantagens são evidentes, como exemplo os ensaios *in vitro* permitiram maior precisão de resultados, pois utilizam recursos de automação, permitindo objetividade da análise final, como na quantificação de citocinas por ELISA ou estabelecimento da IC50 - concentração inibitória em 50% das células - em testes de citotoxicidade. Além disso, uma vez validadas, as metodologias alternativas apresentam um custo menor do que aquelas relacionadas à manutenção de animais e infraestrutura de biotérios e, em sua grande maioria, menor duração em ensaios *in vivo* (ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008).

A cultura de células se enquadra entre os métodos alternativos mais difundidos devido à versatilidade da metodologia (KNOP; MARIA, 2016). Células dispersas retiradas de um tecido a partir de cultura primária, linhagem celular ou estirpe celular, seja por desagregação química, mecânica ou enzimática (FRESHNEY, 2010) são cultivadas em condições específicas que permitam se dividir e se multiplicam continuamente.

Os ensaios *in vitro* utilizando culturas celulares são frequentemente utilizados para avaliação da segurança de substâncias ou formulações. Com estes ensaios é possível verificar a interferência nos processos metabólicos celulares, crescimento/multiplicação celular, ou até mesmo a morte celular, reduzindo, assim o número de células viáveis se comparado com culturas controles não-tratadas (ABREU, 2008; FRESHNEY, 2010).

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* consiste em avaliar a interferência de moléculas no metabolismo celular e na forma de como esses processos podem alterar o crescimento e

viabilidade celular (OECD 129, 2010). O teste de fototoxicidade *in vitro* identifica e determina o potencial tóxico da substância testada pela avaliação da redução na viabilidade das células após a exposição e ausência da luz (OECD 432, 2004). Estes ensaios permitem determinar o valor de concentração inibitória. A concentração máxima não tóxica de uma amostra pode ser obtida por meio do cálculo da IC10, que corresponde à concentração que produz 10% de inibição das células viáveis, IC20 e de IC80, para estimar as concentrações letais da amostra no sangue humano, e o valor de IC50, concentração da substância que inibe 50% do crescimento celular, que permite estimar a DL50 (ICCVAM, 2006).

Um dos métodos mais comumente utilizados para a avaliação da citotoxicidade é o ensaio de Vermelho Neutro. O ensaio NR é simples, preciso e com resultados reproduzíveis. As células viáveis internalizam o corante por transporte ativo, e a quantidade possui direta relação com o número de células vivas, indicando o grau de citotoxicidade causada pela substância ou pela formulação utilizada no ensaio (RODAS et al., 2006)

Outro ensaio de segurança muito importante consiste na avaliação da toxicidade genética, destacando-se o ensaio MNvit (*micronucleous in vitro*), que detecta micronúcleos (MN) no citoplasma das células em interfase produzidos durante ou após a exposição de produtos químicos em células submetidas à divisão celular. Os MN são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal e representa danos irreversíveis causados por alterações no material genético das células expostas à agentes potencialmente genotóxicos (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; OCAMPO et al., 2016).

2. Objetivos

2.1 Geral

O desenho experimental deste trabalho buscou, fundamentalmente, avaliar a segurança da substância cafeína e das *bubbles* em ensaios *in vitro*, com e sem o estímulo do ultrassom.

2.2 Específicos

- Avaliação da citotoxicidade de amostras de *bubbles* e cafeína, isoladamente e associadas, em fibroblastos de camundongos (linhagem celular Balb/c 3T3 clone A31 - ATCC[®] CCL-163TM) e queratinócitos humanos imortalizados (linhagem celular HaCat – CLS *Cell Line Service* ThermoFisher[®]) e realizar comparação entre as duas linhagens.

- Encontrar valores de IC 50 e IC 10 para as respectivas substâncias.
- Avaliação da fototoxicidade de amostras de *bubble* e cafeína, isoladamente e associadas, em fibroblastos de camundongos (linhagem celular de Balb/c 3T3 clone A31).
- Avaliação genotoxicidade empregando células de ovário de hamster chinês (linhagem de células CHO-K1 - ATCC® CCL-61™)

3. Material e métodos

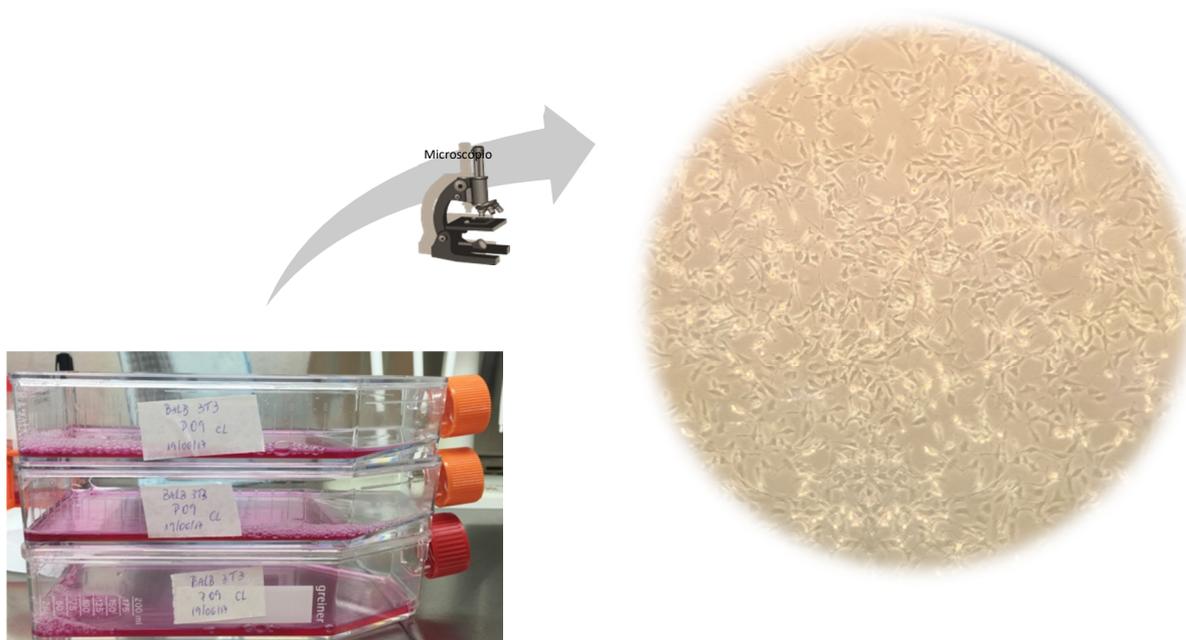
3.1 Bubbles e cafeína

A substância ativa cafeína anidra utilizada em todos os experimentos realizados corresponde ao CAS: 58-08-2, grau farmacêutico (anexo 1) e foi doada pela empresa distribuidora de insumos Embrafarma Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA. As *bubbles* utilizadas nesse projeto foram produzidas e fornecidas pela equipe do Dr. Harendra S. Parekh, da escola de Farmácia da Universidade de Queensland, Austrália (anexo 2).

3.2 Ensaios de segurança

As linhagens de células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade foram BALB/3T3 clone A3 (ATCC® CCL-163™) (figura 1-1) e HaCat. Para a fototoxicidade foram BALB/3T3 clone A3 e para o ensaio de genotoxicidade foi utilizada a linhagem CHO-K1 (ATCC® CCL-61™). Ressalta-se que essas células fazem parte do banco de células da nossa equipe de pesquisa, e foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC®).

Figura 1-1. Imagem de garrafas com cultura de Balb/3T3 clone A31 e imagem capturada de visualização em microscópio invertido caracterizando confluência.

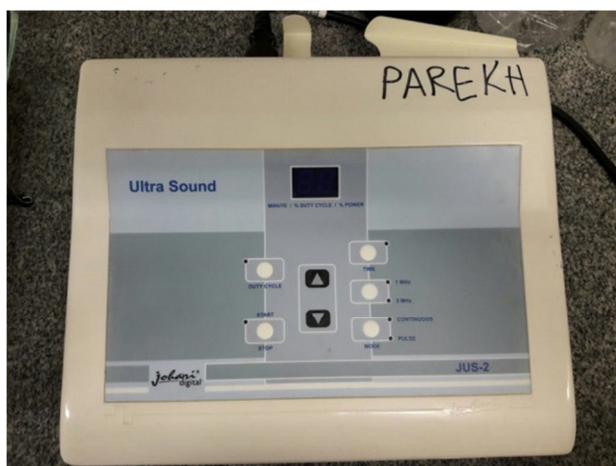


Fonte: acervo da autora

O meio de cultura para cultivo das linhagens BALB/3T3 clone A31 e HaCat correspondeu ao DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*) (Vitrocell[®]) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell[®]), 1% (v/v) de L-Glutamina (Vitrocell[®]) e 1% (v/v) de solução de antibióticos (10.000 UI.mL⁻¹ de penicilina, 10 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 1 mg.mL⁻¹ de anfotericina B) (Vitrocell[®]). CHO-K1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Vitrocell[®]) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell[®]), 1% (v/v) de L-Glutamina (Vitrocell[®]) e 1% (v/v) de solução de antibióticos (10.000 UI.mL⁻¹ de penicilina, 10 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 1 mg.mL⁻¹ de anfotericina B) (Vitrocell[®]). As células foram incubadas em estufa a 37°C a 5% de CO₂ com umidade controlada (Thermo Scientific[™], modelo 3425). O processo de descolamento celular ocorreu pela ação da solução de tripsina/EDTA (1:250) (Vitrocell[®]). Cada tripsinização foi registrada como uma passagem e os ensaios ocorreram a partir da segunda passagem.

A aplicação do ultrassom foi realizada nos ensaios de citotoxicidade e fototoxicidade. O equipamento (figura 1-2) utilizado nos experimentos (marca Johari[®] digital, modelo Ultrasound JUS-2) foi cedido pelo Dr. Harendra Parekh.

Figura 1-2. Equipamento de ultrassom utilizado nos experimentos deste estudo que emite ondas ultrassônicas para aplicação em tratamentos estéticos e, neste estudo, para o estímulo das *bubbles*;



Fonte: acervo da autora

3.2.1 *Qualidade das culturas celulares*

A técnica aplicada para esta avaliação foi a PCR adaptada para as condições do laboratório de imunologia celular e bioquímica de fungos e protozoários na Universidade Federal de São Paulo. As linhagens celulares de Balb/3T3 clone 31, Hacat e CHO K1 foram cultivadas em DMEM ou RPMI 1640 suplementados com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell[®]), 1% (v/v) de L-Glutamina (Vitrocell[®]) e 1% (v/v) de solução de antibióticos (10.000 UI.mL⁻¹ de penicilina, 10 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 1 mg.mL⁻¹ de anfotericina B) (Vitrocell[®]) e mantidas a 37°C em ambiente úmido contendo 5% de CO₂. Alíquotas de 1mL sobrenadante do cultivo celular mínimo de 72 horas das linhagens avaliadas para identificação de micoplasma foram centrifugadas por 5 minutos a 12500rpm. O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* formado foi ressuspensão em 50µL de água DPEC. Separadamente, foi preparada a amostra para análise contendo 2,5 µL da suspensão de células, 1 µL de primer forward (MYC1), 1 µL de primer (MYC2), 5 µL de master mix e 0,5 µL de água DPEC. Esta amostra foi aplicada no termociclador (Eppendorf Mastercycler[®] nexus) e as condições de ciclagem foram: 5 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 52°C a 60,0°C por 1 min e 72°C por 3 min e finalizados por um ciclo de 7 min de extensão. O produto do termociclador foi aplicado na quantidade de 10 µL em gel de agarose a 2%, e foi realizado a corrida em 100W por 30 (trinta) minutos. O gel foi removido com cuidado do molde, posicionado para análise por fluorescência (UVITEC Cambridge).

3.2.2 Ensaio de Citotoxicidade

Este protocolo foi baseado nas diretrizes da norma OECD 129, 2010, aplicada nas práticas comerciais como norma uniformizadora da qualidade de produtos farmacêuticos. As células Balb/3T3 clone A31 (passagens celulares entre P12 e P16) e HaCat foram, separadamente, semeadas em densidade de 20000 células em volume de 100µL em microplacas de 96 poços (0,28cm² de área/poço, Corning®) e incubadas por 24 horas para adesão das células. Os meios foram removidos e as células foram tratadas com uma diluição seriada das soluções das amostras recém-preparadas, conforme esquema representativo (figura 1-3).

Figura 1-3. Esquema representativo do preparo para ensaio de citotoxicidade e fototoxicidade nas placas de 96 poços. Sendo: B = branco; CC = Controle de células; C1 – C8 = 8 concentrações da substância em teste (células + amostra).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
C	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
D	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
E	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
F	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
G	B	CC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CC	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Fonte: elaborado pela autora

As concentrações de partida (C8) aplicadas no ensaio (tabela 1-1) receberam o fator de diluição de 1:2. A definição dessa diluição é justificada pelo desconhecimento das características dos ativos. As amostras determinadas para receberem o estímulo do ultrassom o receberam logo após a adição das amostras diluídas nos poços, respeitando os parâmetros estabelecidos, durante 5 minutos, US pulsado 50%, frequência de 3MHz e intensidade de 2,5W/cm² (MANUAL JOHARI, 2014)

Tabela 1-1. Concentrações de partida (C8) para as amostras aplicadas em cultura de células Balb 3T3 e HaCat. Diluição aplicada 1:2.

Amostra	Concentração C8
Cafeína	log 2,09 mM
Bubble	log 5,2 mg/mL
Bubbles e US	<i>Bubbles</i> log 5,2 mg/mL US pulsado, 3MHz, 2,5W/cm ²
Bubbles e cafeína	Cafeína log 2,09 mM <i>Bubbles</i> log 5,2 mg/mL
Bubbles, cafeína e US	Cafeína log 2,09 mM <i>Bubbles</i> log 5,2 mg/mL US pulsado, 3MHz, 2,5W/cm ²

Após 48 horas da adição das amostras (OECD 129, 2010), o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com a solução salina, adicionou-se solução do corante vital Neutral Red (NR corante vermelho neutro) solubilizado em meio de cultura DMEM. Após 3 horas de incubação, a solução de NR foi removida, os poços foram lavados com PBS (tampão fosfato-salino) para então adicionar-se 150 µL da solução de dessorção de NR (49 % (v/v) de água destilada, 50 % (v/v) de álcool etílico P.A e 1 % (v/v) de ácido acético glacial, Synth[®]) para lise das células que ficaram viáveis e conseqüentemente a liberação do corante de dentro delas. Em seguida, as microplacas foram agitadas por 15 minutos e a medida da absorbância no λ de 540nm foi realizada utilizando o espectrofotômetro de microplacas (modelo Synergy HT, Biotek[®]) (ICCVAM, 2006; OECD 129, 2010)

Os valores obtidos foram aplicados em cálculo para determinação da viabilidade celular. Subtraiu-se a média obtida dos brancos. A viabilidade celular foi calculada pelo software Phototox[®] (OECD) da seguinte forma: viabilidade celular (%) = (CT / CC) x 100, onde CT é a absorbância das células tratadas e CC a absorbância do controle de células. Os valores obtidos foram submetidos ao programa estatístico GraphPad Prism[®] 7, que gerou as curvas dose-resposta com a barra de erro padrão média.

3.2.3 Ensaio de Fototoxicidade

As células Balb/3T3 clone A31 (passagens celulares entre P9 e P16) foram semeadas em densidades de 20000 células em volume de 100µL em microplacas de 96 poços (0,28cm² de área/poço, Corning[®]) e incubadas por 24 horas para adesão das células. Para cada amostra foram preparadas duas placas, uma para a exposição a luz (UVA+) e a outra para o escuro

(UVA-). As amostras foram diluídas em PBS+, composto por *Phosphate buffered saline* com 0,1% (p/v) de cálcio e 0,13% (p/v) de magnésio de forma seriada imediatamente antes da utilização e ao abrigo da luz, para evitar a fotoativação ou degradação da amostra antes da ativação (COLIPA; ECVAM, 2008). As concentrações utilizadas foram escolhidas a partir da concentração que não apresentou citotoxicidade no ensaio anterior e representou a concentração C5 e receberam o fator de diluição de 1:47. No caso da cafeína, a concentração de partida foi de 0,003g/mL, e como as *bubbles* não apresentaram citotoxicidade, estabeleceu-se aleatoriamente a concentração de 0,06g/mL. Para homogeneização, a cafeína foi agitada até total solubilização com vórtex e a solução obtida foi filtrada com filtro de poro 0,45. Para as *bubbles* houve apenas dispersão das partículas com agitação manual e não foi realizada filtração para que as mesmas não ficassem retidas no filtro.

Após 24 horas de incubação e amostras prontas, o meio de cultura dos poços foi removido e as células foram tratadas com as diluições seriadas em ordem crescente de concentração, como esquematizado na figura 1-3, e foram incubadas por 1 hora. As amostras com aplicação do ultrassom receberam o estímulo logo após a aplicação das amostras e antes da incubação, respeitando os parâmetros estabelecidos, durante 5 minutos, US pulsado 50%, frequência de 3MHz e intensidade de 2,5W/cm². Decorrido este período, as microplacas foram posicionadas na câmara de fototoxicidade (figura 1-4), construída a partir das premissas do protocolo ©ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol (COLIPA; ECVAM, 2008), sendo irradiada (irradiância UVA: 1,7 mW / cm²) por 107 min em temperatura ambiente, período correspondente a dose de UVA = 5 J / cm² (SPIELMANN et al., 1998). Ressalta-se que a intensidade da luz UVA da câmara foi qualificada com Radiômetro (UV-Meter, Hönle UV Technology) equipado com sensor de UVA, cujo espectro é de 320 a 400 nm.

Após a exposição à radiação, os poços foram novamente lavados com PBS+ seguida da adição de meio de cultura e incubadas por 22 a 24 horas. Decorrido este prazo, prosseguiu-se com o ensaio de viabilidade celular utilizando o NR (*Neutral Red*) e a leitura da absorbância realizada no comprimento de onda de 540nm. Para a interpretação dos resultados e previsão do potencial fototóxico, as leituras das absorbâncias foram submetidas ao programa Phototox[®] versão 2.0 (Paris, França) que determinou o valor de *Photo Irradiation Fator* (PIF) e o “Mean photo effect” (MPE), preconizados pela OECD (OECD 432, 2004) e INVITTOX protocol (COLIPA; ECVAM, 2008)

O PIF está relacionado com a IC₅₀, ou seja, à concentração de cada substância que inibe 50% da viabilidade celular da microplaca não irradiada e da microplaca irradiada, sendo

possível classificar as amostras: não fototóxicas para $PIF < 2$; provavelmente fototóxica para $2 < PIF < 5$; ou fototóxica para $PIF > 5$ (OECD 2004; SPIELMANN *et al.*, 1998).

Figura 1-4. Fotografia da câmara de fototoxicidade utilizada no ensaio com a porta aberta e as microplacas posicionadas.



Fonte: arquivo da autora

Na análise estatística, realizada no programa estatístico GraphPad Prism[®] 7, foi aplicada a análise de variância, ANOVA *One-way*, e teste Tukey para determinação de diferenças estatísticas entre os grupos de amostras. O nível de significância (α) foi de 5%, quando o valor- p for menor que 0,05 há uma diferença significativa entre as amostras, contrariamente, quando $p \geq 0,05$ não há diferença significativa (FESTING, 2001).

3.2.4 Ensaio de genotoxicidade

Os dados deste ensaio foram obtidos pela aplicação do teste de micronúcleo *in vitro* (MNvit) pelo método clássico, com leitura de lâminas. Todo o procedimento foi baseado no guia internacional OECD 487 (OECD 487, 2016).

Para a determinação das concentrações da cafeína e das *bubbles* foi considerado o valor de IC_{10} (ou seja, concentração que inibe 10% de células desafiadas) determinado pelo teste de citotoxicidade (RODAS *et al.*, 2006). As concentrações de cafeína variaram entre 0,00075 e 0,000185 g/mL e de *bubbles* variaram entre 0,02 e 0,005 g/mL.

Com relação aos controles, aplicou-se cloreto de sódio (NaCl, Synth[®], CAS n° 7647-14-5) como controle negativo, mitomicina (Sigma-Aldrich[®], CAS n° 50-07-7) e benzopreno (Sigma-Aldrich[®], CAS n° 50-32-8) como agentes clastogênicos, agentes que induzem rupturas cromossômicas, colchicina (Sigma-Aldrich[®], CAS n° 64-86-8) como agente

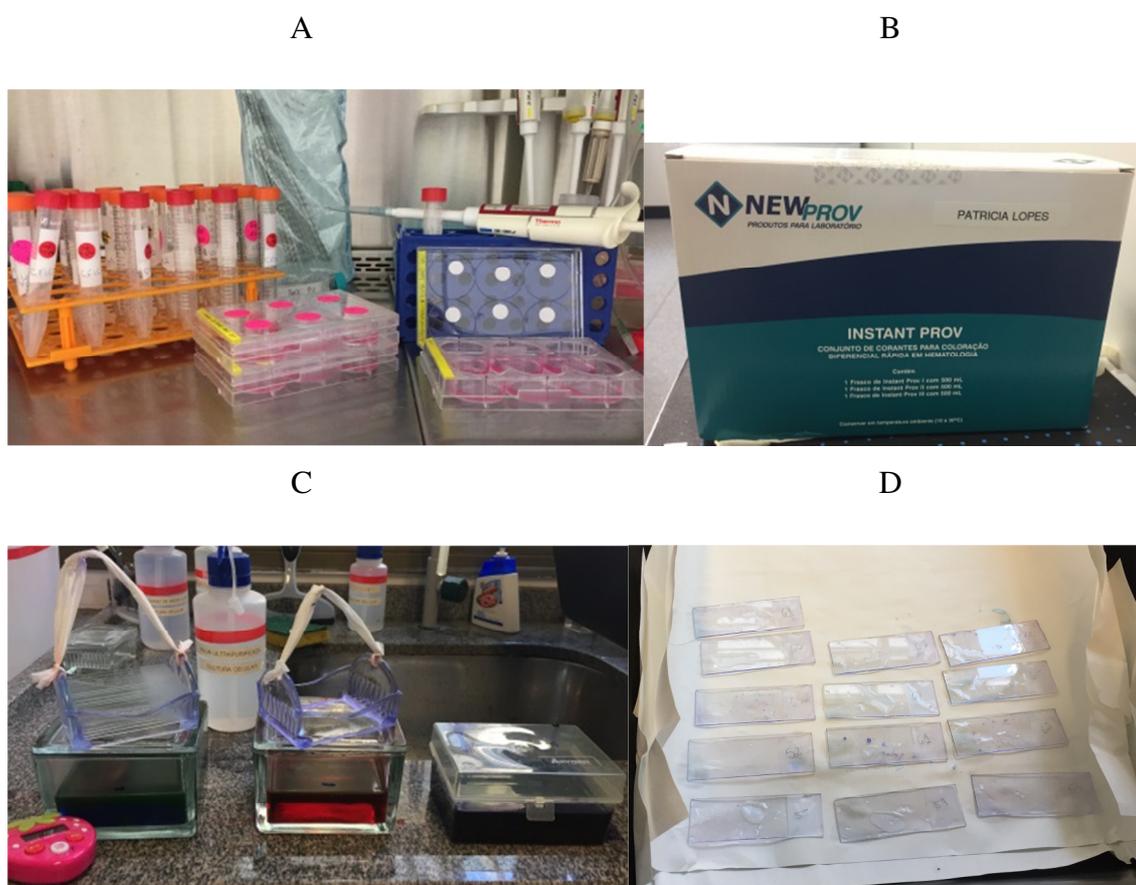
aneugênico, que alteram o número normal de cromossomos. Agentes clastogênicos e aneugênicos são potencialmente carcinogênicos.

Foram semeadas 20000 células de CHO-K1 por poço da placa de 6 poços (9,6 cm², Corning[®]) em 2mL de meio e incubado por 48 horas, a 37 °C, em incubadora úmida com 5% de CO₂. Após este período, o meio de cultura foi retirado das placas e as células foram tratadas com as amostras, com meio RPMI 1640 (controle de células), com os controles positivos e negativos. Esta sequência foi realizada com ativação da solução Mix S9 e sem ativação. A mistura S9 foi preparada previamente dissolvendo-se em 1mL de água destilada, 1,75mL de solução tampão fosfato pH 7,4, 0,1mL de uma solução de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) 76,5mg/mL, 0,025mL de um glicose-6-fosfato 282,1mg/mL solução, 0,05 mL de solução salina (1,65M de KCl e 0,4M de MgCl₂)(ESTEVEZ-PEDRO et al., 2011). Após, as placas foram incubadas por 4 horas. Após a exposição, os meios de cultura foram retirados, os poços lavados com solução PBS pH 7,4, seguido da adição da solução de citocalasina B (4µg/mL em meio RPMI, Sigma-Aldrich[®], CAS n° 14930-96-2). As culturas retornaram à incubadora por 20 horas.

Decorrido esse período, o meio de cultura foi aspirado de todos os poços. Em seguida as células foram lavadas com PBS pH 7,4 e descoladas com solução de tripsina 0,05% (p/v)/EDTA 0,02% (p/v.). O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos cônicos de 15mL previamente identificado e codificados, permitindo posterior avaliação aleatória. Os tubos foram centrifugados (1500 rpm, 5 minutos), o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 5mL de solução de NaCl 0,9% (p/v). Após 5 minutos, a nova suspensão foi centrifugada (1500 rpm, 5 minutos), o sobrenadante descartado e adicionada a solução fixadora 3:1 de metanol (Synth[®], CAS n° 67-56-1) e ácido acético glacial (Synth[®], CAS n° 64-19-7), células ressuspensas e após 5 minutos, centrifugado novamente. Esta etapa foi repetida mais duas vezes. Concluída a etapa de centrifugação, o sobrenadante foi descartado deixando-se apenas 1mL do fixador para ressuspender as células. A suspensão celular foi gotejada em três lâminas, posicionadas sobre banho termostatizado a 65°C por 3 minutos. As lâminas secaram por 24 horas em temperatura ambiente e posteriormente foram coradas (Instant prov, NewProv[®])(figura 1-5). Técnica de coloração para o INSTANT PROV foi realizada em três berços com capacidade para 10 (dez) lâminas. Cada berço recebeu cada corante, na seguinte ordem: Instant Prov I, II e III. As lâminas fixadas e secas foram totalmente submersas em cada cuba e deixadas por 10 segundos, sem executar movimentos. Passado esse tempo, as lâminas foram retiradas do corante e deixadas escorrer durante 5

segundos antes de seguir para o corante seguinte. O processo se repete, diferindo apenas que no último corante o tempo de exposição é maior, 20 (vinte) segundos. As lâminas por fim são retiradas do corante, deixadas escorrer durante 5 segundos e lavadas em água purificada.

Figura 1-5. Amostras prontas para serem adicionadas à cultura (A); Kit de coloração utilizada no ensaio (B); bercinho para lâminas contendo os três corantes na sequência de aplicação (C); lâminas secando após serem coradas (D).



Fonte: acervo da autora

A leitura das lâminas foi realizada no microscópio óptico (Primo Star, Zeiss®) com objetivas de 20 e 40x. De cada tratamento foram contadas no mínimo 2000 células binucleadas, sendo pelo menos 1000 células em cada cultura. Nessa população, foram consideradas a incidência de células mononucleadas (CM), células binucleadas (CB) com 1,2 ou 3 micronúcleos, células multinucleadas (CMu), células apoptóticas e células necróticas. Com os valores de CM, CB e CMu, foram calculados o Índice de Proliferação Pós-Bloqueio da Citocinese (CBPI do inglês, Cytokinesis-Block Proliferation Index), o Índice de

Replicação (RI do inglês, Replication Index), a citotoxicidade das amostras e a frequência de micronúcleos (em porcentagem), segundo as fórmulas descritas pela OECD 487 (2016) e apresentadas nas equações (1), (2) e (3). Os resultados das leituras das lâminas foram analisados separadamente para amostras com e sem S9.

$$CBPI = \frac{(\text{n}^\circ \text{ mononucleadas}) + 2(\text{n}^\circ \text{ binucleadas}) + 3(\text{n}^\circ \text{ multinucleadas})}{(\text{n}^\circ \text{ total de células})} \quad \text{Equação 1}$$

$$RI = \frac{[(\text{n}^\circ \text{ binucleadas}) + 2(\text{n}^\circ \text{ multinucleadas})] \div (\text{n}^\circ \text{ total de células da cultura tratada})}{[(\text{n}^\circ \text{ binucleadas}) + 2(\text{n}^\circ \text{ multinucleadas})] \div (\text{n}^\circ \text{ total de células do controle})} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$\% \text{frequencia micronúcleos} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ total de micronúcleos})}{(\text{total de células binucleadas})} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

A avaliação de outros indicadores de citotoxicidade (por exemplo, integridade celular, apoptose, necrose, contagem de metáfase, ciclo celular) pode fornecer informações úteis, mas não deve ser usada no lugar de CBPI ou RI (OECD 487, 2016). Com relação a avaliação dos resultados, foi aplicado o modelo estatístico *Poisson* (MARGOLIN et al., 1986) e após foi aplicada a análise de variância ANOVA *One-way* e teste de Tukey com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism[®] 7.

4. Resultados e discussão

4.1 Qualidade das culturas celulares

A ausência de contaminação por micoplasma das culturas celulares utilizadas nos ensaios foi constatada aplicando-se a técnica recomendada pela OECD (2004) de PCR. Todas as amostras analisadas pela técnica de PCR com uso do termociclador e corrida em gel de agarose apresentaram ausência de fluorescência com a técnica de PCR com sobrenadante de cultivo celular de Balb 3T3 clone 31 e HaCat após 72 horas, com isso se concluiu a ausência de contaminação por micoplasma nessas populações. Segundo recomendação da OECD, a infecção ou contaminação de uma linhagem celular com um vírus acidental ou micoplasma pode alterar significativamente as características das células, mas essa contaminação pode não ser evidente (OECD 286, 2018), por isso a necessidade da avaliação.

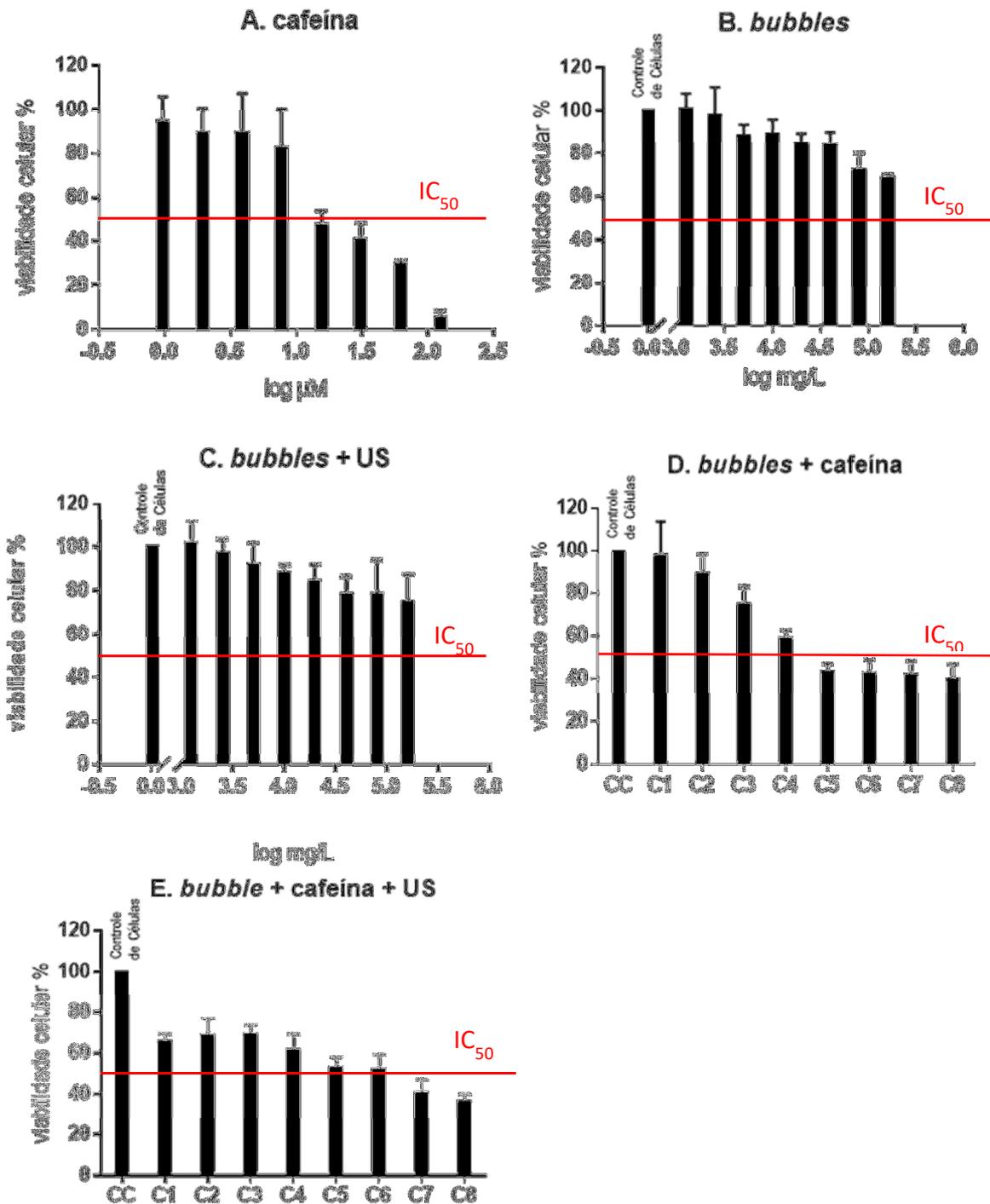
4.2 Avaliação da citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade verificam a taxa de morte celular, apoptose ou a taxa de viabilidade celular (ABREU, 2008; FRESHNEY, 2010). Um dos métodos mais comumente utilizado é o ensaio de NR, do inglês *Neutral Red* (Vermelho Neutro), que utiliza o corante vital NR (vermelho básico 5, Toluileno Vermelho). O ensaio NR é simples, preciso e com resultados reprodutíveis. As células viáveis internalizam o corante por transporte ativo e este se liga aos lisossomos. Em contato com uma solução de dessorção de etanol acidificado, o corante é libertado do interior das células, sendo que a quantidade deste é diretamente proporcional ao número de células vivas presentes na amostra, indicando o grau de citotoxicidade causada pela substância ou pela formulação utilizada no ensaio (RODAS et al., 2006).

A linhagem celular de fibroblastos proveniente de embrião de camundongo Balb 3T3 foi empregada seguindo parâmetros preconizados na OECD 129 (2010). Esta linhagem apresenta facilidade de obtenção, manutenção e manipulação e possui capacidade de se manter estável mesmo após muitas passagens, quando comparada com a linhagem celular proveniente de fibroblastos humanos (TODARO; GREEN, 1963). A designação “3T3” se refere ao fato de que esta linhagem celular cresceu originalmente em uma concentração de 3×10^5 células por cm^2 , primeiro “3”, com um intervalo de transferência (“T”) de 3 dias, segundo “3” (TODARO; GREEN, 1963).

A Figura 1-6 representa em gráficos resultados de viabilidade celular das células Balb 3T3 após a exposição de 48 horas à cafeína e às *bubbles* em diferentes combinações para gerar curva dose-resposta e calcular os valores de IC50. Apenas as amostras com cafeína isolada indicaram ser citotóxicas, a cafeína isolada apresentou citotoxicidade a partir da concentração 3 mg/mL ou 15 μ M ou log -1,81113 μ M. Observou-se que as *bubbles* isoladamente não possuem a capacidade de ser tóxica para as células.

Figura 1-6. Citotoxicidade da cafeína e *bubbles* sobre células Balb 3T3 clone 31 após 48 horas de incubação. **A.** Cafeína livre; **B.** *Bubble* livre **C.** *Bubble* associada ao ultrassom **D.** Cafeína associada às *Bubbles*. **E.** Cafeína associada às *Bubbles* expostas ao ultrassom Os dados representam a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes. As concentrações indicadas nos gráficos (D) e (E) correspondem as mesmas concentrações aplicadas na avaliação isolada, partindo da concentração inicial para cafeína 12mg/mL (log 2,09 μ M) e *bubbles* 160mg/mL (log 5,2 mg/mL) seguidas de diluições 1:2.



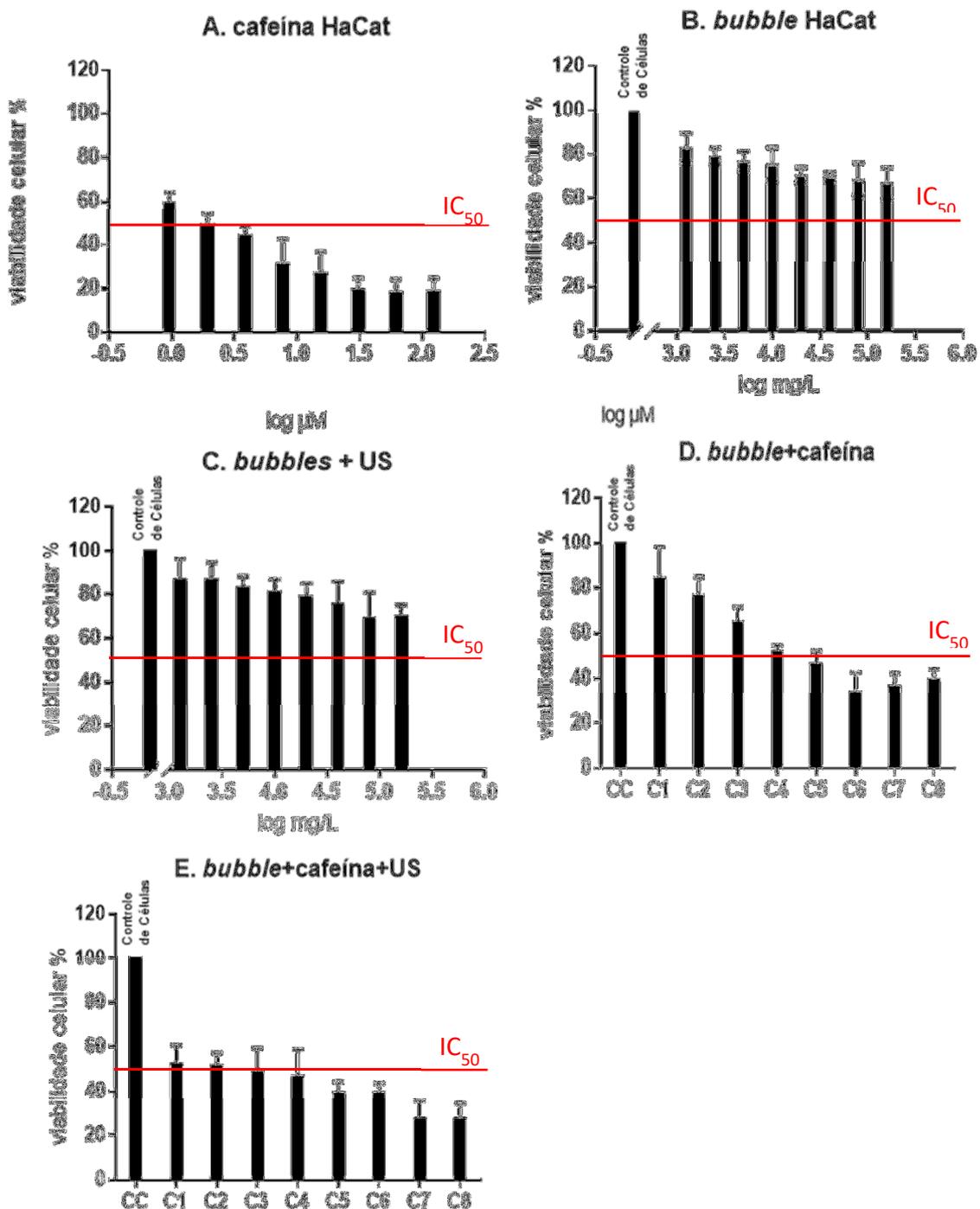
Os valores de IC50 foram calculados com o auxílio do software Phototox[®] (OECD) e estão apresentados na tabela 1-2. Confirmou-se que apenas as amostras que possuíam a cafeína apresentaram concentração inibitória de crescimento. Algo interessante ocorreu com a amostra que associou a *bubble*, cafeína e ultrassom, pois houve uma toxicidade menor neste conjunto quando comparadas as demais avaliações em que a cafeína está presente. Esta suspeita é confirmada com o aumento da concentração da IC50, como pode ser observado na tabela 1-2. Suspeita-se que este fato esteja relacionado com a liberação do gás perfluorocarbono quando as *bubbles* se rompem após a aplicação do ultrassom.

Tabela 1-2. Resultados de valores de IC50 da cafeína obtidas no Phototox[®] em cultura celular de Balb 3T3 clone 31 após exposição de amostras com cafeína e *bubbles*.

Amostra	IC 50
Cafeína	2594,4 mg/L ou log 1,13 μ M
Bubbles	--
Bubbles e US	--
Bubbles e cafeína	2497,4 mg/L ou log 1,11 μ M
Bubbles, cafeína e US	8560,3 mg/L ou log 1,64 μ M

A Figura 1-7 representa os resultados de viabilidade celular das células HaCat após a exposição de 48 horas à cafeína e às *bubbles* em diferentes combinações para gerar curva dose-resposta e calcular os valores de IC50. Igualmente ao observado com as avaliações com as culturas de Balb 3T3, os gráficos mostram que apenas as amostras com cafeína isolada aparentaram ser citotóxicas nas culturas de células HaCat. Como exemplo, a cafeína isolada apresentou citotoxicidade neste caso a partir da concentração 375 mg/L ou 1,93 μ M ou log μ M 0,286. Comparando com a cultura da Balb 3T3, as HaCat parecem ser mais sensíveis à cafeína. Com relação às *bubbles*, o comportamento foi o mesmo, não apresentaram capacidade de ser tóxica para as HaCat.

Figura 1-7. Citotoxicidade da cafeína e *bubbles* sobre células HaCat após 48 horas de incubação. **A.** Cafeína livre; **B.** *Bubbles* livre **C.** Cafeína associada às *Bubbles* **D.** *Bubble* associada ao ultrassom **E.** Cafeína associada às *Bubbles* expostas ao ultrassom. **F.** Controle (Triton X-100). Os dados representam a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes. As concentrações indicadas nos gráficos (C) e (E) correspondem às mesmas concentrações aplicadas na avaliação isolada, partindo da concentração inicial para cafeína 24mg/mL (log 2,09 μ M) e *bubbles* 160mg/mL (log 5,2 mg/mL) seguidas de diluições 1:2.



Os valores de IC50 foram calculados com o auxílio do software Phototox[®] (OECD) e foram apresentados na tabela 1-3. Confirmou-se que apenas as amostras que possuem cafeína apresentaram concentração inibitória de crescimento. Entretanto, quando comparadas entre elas, observou-se um aumento da IC50 nas associações da cafeína com as *bubbles* e na associação cafeína, *bubbles* e ultrassom quando comparadas com a amostra da cafeína pura.

Tabela 1-3. Resultados de valores de IC50 da cafeína obtidas no Phototox[®] em cultura celular de HaCat após exposição de amostras com cafeína e *bubbles*.

Amostra	IC 50
Cafeína	384,43 (mg/L) ou log μ M 0,29
<i>Bubbles</i>	--
<i>Bubbles</i> e US	--
<i>Bubbles</i> e cafeína	832,39 mg/L ou log 0,63 μ M
<i>Bubbles</i>, cafeína e US	554,43 mg/L ou log 0,46 μ M
Controle	69,62 mg/L ou log 1,84 mg/L

A cafeína é uma substância consagrada e amplamente estudada. Entretanto são escassas as referências que dispõe resultados sobre segurança sem a aplicação de animais nos experimentos. Em buscas realizadas na base *Scopus* e *Web of Science* as referências encontradas contendo estudos da citotoxicidade da cafeína nas linhagens celulares avaliadas e com base nos protocolos da OECD foram poucas. Este cenário impacta inclusive no desenvolvimento de novos produtos que contenham cafeína e que necessitam se adequar aos novos protocolos de avaliação de segurança.

Estudo de Fernandes, Lopes e Santa-Maria sugere que a concentração de cafeína deve ter importância crítica porque altas doses dessa substância induzem apoptose e baixas concentrações podem atuar como antioxidantes. Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos em ensaios realizados com células CHO-K1. A IC₅₀ foi de 12,5mM, calculada pelo desempenho de seis concentrações diferentes após exposição de 24h, e a viabilidade celular avaliada com corante vermelho neutro (FERNÁNDEZ; LÓPEZ; SANTA-MARIA, 2003). Baixas concentrações de cafeína (<5mM) impedem a apoptose de macrófagos, enquanto concentrações altas de cafeína (> 5mM) induzem apoptose nessas células. Os efeitos da cafeína nas células HaCat e Balb 3T3 são contraditórios quando comparados com esta informação, pois doses inferiores de cafeína foram citotóxicas.

Em OJEH et al. (2016) a cafeína restringiu a proliferação celular de queratinócitos HaCat de maneira dose-dependente. O ensaio foi realizado com 5-difenil tetrazolium bromide (MTT) com sete doses diferentes de cafeína variando de 0,1 a 5 mM. A diminuição do

número de células dependente da cafeína foi estatisticamente significativa dentro do intervalo de dose de 0,25-5 mM, embora tenha sido observada em doses mais baixas também. Células HaCaT tratadas com doses de cafeína de 0,1 e 0,25mM não apresentaram muitas alterações nas células. Esses dados indicam que o uso diário habitual de cafeína, mesmo em doses baixas de 0,25mM, pode ter impacto negativo na proliferação celular, podendo ter um efeito inibitório na cicatrização de feridas e na epitelização. O estudo alerta que se deve tomar cuidado ao extrapolar esses resultados *in vitro* para prever resultados *in vivo*. As doses apresentadas nesse estudo são superiores aos valores usados nos nossos experimentos.

Estudos *in vitro* demonstraram que a adição de cafeína em culturas de osteoblastos pode reduzir a viabilidade celular com MTT por aumentar a apoptose com doses de cafeína $\geq 0,1$ mM (TSUANG et al., 2006). A cafeína e o seu metabolito, a teofilina, exibiram potências citotóxicas aproximadamente equivalentes às células NHEK, HFF, SK-Mel / 27 e HepG2. No entanto, as células endoteliais eram 2 a 3 vezes mais sensíveis à cafeína e cerca de duas vezes mais sensíveis à teofilina que os outros tipos de células (BABICH; BORENFREUND, 1992). BORENFREUND e PUERNER (1987) mostraram que a citotoxicidade de 0,5 mM cafeína (67% de sobrevivência em relação ao controle) foi reduzida por co-incubação com um sistema de metabolização microsomal de fígado de ratos S-9 induzidas por Aroclor (95% de sobrevivência), usando fibroblastos de camundongo BALB / c 3T3 em ensaio com NR.

THAKUR et al. (2017) avaliou a toxicidade das *bubbles* em linhagens celulares de retina humana ARPE-19, MIO-M1 e 661W, e observou uma diminuição significativa na viabilidade nas concentrações a partir de 60 $\mu\text{g/mL}$. Células de 661W foram mais resistentes, mostrando apenas toxicidade em doses de nanobolhas a partir de 120 $\mu\text{g/mL}$. Curiosamente, quando a ultrassonografia foi combinada na presença de 30 $\mu\text{g/mL}$ de nanobolhas em uma intensidade de ultrassom de 1 W/cm^2 , houve redução significativa da viabilidade em todos os tipos de células. Ao reduzir a intensidade para 0,5 W/cm^2 a viabilidade celular não foi afetada. Segundo o estudo, as bolhas e a ultrassonografia afetaram a viabilidade de maneira previsível, dependente da concentração e exposição, respectivamente. Nosso estudo demonstrou que as *bubbles* não aparentam toxicidade ao se exporem às linhagens celulares aplicadas, entretanto o comportamento de aumento na viabilidade quando houve aplicação do ultrassom sugeriu um possível efeito “protetor” às células, que pode estar relacionado a exposição que as células tiveram ao gás perfluoropropano. Nenhuma informação foi encontrada com relação à ação do gás perfluoropropano em culturas celulares até este momento.

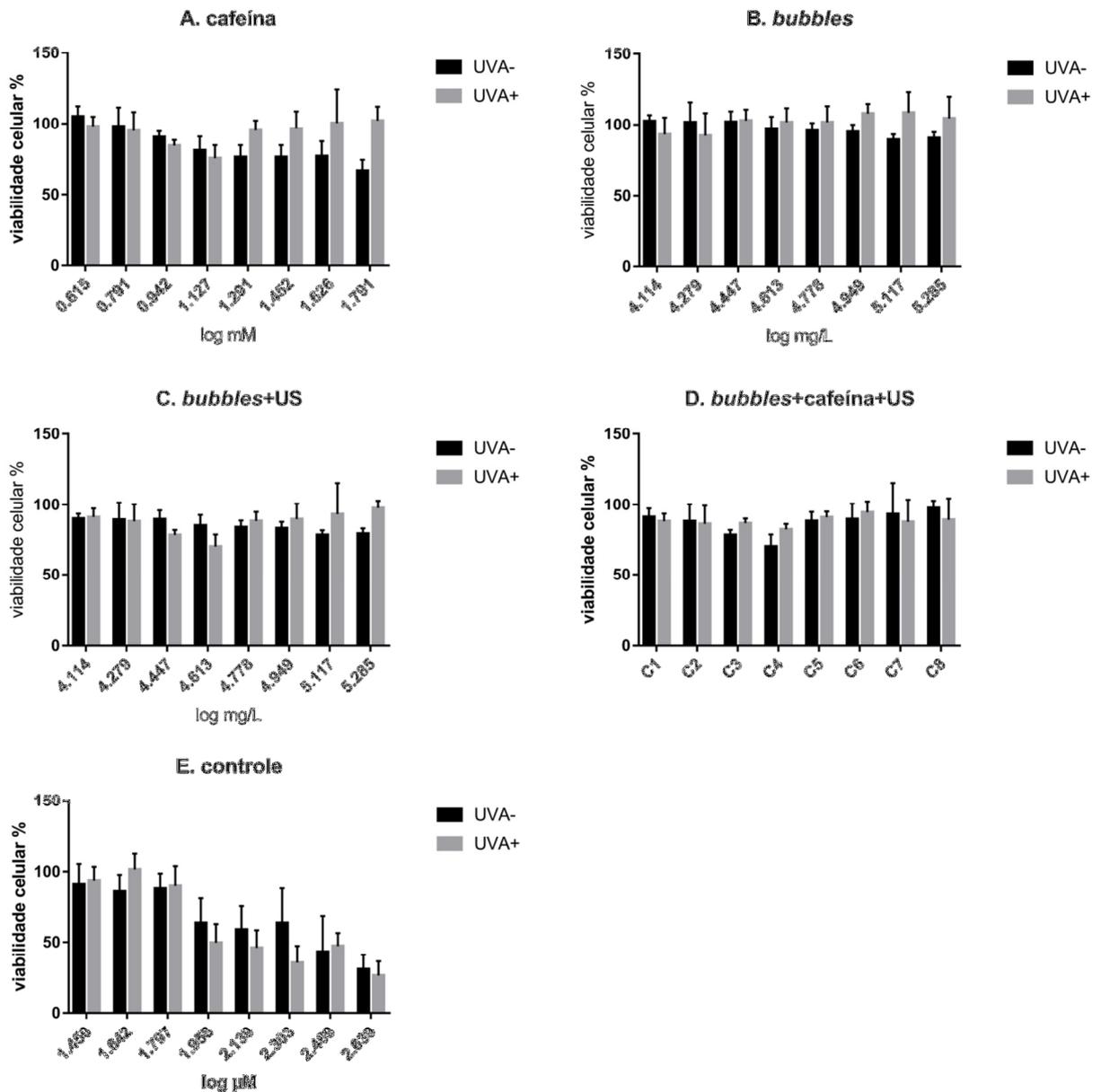
4.3 Avaliação da fototoxicidade

A fototoxicidade é definida por uma reação tóxica, causada por uma determinada substância após aplicação e exposição à luz (COLIPA; ECVAM, 2008). O teste de fototoxicidade *in vitro* identifica e determina o potencial tóxico da substância ou produto químico pela avaliação da redução na viabilidade das células após a exposição. Esta reação pode ser provocada ou aumentada mesmo com baixas doses da substância, ou ainda induzida por irradiação da pele após a administração sistêmica de uma substância, e identifica a probabilidade de substâncias ou produtos químicos testados em causarem fototoxicidade *in vivo* (OECD 432, 2004). As reações de fotossensibilização estão principalmente associadas à absorção de UVA, contato com corantes ou absorção de luz visível (SPIELMANN, 2002).

Após a realização dos ensaios de citotoxicidade, foram realizados os ensaios de fototoxicidade empregando-se a linhagem de células Balb/c 3T3 conforme preconizado pela OECD 432 (2004). A Figura 1-8 representa os resultados de viabilidade celular das células Balb 3T3 após contato com as amostras conjuntamente com e sem a exposição a radiação UVA. À exceção do controle Norfloxacino, tanto as amostras de cafeína quanto as amostras de *bubbles* e associações expostas à radiação UVA (UVA+) e não expostas à radiação UVA (UVA-) apresentaram viabilidades celulares acima de 60%, ou seja, não apresentaram comportamento citotóxico nas concentrações avaliadas, comparando-as com os controles de células.

Observou-se que o comportamento das amostras foram diferentes com e sem exposição ao UVA. Tanto a cafeína quanto as *bubbles* avaliadas isoladamente apresentaram aumento da viabilidade celular após exposição ao UVA de forma diretamente proporcional ao aumento das concentrações avaliadas. Esse comportamento também foi observado, porém de forma mais sutil, na amostra contendo as *bubbles* estimuladas pelo ultrassom e na amostra em que a cafeína e *bubbles* foram estimuladas pelo ultrassom, a viabilidade celular foi variável nas diferentes concentrações de ativo aplicadas, com uma leve tendência a diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração.

Figura 1-8. Porcentagem de viabilidade celular de Balb/3T3 clone 31 frente às diferentes concentrações após a exposição a luz UVA e ao abrigo A. **A.** Cafeína livre; **B.** *Bubble* livre **C.** *Bubble* associada ao ultrassom **D.** Cafeína associada às *Bubbles* expostas ao ultrassom. **E.** Controle (Norfloxacin). Os dados representam a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes. As concentrações indicadas nos gráficos (D) e (E) correspondem a mistura da cafeína e *bubbles* partindo da concentração inicial para cafeína 24mg/mL (log 2,09 μ M) e *bubbles* 160mg/mL (log 5,2 mg/mL) seguidas de diluições 1:47.



Uma limitação importante é o fato de que o PIF (*photo irradiation fator*) é baseado na comparação de duas concentrações igualmente eficazes (EC50), tanto no escuro quanto na exposição a radiação, que não podem ser determinadas em todos os casos. Para superar essa

limitação, existe uma nova medida para o potencial fototóxico de produtos químicos, o efeito foto médio (MPE) (COLIPA; ECVAM, 2008).

Os resultados da absorvância foram submetidos ao programa Phototox[®] que determinou o PIF e o MPE, sendo assim possível classificar as amostras de cafeína e *bubbles* para este ensaio como não fototóxicas. Os valores de ambos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 1-4: valores médios de PIF e MPE obtidos nos ensaios de fototoxicidade das amostras expostas a radiação UVA. Valores obtidos no software Phototox[®].

	PIF	MPE	Fototoxicidade
Cafeína	1	-0,085	Não
Bubble	1	-0,054	Não
Bubble +US	1	-0,013	Não
Bubble + cafeína + US	1	0,040	Não
Norfloxacino	2,505	0,007	Provavelmente fototóxico

Os resultados mostram que a cafeína, as *bubbles*, e as amostras com associações não apresentaram comportamento fototóxico, tendo em vista que o valor de PIF foi igual a 1, ou seja, as amostras avaliadas encontram-se dentro da faixa de aceitação para serem consideradas fotosseguras. O norfloxacino apresentou ser um bom controle positivo para o ensaio de fototoxicidade, pois o valor de PIF foi maior que 1. Salienta-se que os resultados de PIF foram submetidos à análise estatística ANOVA *One-way* e teste Tukey, e não apresentaram diferença estatística significativa entre os valores obtidos para a cafeína, as *bubbles* e as combinações, com $p < 0,05$.

Ao analisar a aplicação do ultrassom, observa-se uma pequena redução na viabilidade celular provocada pelas *bubbles* com US em algumas concentrações expostas e não expostas ao UVA (UVA-), sugere-se que o ultrassom é um aparelho seguro para o uso e que não gera morte celular corroborando a literatura (BOUCAUD et al., 2001; LIU; MIYOSHI; NAKAMURA, 2006; LATTIN; PITT, 2015). Em hipótese, não fica descartada a interferência na viabilidade celular do gás perfluoropropano liberto das *bubbles* após a aplicação do ultrassom. Nenhuma informação sobre esta condição foi encontrada nas referencias consultadas.

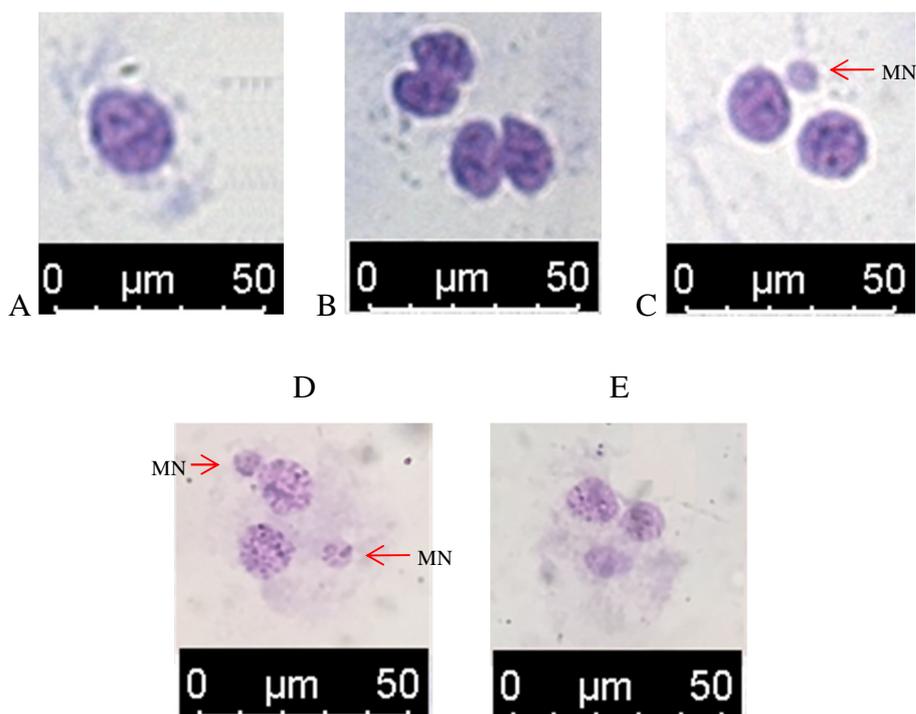
Estudo realizado SIVAK, RUDENKO e TEAGUE em 1982 relata que a citotoxicidade nas células BALB/3T3 clone 31 após a exposição a luz ultravioleta foi aumentada na presença de cafeína em 1,0 ou 0,2 mM. Estudo publicado por GILABERTE e GONZÁLEZ, 2010,

refere-se à cafeína como um agente protetor tópico e um fotoprotetor oral. A cafeína possui propriedades fotoprotetoras e quando aplicada na pele, aumenta a apoptose dos queratinócitos que sofreram com a radiação tipo UVB e inibem a formação de tumores. O mesmo se observa quando administrado via oral. Os tratamentos não tiveram efeito sobre a apoptose na epiderme normal ou em áreas não tumorais em camundongos portadores de tumor (LU et al., 2007). Em cultura de queratinócitos humanos, a cafeína na concentração de 2 mM induziu uma resposta apoptótica após a irradiação UVB a 75 mJ/cm² dentro de 8 horas (KERZENDORFER; O'DRISCOLL, 2009). Um ensaio realizado por Morison, *et al*, 1982 envolveu a exposição de células linfóides humanas à radiação UVA (320-400 nm) e, em alguns casos, UVB (280-320 nm), na presença dos produtos químicos, como a cafeína, e realizou a avaliação da fototoxicidade através da incorporação de uma [H] -timidina em DNA nuclear. A cafeína foi utilizada na concentração de 1µg/mL e não se mostrou fotossensibilizante (MORISON et al., 1982; SPIELMANN et al., 1994). Comparativamente, as concentrações aplicadas nos ensaios deste trabalho foram superiores a 0,8 1µg/mL (log mM 0,614) e igualmente não apresentou fototoxicidade. A cafeína tem um efeito protetor solar que inibe a formação de dímeros de timina e lesões provocadas pela queimadura solar na epiderme de ratos induzida por radiação UVB (LU et al., 2007). Enfim, a cafeína não é fototóxica e auxilia na proteção de tecidos lesados.

4.4 Avaliação da genotoxicidade

O teste do micronúcleo *in vitro* indica a genotoxicidade através da detecção de micronúcleos no citoplasma de células em interfase após a exposição das células a agentes clastogênicos (agentes que induzem rupturas cromossômicas) ou aneugênicos (agentes que alteram o número normal de cromossomos) potencialmente carcinogênicos. As culturas celulares usadas no ensaio são tratadas com citocalasina B, bloqueando a citocinese e permitindo a identificação, através de análise de lâminas, da frequência de micronúcleos (MN), células mononucleadas (CM), multinucleadas (CMu) e binucleadas (CB) (OECD 487, 2016) (figura 1-9). Este protocolo fornece um método preciso para quantificar o efeito sobre a proliferação celular, a citostase, a atividade citotóxica e os danos no DNA relacionados a um tratamento (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; FENECH, 2007).

Figura 1-9. Imagem visualizada em microscópio eletrônico (Primo Star, Zeiss®) de células CHO-K1 submetidas ao teste MNvit, com aumento da objetiva 40x. Célula mononucleada amostra Mitomicina (A), células binucleadas amostra NaCl com S9 (B), célula binucleada com um micronúcleo amostra *bubble* (C), célula binucleada com dois micronúcleos amostra caféina com S9 (D), célula multinucleada amostra *bubbles* com S9 (E).



Fonte: acervo da autora

O sistema de ativação metabólica aplicado neste estudo foi uma fracção pós-mitocondrial (S9) preparada de fígados de roedores suplementada com cofatores e agentes indutores de enzimas, como Aroclor 1254. Testes conduzidos *in vitro* geralmente requerem o uso de uma fonte exógena de ativação metabólica (RODAS et al., 2006).

O CBPI (Índice de Proliferação Pós-Bloqueio da Citocinese) é utilizado no cálculo da proliferação celular, pois indica o número médio de ciclos que cada célula sofre durante período de exposição à citocalasina B. O RI (Índice de Replicação) calcula a atividade citotóxica ou citostase, pois indica o número relativo de núcleos nas culturas tratadas em comparação com o controle negativo das culturas, que possui correlação direta com a inibição do crescimento celular (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; OECD 487, 2016). Assim, o RI é uma forma de comparação do número de células binucleadas ou multinucleadas

que se encontram em processo de divisão e quanto maior o seu valor, menor será a quantidade de células citostáticas, conseqüentemente, menor será a citotoxicidade da amostra.

Tabela 1-5. Média dos valores de CBPI e RI obtidas no ensaio de genotoxicidade aplicado nas amostras de cafeína e *bubbles* com e sem S9, NaCl, benzopireno, colchicina, mitomicina C em relação ao controle de células que demonstram a confiabilidade do método.

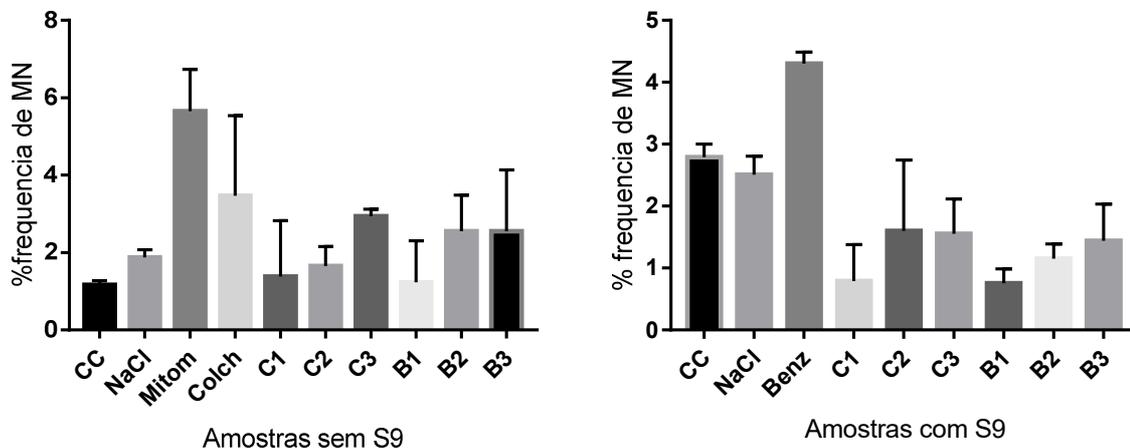
Amostras	Sem S9		Com S9	
	CBPI (±erro)	RI(%) (±DP)	CBPI (±erro)	RI(%) (±DP)
Controle de células	1,62 ± 0,02	100 ± 0,11	1,67 ± 0,02	100 ± 0,21
NaCl (Controle Negativo)	1,62 ± 0,02	98,9 ± 0,19	1,67 ± 0,02	101 ± 0,3
Mitomicina C (Controle Clastogênico)	1,51 ± 0,02	81,6 ± 1,09	--	--
Benzopireno (Controle Clastogênico)	--	--	1,66 ± 0,02	95,3 ± 0,18
Colchicina (Controle Aneugênico)	1,25 ± 0,015	40,1 ± 2,06	--	--
Cafeína 0,000185g/mL	1,66 ± 0,02	106,9 ± 1,45	1,60 ± 0,02	94,8 ± 0,23
Cafeína 0,000375g/mL	1,67 ± 0,02	107,6 ± 0,51	1,64 ± 0,02	87,2 ± 0,24
Cafeína 0,00075g/mL	1,69 ± 0,02	111,2 ± 0,18	1,62 ± 0,02	91,4 ± 0,6
Bubbles 0,02g/mL	1,65 ± 0,02	103,9 ± 1,58	1,58 ± 0,02	94,8 ± 0,23
Bubbles 0,01g/mL	1,50 ± 0,02	80,5 ± 0,93	1,60 ± 0,02	87,2 ± 0,24
Bubbles 0,005g/mL	1,53 ± 0,02	84,9 ± 1,08	1,61 ± 0,02	91,4 ± 0,6

Os dados apresentados na tabela 1-5 foram obtidos pelo modelo estatístico *Poisson* (MARGOLIN et al., 1986). É importante que a proliferação celular seja demonstrada em células de controle e tratadas, juntamente com uma avaliação da citotoxicidade nas células tratadas. Para o teste com S9, foi escolhido o benzopireno como referência de danos; e sem S9 escolhemos colchicina e mitomicina. Os valores de CBPI acima de 1,5 obtidos nas amostras de cafeína e *bubbles* nos sistemas com ou sem metabolização sugerem a ausência de toxicidade para as concentrações escolhidas quando comparados ao controle de células. Os erros foram menores que 0,02 em todas as amostras, indicando que houve homogeneidade entre as leituras das lâminas. As amostras de cafeína e *bubbles* apresentaram RI superior a 80%, incluindo valores superiores a 100% no caso das amostras de cafeína. O guia da OECD 487 (2016) preconiza uma viabilidade celular acima de 55%. Alguns estudos têm demonstrado que valores de RI menores do que 80% podem resultar em resultados falsos positivos (KIRKLAND, 2010). Os resultados de RI obtidos para todas as amostras testadas

corroboram com as referências e confirmam que tanto a cafeína quanto as *bubbles* não são genotóxicas.

Com relação à frequência de micronúcleos (% CBMN) apresentada na figura 1-10, o controle positivo clastogênico mitomicina elevou a frequência para $5,65 \pm 1,09\%$ e o controle positivo aneugênico colchicina elevou para $3,47 \pm 2,06\%$ em relação ao controle de células sem tratamento ($1,16 \pm 0,11\%$). O mesmo comportamento foi observado nas células que receberam a ativação metabólica, em que o controle positivo clastogênico benzopireno elevou a frequência para $4,3 \pm 0,18\%$ em relação ao controle de células ($2,8 \pm 0,2\%$). Na análise ANOVA *One-way* e teste de Tukey, as amostras do grupo com S9, apresentaram diferença estatística significativa com p-valor $< 0,05$ para o benzopireno, controle positivo clastogênico. Com relação às amostras de cafeína, a frequência de micronúcleos apresentou aumento crescente dependente da concentração nas três amostras avaliadas quando comparadas ao controle das amostras sem ativação metabólica. No caso das amostras com S9, a frequência de micronúcleos foi crescente de acordo com o aumento da concentração, embora os três valores avaliados apresentem valores inferiores ao controle. As amostras de *bubbles* apresentaram um comportamento muito semelhante à cafeína nas avaliações com e sem S9.

Figura 1-10.:Frequência de micronúcleos (%) em células binucleadas após exposição das amostras e controles sem ativação metabólica. Controle de células (CC); Controle negativo cloreto de sódio (NaCl); Controle clastogênico mitomicina (Mitom); Controle aneugênico colchicina (Colch); Controle clastogênico benzopireno (Benz); cafeína 0,96 mM (C1); cafeína 1,93mM (C2); cafeína 3,86mM (C3); *bubbles* 0,005g/mL (B1); *bubbles* 0,01g/mL (B2); *bubbles* 0,02g/mL (B3)



CARVALHO et al. (2002) descrevem que o método MNvit possibilita a avaliação de um grande número de amostras de maneira relativamente rápida, sem ser invasivo, permitindo identificar aumento na frequência de mutações em células expostas à inúmeros agentes genotóxicos. Esse método também é considerado simples, confiável, sensível e de baixo custo, o que possibilita rápida detecção de impactos genotóxicos nos organismos. É relevante apontar que a busca pela automação do teste do MNvit é crescente em diversos grupos de pesquisa, principalmente na fase de contagem das células. O uso da citometria de fluxo apresenta-se como facilitador quando comparado ao método clássico de leitura de lâminas ao microscópio óptico.

O efeito da cafeína sobre o DNA foi extensivamente estudado para investigar o mecanismo real de danos no DNA (AESCHBACHER; MEIER; JACCAUD, 1986). OGAWA et al. (2009) indicaram que a cafeína aumenta a frequência de células micronucleadas de L5178Y TK +/- clone (3.7.2C) linfoblasto de rato a partir de concentrações acima de 313µg/mL, ou 1,61mM, sendo que valores significativos foram observados na concentração maior ou igual a 625 µg/mL ou 3,21mM. Segundo ISHIDATE; HARNOIS; SOFUNI (1988) a cafeína é reportada com potencial clastogênico em quase todas as linhagens de células de mamíferos, embora não possua nenhum potencial mutacional pontual. Sugere-se que seu potencial clastogênico se origina do dano indireto ao DNA. Em AESCHBACHER; MEIER; JACCAUD (1986) e BLAGOEVA; BALANSKY; MIRCHEVA (1991), ainda se obteve que a cafeína causa danos no DNA apenas em níveis de dose na faixa de LD50, que é maior para hamsters (abaixo de 300 mg / kg) do que para camundongos (aproximadamente 130 mg/kg). A principal razão para a diferença na sensibilidade ao dano mutagênico entre as espécies, no entanto, parece ser a resistência diferente à toxicidade da cafeína (rever).

Estes dados indicam que o efeito da cafeína na apoptose é dependente das doses e linhas celulares utilizadas. Baixas concentrações de cafeína não mostraram citotoxicidade e a atividade apoptótica não foi detectada. Todos esses estudos mostram que a cafeína em diferentes concentrações pode causar morte celular apoptótica ou inibir a viabilidade celular, o que pode ser um mecanismo chave para os efeitos anticancerígenos da cafeína.

Os valores de concentração da cafeína avaliados no presente estudo foram baseados na IC10, concentração que inibe 10% de células desafiadas, estando distante da concentração de cafeína que causa danos ao DNA. Os resultados obtidos com as concentrações avaliadas de cafeína não apresentaram potencial tóxico, o que corroboram os estudos já publicados.

Estudos que sustentem os resultados obtidos para as *bubbles* não foram encontrados ou ainda não publicados.

5. Conclusão

Os resultados apontam para a segurança no uso tópico tanto da cafeína quanto das *bubbles*, isoladas ou associadas, nos ensaios *in vitro* aplicados em linhagens celulares de Balb 3T3/clone A31, HaCat e CHO-K1 e devidamente validados, um resultado satisfatório da avaliação das propriedades toxicológicas gerais dos produtos avaliados. Estes ensaios foram adequados para o rastreio inicial, uma vez que fornecem os dados sobre os valores das toxicidades relativas dos agentes de teste com baixo custo e reduzem a necessidade de experimentação animal extensiva nos estágios iniciais da exploração da toxicidade. Assim sendo, as próximas etapas do estudo podem prosseguir.

Capítulo 2 Caracterização físico-química e avaliação da eficácia de permeação da cafeína na presença das *bubbles* estimuladas pelo ultrassom

Resumo

A busca pela administração direcionada de fármacos, levando a uma melhora da eficácia, efeitos colaterais atenuados e resultados terapêuticos desejáveis, despertou grande interesse da pesquisa nas últimas décadas. As *bubbles* possuem morfologia e composição que as tornam interessantes como sistema de entrega de substâncias que, após aplicação de ultrassom, são rompidas, liberando pulsos de energia na forma de microjatos, facilitando a penetração do fármaco nos tecidos. Existem estudos demonstrando sua eficiência na entrega de fármacos e gases terapêuticos, mas são escassos os estudos com a aplicação dos mesmos por via tópica ou com finalidade cosmética. Neste contexto, o objetivo do trabalho atual foi estudar se as *bubbles*, estimuladas pelo ultrassom, poderiam melhorar a permeabilidade da cafeína aplicada topicamente, além de verificar a integridade das mesmas por métodos físicos e físico-químicos. A cafeína foi escolhida como marcador, pois apresenta características peculiares que dificultam sua passagem passiva pela barreira epidérmica. Com a finalidade de verificar a integridade e a estabilidade das *bubbles* foram aplicados testes para caracterização de tamanho, morfologia, presença de gás, entre outros, sendo que foram obtidos valores de tamanho de média ou moda 242nm na média estatística, D10=135,6 nm e D90=451,5nm. A avaliação da eficácia foi realizada por permeação *ex vivo* com aplicação de formulações contendo cafeína e *bubbles* estimuladas pelo ultrassom em células de Franz como aparato. As *bubbles* apresentaram características que confirmaram a integridade das mesmas, tais como presença de gás e tamanho médio. Foi possível identificar que a maior proporção de partículas na amostra avaliada possui proporções nanométricas. Os estudos de permeação indicaram que houve permeação da cafeína nas amostras de epiderme, derme e em amostras do líquido receptor coletado após 3 (três) horas de contato com a formulação, com valores médios de cafeína detectados entre 0,535 e 50,86µg, entretanto não houve diferença estatística que pudesse caracterizar que o conjunto *bubble* e ultrassom foi efetivo como promotor de permeação da cafeína, entretanto sugere-se que a possível efetividade das *bubbles* esteja relacionada as características de solubilidade do fármaco que se deseja permear.

Palavras-chave: microscopia confocal, *bubbles*, permeação, capacidade ecogênica, Análise de Rastreamento de Nanopartículas.

1. Introdução

A pele é uma importante via de administração e aplicação de medicamentos e cosméticos, entretanto sua composição praticamente impermeável desafia os estudos relacionados à absorção cutânea. A penetração é o processo pelo qual a substância ativa passa somente através do estrato córneo, enquanto que a permeação é quando o ativo passa pelo estrato córneo e alcança a epiderme viável ou a derme (LEONARDI, 2004; BABY, 2007). A porção menos permeável da pele é a epiderme, camada mais superficial, formada por corneócitos organizados e agrupados, ligados entre si por desmossomas (LEONARDI, 2004).

Normalmente, a penetração passiva na ou através barreira córnea só pode ser superada por moléculas pequenas (<500Da), neutras e relativamente lipofílicas (LEITE-SILVA *et al.*, 2012) através das paredes dos folículos pilosos, das glândulas sudoríparas ou sebáceas ou por entre as células da camada córnea (SAWAMURA; FRANCO, 2004). A via de permeação através dos folículos pilosos ocupa uma pequena parte de toda a superfície da pele, correspondendo a um valor muito pequeno (CAMPOS; MERCÚRIO, 2009). Nesse comparativo, a principal via de penetração cutânea de substâncias é através dos lipídios intercelulares (LEITE-SILVA *et al.*, 2012). A grande motivação é que a pele pode ser manipulada para permitir que se torne um caminho viável para o transporte de substâncias (LEITE-SILVA *et al.*, 2012). Processos que extraem lipídios ou causam desordem na conformação do estrato córneo podem aumentar a penetração (LEITE-SILVA *et al.*, 2012). Esta situação favorece os casos de substâncias com características hidrofílicas, que apresentam baixo potencial de penetração.

Nos últimos anos foi observada uma grande evolução dos estudos baseados no desenvolvimento e aprimoramento de sistemas com tecnologia para aumentar a penetração e até mesmo alcançar a permeação cutânea. As *bubbles* despertaram interesse em muitos pesquisadores, pois seu potencial, que a princípio tinha como principal finalidade a aplicação em exames clínicos como ferramenta para melhora da visualização de imagens (contraste), indicava ter aplicação promissora também em sistemas de entrega e direcionamento de substâncias ativas. O termo teranóstico (*theranostic*) é um neologismo que combina os termos terapia (*therapy*) e diagnóstico (*diagnostic*), aplicado para definir compostos que são capazes de realizar estas duas tarefas (TURÁNEK *et al.*, 2015a). Esta definição é bem empregada para definir as *bubbles* (PAREKH; THAKUR, 2018). A tecnologia das *bubbles* já atingiu amplas aplicações em vários campos da ciência e tecnologia, como tratamento de água, engenharia

biomédica e nanomateriais (UEDA et al., 2018). O contraponto é que as *bubbles* podem ter um tempo de vida curto e variada distribuição de tamanho, o que pode interferir diretamente na capacidade ecogênica. As *bubbles* produzidas para este estudo foram preparados usando uma estratégia de formulação adaptada de métodos publicados anteriormente (THAKUR et al., 2017; PAREKH; THAKUR, 2018), ou seja, foram otimizadas para conferir uma maior estabilidade em longo prazo.

O ultrassom quando aplicado nos parâmetros de frequência e intensidade terapêuticos é capaz de produzir aumentos modestos na permeação molecular (MITRAGOTRI, 2005; THAKUR et al., 2017). Combinando o ultrassom com vetores responsivos a ultrassom, como as *bubbles*, ocorre uma potencialização significativa deste efeito (THAKUR et al., 2017; PAREKH; THAKUR, 2018). O gás aprisionado na *bubble* oscila através de ciclos de expansão e contração em resposta a exposição ao ultrassom. Neste contexto, o ultrassom pode ter a frequência alterada e também ser usado para romper as bolhas por um fenômeno conhecido como cavitação inercial. A ruptura pode gerar microjatos resultando na propulsão de macromoléculas/agentes terapêuticos co-administrados, promovendo o aumento da permeação. Esta abordagem encontrou algum sucesso na distribuição posterior de fármacos oculares, com melhor penetração molecular através de sucessivas camadas da retina demonstradas *in vitro* e *ex vivo* (THAKUR et al., 2017).

A cafeína foi eleita como marcador e substância ativa para avaliar a eficiência das *bubbles* como promotor de permeação. Esta molécula possui características peculiares que representam um obstáculo para a penetração da barreira epidérmica, especialmente tamanho da molécula e característica hidrofílica. Além disso, cafeína é recomendada pela OECD (Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico) como substância teste por ter sido extensivamente estudada *in vitro* e *in vivo* (OECD 428, 2004; LUO; LANE, 2015), e também é um dos ativos mais utilizados para o tratamento tópico da celulite. Porém, a questão da baixa penetração interfere no seu potencial de ação. Contrariamente, quando se utilizam recursos para tornar a permeação facilitada, deve-se considerar uma possível absorção sistêmica e consequentes efeitos indesejáveis.

A celulite é uma condição fisiológica que promove alterações estruturais corporais, envolvendo aparência física e textura da pele. Dentre as inúmeras possibilidades de atenuar a condição da celulite, o uso de produtos tópicos contendo substâncias que proporcionem melhora da entrega do ativo ao sítio de ação pode se destacar com resultados diferenciados (SAWAMURA; FRANCO, 2004).

O desenho experimental do trabalho envolveu a caracterização da morfologia e estrutura das *bubbles* e a avaliação da eficácia do conjunto *bubbles*, cafeína e ultrassom. Para esta avaliação, foi escolhida a aplicação do método alternativo para a permeação, baseado no protocolo da OCDE 428 (2004), aplicando ensaio *ex vivo* (membrana de pele humana obtida de cirurgia de abdominoplastia).

2. Objetivos

2.1 Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a permeação ou influência das *bubbles* como agente de permeação *in vitro* de cafeína associadas às *bubbles* estimuladas pelo ultrassom.

2.2 Específicos

- Realizar testes capazes de avaliar as características físico-químicas, tais como morfologia, quantificação das partículas, medida do tamanho, presença de gás, entre outras, da amostra de *bubbles* produzidas na Austrália e usadas nos experimentos.
- Verificar o doseamento da cafeína anidra com a finalidade de avaliar teor ou identidade a qualidade da substância ativa escolhida como marcador dos ensaios.
- Avaliação da permeação de cafeína associadas às *bubbles* em formulação tópica aplicada em membrana de pele humana obtida de abdominoplastia, acoplada à célula de Franz e, posteriormente, exposta ao ultrassom de baixa frequência.

3. Material e Métodos

3.1 Quantificação da cafeína por CLAE

O método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção em Ultravioleta (UV) foi aplicado para verificar o doseamento da cafeína pura e no gel aplicado no ensaio de permeação. Esta análise foi definida pela possibilidade de parceria que foi realizada com o Laboratório de Insumos Naturais e Sintéticos da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, crédito para a aluna de mestrado Rosinês da Silva Almeida, orientada pelo Prof. Dr. Márcio Adriano Andréo.

Foi realizada uma varredura em espectrofotômetro (Thermo Scientific/Evolution 201) no intervalo de 200-400 nm com uma solução padrão de cafeína a 4 µg /mL proveniente de uma solução mãe de cafeína a 1000 µg/mL a fim de determinar o espectro de absorvância da cafeína. O mesmo procedimento foi realizado para a amostra do gel base usada no ensaio de permeação. Em paralelo, para a quantificação do teor da cafeína foi construída a curva analítica da cafeína com a finalidade de atender as exigências de aplicação analítica assegurando a reprodutibilidade dos resultados.

Com base em metodologias descritas na literatura (Maria et al., 2007), um método analítico preliminar de análise de cafeína por CLAE-UV foi desenvolvido utilizando um gradiente linear de metanol em ácido acético 1% em água. Análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) modelo Infinity 1260 (Agilent®), equipado com bomba de válvula quaternária, injetor automático, forno de coluna e detector de arranjo de diodos (DAD). Foi utilizada coluna de fase reversa C18 (250 mm X 4,6 mm) e partículas de 5 µm (ACE®). Os padrões utilizados foram a cafeína 99% (Embrafarma) e o ácido benzoico 99,5% (Sigma Aldrich®). Para o preparo geral dos padrões e amostras foram utilizados: filtros de seringa em PTFE hidrofílico de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade (Analítica®); Vials de 2mL com boca de 9 mm e tampa de rosca e septo em PTFE/Silicone (Analítica®); Metanol 99,9% grau CLAE e Acetonitrila 99,9% grau CLAE (Panreac®); Ácido acético grau HPLC (Dinâmica®), volume de injeção de 20 µL; fluxo de fase móvel de 1,0 ml/min.; tempo de detecção de 16 minutos; tempo total de corrida de 16 minutos, comprimento de onda 272nm. Estas condições cromatográficas foram otimizadas ao longo do estudo para ajustar a resolução e seletividade do sinal referente à cafeína frente às matrizes complexas (gel base e separação da pele). Para o desenvolvimento analítico também utilizado o ácido benzoico como padrão interno. O método utilizado foi o de padronização externa, onde as áreas obtidas dos cromatogramas de diferentes concentrações são comparadas com a área obtida para cada amostra. Os parâmetros de seletividade, linearidade, faixa de trabalho (intervalo), limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão foram avaliados para o método desenvolvido (VASCONCELLOS, 2017).

3.2 Avaliação da integridade da pele

A pele proveniente de tecido de abdominoplastia utilizada no experimento de permeação foi avaliada com relação a integridade da barreira cutânea aplicando-se o teste de perda de

água transepidérmica (TEWL - sigla em inglês para *transepidermal water loss*) realizado com o equipamento Cutometer[®] MPA 580 e sonda do Tewameter[®] TM 300 (Courage-Khazaka electronic GmbH). Foram realizadas 3 aferições em diferentes regiões da membrana de pele humana. A sonda do equipamento, que mede a taxa de evaporação de água da superfície da pele, foi posicionada sobre a mesma durante 30 segundos (são 30 medidas em 30 s), e o valor médio apresentado pelo *software* que acompanha o equipamento. A referencia de valores empregados foi obtida no manual de uso da sonda, que considera peles saudáveis em condições ambientais normais (temperatura 20 °C e umidade relativa do ar 40-60%), sendo TEWL (g/h/m²) entre 0-10 considerado como condição muito saudável, TEWL (g/h/m²) entre 10-15, como condição saudável e TEWL (g/h/m²) entre 15-25 condição normal (COURAGE-KHAZAKA, 2009). Diante destas informações, foi adotado como critério que as peles que apresentaram valores superiores a 20 g/h/m² de TEWL foram descartadas e substituídas.

3.3 Bubbles

3.3.1 Análise da composição e características gerais

As *bubbles* utilizadas nesse projeto foram produzidas na escola de Farmácia da Universidade de Queensland, Austrália (anexo 2), por meio da introdução de gás perfluoropropano (PFC) numa suspensão de micelas ou lipossomas unilamelares compostas por fosfolipídios estabilizados. Em resumo, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) e 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenoglicol)-2000](DSPEmPEG 2000) na razão molar de 94:6 foram dissolvidos em etanol. O solvente orgânico foi removido completamente por evaporação. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado utilizando um tampão fosfato sob aquecimento de 65°C (cerca de 10°C acima da temperatura de transição de fase do lipídio). O líquido e lipídios foram agitados para formar as bolhas lipídicas, uma interface gás-hidrofóbica com o gás atmosférico. As bolhas de lipídios formadas na agitação foram transferidas para um recipiente de crimpagem (frasco ampola), estanque ao ar ambiente e com capacidade maior que a quantidade a ser contida, que permita ter espaço até o topo. O gás perfluoropropano é introduzido sob pressão positiva, pressurizando as bolhas com ar atmosférico e ocupando posição no interior das bolhas e no espaço até o topo do recipiente, criando a nova atmosfera. Então, submeteu-se ao aquecimento de 65 °C e vórtice de 1500rpm. Esta condição torna a bolha lipídica mais maleável e permeável, havendo um movimento

líquido externo do ar atmosférico anterior e um movimento líquido interno do gás perfluoropropano, que leva a troca de gás ideal. A turbulência formada pelo vórtice não fornece um meio para melhorar o encapsulamento do gás, mas leva a formação de bolhas lipídicas com um volume menor de gás encapsulado e, portanto, menor tamanho de bolhas. A bolha lipídica contendo gás é então submetida a um arrefecimento instantâneo a uma temperatura entre 2 e 8 °C em até 5 (cinco) minutos. Em uma nova etapa, as bolhas lipídicas contendo gás foram submetidas a 31 vezes a extrusão a 65 °C através de uma membrana de filtro de policarboneto (PC) 400 nm, para melhorar a distribuição de tamanho e maximizar a retenção de gás (XING et al., 2010; PAREKH; THAKUR, 2018). As características finais obtidas com este processo estão descritas na tabela 2-1.

Tabela 2-1. Características das *bubbles* segundo informações existentes na patente (PAREKH; THAKUR, 2018) obtidas após 56 dias de produção. Estes dados serviram como parâmetro para as análises realizadas neste trabalho.

Composição	DSPC e (DSPEmPEG-2000)na razão molar de 94:6
Gás	Perfluoropropano (C ₃ F ₈)
Tamanho médio	211,2nm±64,5 (Zetasizer ZS, técnica DLS)
PDI	0,354±0,035 (DLS)
Armazenamento	Entre 2 e 8°C
Morfologia	Nanovesículas esféricas com lumen escuro e ausencia de agregação
Tempo de estabilidade	56 dias após produção

3.3.2 Análise visual da morfologia

Para caracterização visual da morfologia das *bubbles*, uma suspensão da amostra 1:1000 em solução salina foi colocada entre lâminas de vidro e examinada usando um microscópio confocal (Leica® TCS SP8 Cars). Outra lâmina foi preparada com nova alíquota da mesma diluição 1:1000 de *bubbles* e foi analisada em microscópio óptico (Zeiss® Axio 4.8) interfaceado com uma câmera digital, em aumento de 100x.

3.3.3 Avaliação do tamanho e concentração das amostras de *bubbles*

Amostras de *bubbles* foram submetidas à análise NTA (Análise de Rastreamento de Nanopartículas) usando o instrumento Malvern® NanoSight NS300, que combina as propriedades de espalhamento de luz e do movimento browniano para obter a distribuição de tamanho e a contagem de partículas em suspensões. Para isso foi preparada uma diluição 1:1000 da suspensão original de *bubbles* e inserida no equipamento. Um feixe de laser é emitido e passa através do porta-amostra e as partículas em suspensão no caminho desse feixe espalham a luz de modo que podem ser facilmente visualizadas através do microscópio com 20x de aumento e uma câmera de vídeo acoplados no equipamento. A câmera captura vídeos das partículas em movimento browniano. O software com a tecnologia NTA processa os vídeos rastreando o movimento de todas as partículas individual e simultaneamente e pela equação de Stokes-Einstein calcula o diâmetro hidrodinâmico e estima a concentração das nanopartículas na amostra analisada.

3.3.4 Análise microbiológica

Análise microbiológica foi realizada em agar BHI (*brain heart infusion*), meio previamente esterilizado com o objetivo de verificar se a amostra de *bubbles* poderia estar contaminada, influenciando e/ou alterando suas características. Este meio de cultura foi escolhido por ter utilização geral, adequado para a cultura de uma grande variedade de tipos de organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos (BD, 2013).

Uma alíquota da suspensão de *bubbles* pura foi semeada na placa com meio sólido BHI por esgotamento com o auxílio de uma alça de inoculação estéril e incubadas a 37°C por 24 e 48 horas. Após estes períodos, as placas foram examinadas quanto ao crescimento.

3.3.5 Avaliação da capacidade ecogênica

Para avaliação da capacidade ecogênica das *bubbles*, 1mL da suspensão pura foi misturada em um frasco com 40mL de solução salina imediatamente antes de ser submetida a exposição de ultrassom (Philips® HD-7) e a imagem obtida foi capturada. Outra forma simples de demonstrar se as *bubbles* continham gás no interior foi realizada aplicando uma pequena amostra da dispersão de *bubbles* sobre uma placa de petri e submetendo-as à aplicação do ultrassom usado no estudo (Johari® digital, modelo Ultrasound JUS-2).

3.4 Formulações aplicadas na avaliação da eficácia das *bubbles* e parâmetros do ultrassom

A avaliação da permeação foi realizada com 3 (três) composições distintas, sendo que duas delas receberam o tratamento (ou situação de análise) com aplicação do ultrassom, resultando um total de 5 (cinco) composições, conforme detalhamento descrito na tabela 2-2. A numeração corresponde a sequência de aplicação utilizada no experimento, sendo a formulação 1 correspondente ao controle negativo.

Tabela 2-2. Composição das formulações aplicadas nos ensaios de permeação com as respectivas concentrações, valor final do pH e se houve a aplicação do ultrassom.

Componentes	Função	1 (% p/p)	2 (% p/p)	3 (% p/p)	4 (% p/p)	5 (% p/p)
Hydroxyethylcellulose (CAS: 9004-62-0)	Geleificante	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Aqua (Água purificada)	Veículo	qsp*	qsp*	qsp*	qsp*	qsp*
Phenoxyethanol (CAS: 122-99-6)	Conservante	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Propylene Glycol (CAS: 57-55-6)	Solubilizante	10	10	10	10	10
Caffeine (CAS: 58-08-2)	Marcador/ativo	-	1	1	1	1
<i>Bubble</i>	Objeto de estudo	-	-	-	1	1
Cítric Ácid (CAS: 77-92-9)	Corretores para pH 5,7 a 7	qs	qs	qs	qs	qs
Ultrassom	Objeto de estudo/ativador das <i>bubbles</i>	-	-	Sim	-	Sim

*qsp: quantidade suficiente para

Primeiramente, foi preparado o gel, dispersando a hidroxietilcelulose (HPC) em parte da água purificada até total hidratação do polímero e aquisição de consistência. Acrescentou-se o conservante e o restante da água. O pH final foi medido e mantido para 7,0. A cafeína foi pesada e solubilizada na quantidade de propilenoglicol estipulada, e depois a mistura adicionada ao gel. O pH final da formulação após a adição da cafeína foi ajustado com ácido cítrico para ficar entre 5,5-6,0. As *bubbles* foram pesadas e adicionadas diretamente ao gel com cafeína apenas no momento em que o ensaio foi realizado. Nas formulações em que o ultrassom (Ultrasound JUS-2, Johari[®] digital) foi aplicado, as condições de uso foram as mesmas padronizadas e empregadas nos ensaios apresentados no capítulo 1, sendo tempo de 5 minutos, US pulsado 50%, frequência de 3MHz e intensidade de 2,5W/cm².

Com relação à associação com a cafeína, desejou-se investigar se poderia existir alguma interação com as *bubbles*. Preparou-se uma diluição de *bubbles* associada à cafeína

em solução aquosa a 1%(p/p) e explorou-se a análise NTA com o NanoSight NS 300 (Malvern[®]), assim como descrito no item 3.1.2.

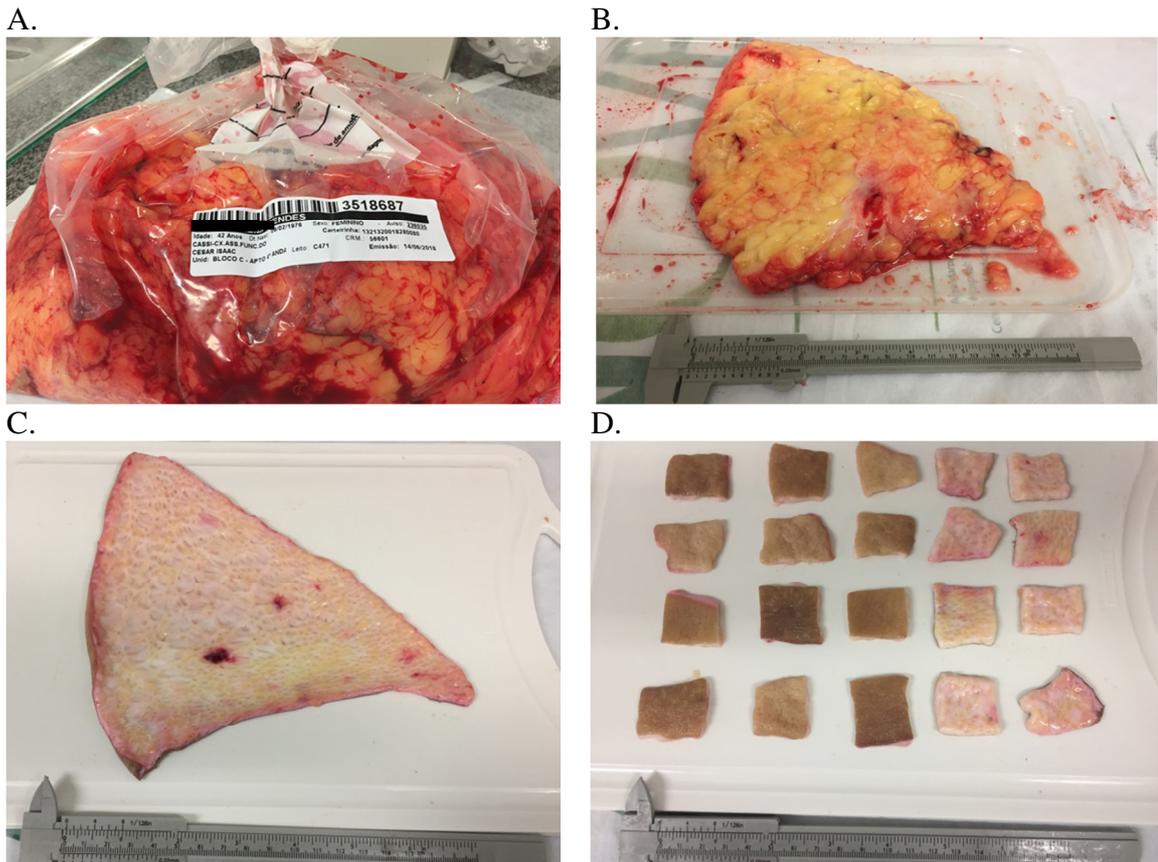
3.5.1 Preparo da pele

Os experimentos foram conduzidos mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) sob o número de parecer: 2.179.344, conforme documento apresentado no Anexo 3.

O estudo de permeação cutânea *in vitro* utilizou membranas de pele de humana de abdominoplastia realizada em mulheres com idade entre 35 e 65 anos de idade pela equipe do Dr. César Isaac, obtidas após autorização e assinatura “termo de consentimento livre e esclarecido”, de acordo com o Anexo 4.

Para utilização da pele, foi necessária a remoção da camada de tecido adiposo com auxílio de bisturi cirúrgico, pinça clínica e tesoura, restando apenas a derme e a epiderme com espessura aproximada de 2 mm (figura 2-1). Em seguida a pele foi recortada em fragmentos menores, de forma que pudessem ser adaptadas ao tamanho da célula de Franz utilizada nos ensaios, foi lavada com solução tampão PBS pH 7,4, embalada e congelada a -18 °C.

Figura 2-1: Procedimento de limpeza e preparação da pele humana para utilização nos experimentos de avaliação da permeação *in vitro*. (A) pele abdominal acondicionada em saco logo após a remoção; (B) pele abdominal com grande quantidade de tecido adiposo; (C) pele “limpa” sem tecido adiposo; (D) pele fragmentada em tamanhos adequados para serem acopladas a célula de Franz.



Fonte: autora

O tecido adiposo removido da pele foi depositado em embalagem para resíduo biológico e descartado seguindo protocolo de descarte de material biológico da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP – Campus Diadema. Para limpeza dos utensílios que tiveram contato com material biológico durante o procedimento, foi utilizada imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por 24 horas, e após, lavados com água corrente e detergente Extran MA01 (Merck®).

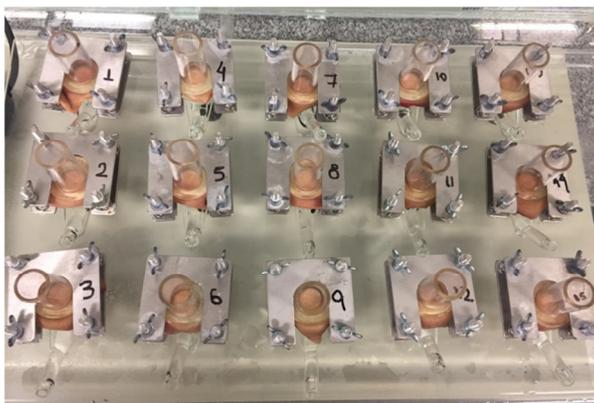
3.5.2 Montagem das Células de Franz e do sistema aberto

No dia em que o experimento foi realizado, a pele foi retirada do freezer, colocada sob uma superfície plástica, coberta com papel absorvente, para que descongessse naturalmente. Periodicamente, foi reidratada com solução tampão PBS pH 7,4. Após o total descongelamento, verificou-se a integridade da barreira cutânea aplicando-se o teste de perda de água transepidérmica (TEWL - sigla em inglês para *transepidermal water loss*) realizado com o equipamento Cutometer[®] MPA 580, conforme descrito no item anterior.

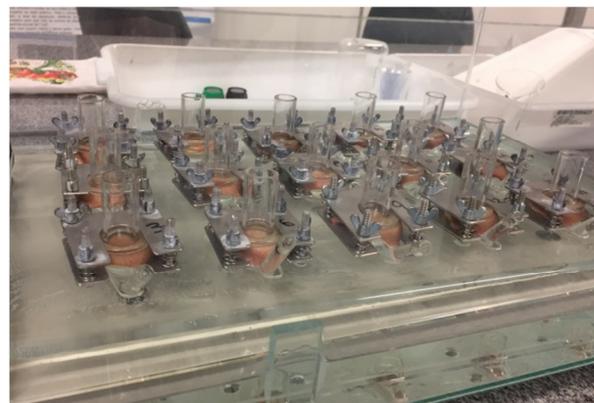
Os experimentos de permeação foram conduzidos com 15 células de difusão de Franz, com capacidade da área de aplicação valor médio do diâmetro de 5,31cm². Esta conformação permitiu que fossem analisadas as cinco formulações descritas no item 3.3 em triplicata e em condições muito próximas ao estado *in vivo*. As membranas de pele aprovados na avaliação da integridade da barreira cutânea foram posicionados de forma segura entre os compartimentos doador e receptor que compõem a célula de Franz e presas com uma garra de metal apropriada, com o lado da epiderme voltado para o compartimento doador. O compartimento receptor possui acesso para coleta da amostra e foi preenchido com 3mL de solução de PBS (pH 7,4) buscando eliminar bolhas próximas a pele. As células de Franz montadas com a pele humana foram colocadas em um suporte de acrílico posicionado em uma cuba de vidro (sistema aberto) com dimensões (45 cm x 30 cm x 16 cm) (figura 2-2). Esse sistema foi continuamente termo-regulado a 32±2 °C com o auxílio de um termostato submerso (Vigo Flex LTDA 50 W, 110 v, 20 °C à 34 °C) e agitado com uma pequena barra magnética a uma velocidade constante de 500 rpm (Mag-Multi, Marte[®] 24 x 40 cm) durante todo o tempo do ensaio.

Figura 2-2: sistema aberto empregado nos ensaios *in vitro* para avaliação da permeação da cafeína estimulada pelo conjunto *bubbles* e ultrassom. Imagem A apresenta as cinco fileiras de células de Franz vista de cima. Cada fileira representa uma amostra analisada em triplicata. A imagem B apresenta o mesmo sistema visto na lateral frontal

A



B

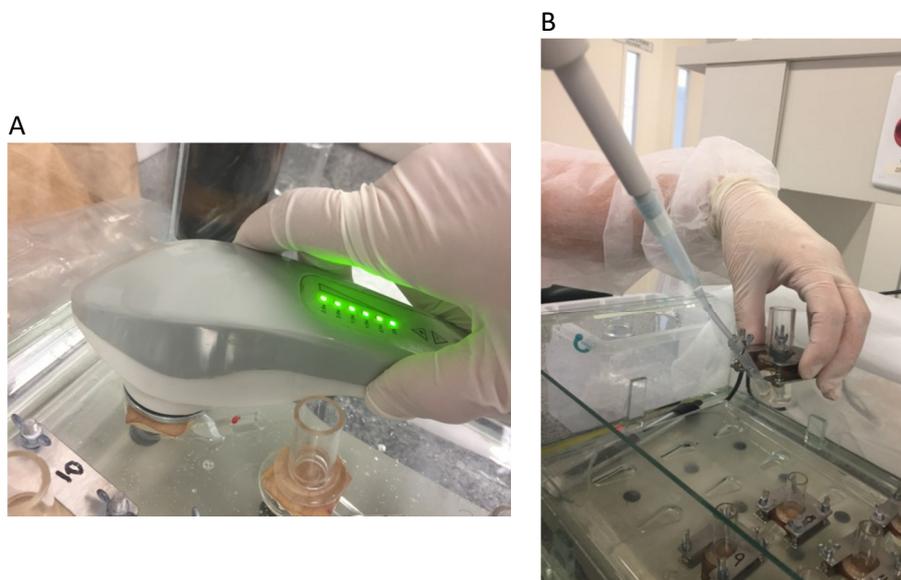


Fonte: autora

3.5.3 Aplicação das amostras na pele humana e tomadas de ensaio

Com o sistema pronto e estabilizado, as amostras foram aplicadas no compartimento doador na quantidade de $50\text{mg}/\text{cm}^2$, ou seja, média de $265,5\text{mg}$ de amostra ajustada para a área total do compartimento receptor ou seja, foi $2,655\text{mg}$ de cafeína. Nas amostras que foram determinadas a aplicação do ultrassom, o compartimento doador da célula de Franz foi retirado e o transdutor foi aplicado perpendicularmente à superfície da pele em modo pulsado 50%, frequência de 3MHz e intensidade de $2,5\text{W}/\text{cm}^2$ (figura 2-3A). Os tempos de coleta foram estipulados para t_0 (inicial), $t_{10\text{minutos}}$, $t_{1\text{hora}}$, $t_{3\text{horas}}$ e $t_{24\text{horas}}$. Ao final de cada tempo, uma alíquota com volume aproximado a 1mL foi retirado do compartimento receptor nesses intervalos, sendo a mesma quantidade retirada repostada com solução de PBS (figura 2-3B) e reservada para futura análise por CLAE.

Figura 2-3. A. aplicação do ultrassom sobre a pele. O compartimento doador precisou ser removido para que a aplicação fosse realizada. B. alíquota sendo retirada do compartimento receptor e substituída por um volume equivalente de solução de PBS.



Fonte: autora

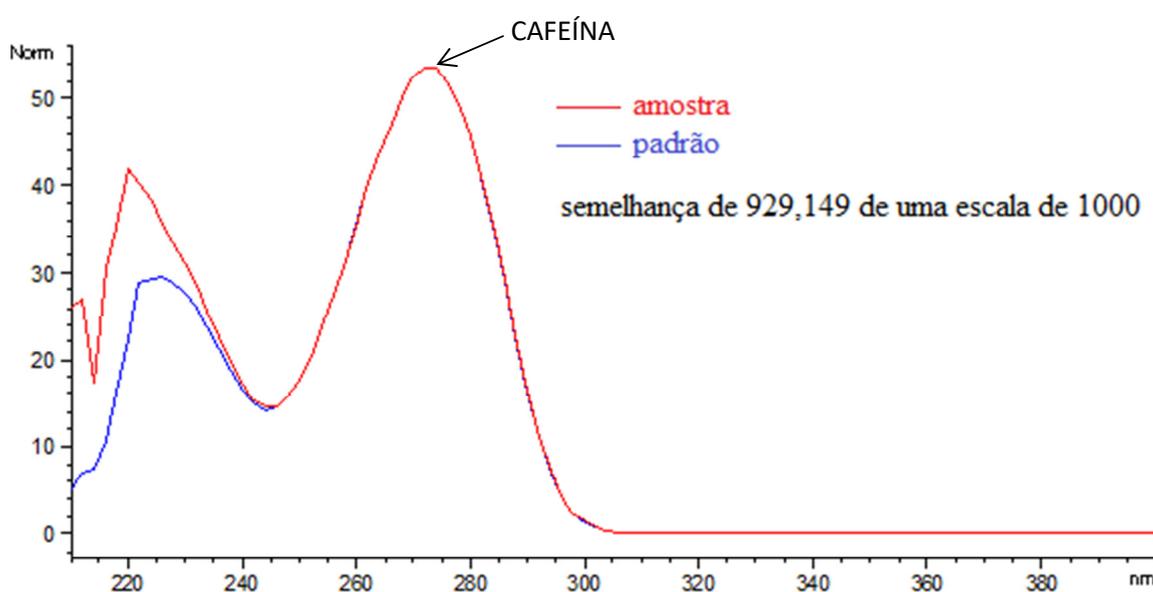
Após as 24 horas, antes de desmontar o sistema, a amostra que ficou na superfície de cada membrana foi removida com Swab[®]. Em seguida, o estrato córneo foi removido por decapagem com uma fita adesiva, também denominada tape (D-Squame[®] Disc Applicator Item #D500) aplicando-se leve pressão na superfície da pele e rapidamente retirada com o objetivo de remover o restante da formulação, como complemento do swab. Após, cada pedaço de pele foi separado em epiderme e derme pressionando a superfície da pele contra uma placa e aplicando-se água a 60 °C. Após 1,5minuto, com o auxílio de uma pinça “descolou-se” a epiderme da derme e a derme foi picotada. Esta última parte foi realizada apenas com a área que teve contato com a amostra. Os Swabs[®], as fitas adesivas ou tapes, a epiderme e a derme foram colocados cada um em frascos respectivos identificados e imersos em solução PBS e mantidas sob-refrigeração por 24 horas. Decorrido esse tempo, foram sonicadas, filtradas e analisadas com relação ao teor de cafeína por CLAE. Os resultados finais foram tratados estatisticamente com Anova one way, considerando diferença estatística p menor que 0,05 e a múltipla comparação foi realizada com o teste de Tukey.

4. Resultados e Discussão

4.1 Quantificação da cafeína por CLAE

O método utilizado para quantificação da cafeína apresentou o resultado na figura 2-4.

Figura 2-4. Espectro de absorção padrão da cafeína obtida em análise por CLAE (Agilent®)



A característica da curva da amostra praticamente se sobrepõe à curva padrão, com semelhança de 929,149 de uma escala de 1000, comprovando o doseamento de 100% no teor de cafeína anidra apresentada pelo laudo do fornecedor (anexo 1).

4.2 Avaliação da integridade da pele

A diretriz OCDE 428 (2004) solicita testes de integridade da pele para experimentos de difusão *in vitro* e sugere, entre outros métodos, a medição da TEWL como uma possível ferramenta para avaliar a integridade do estrato córneo. A TEWL mede a taxa de evaporação da água a partir da superfície da pele. Uma TEWL baixa é, então, característica de uma pele intacta e saudável, enquanto uma TEWL alta indica que a função barreira foi perturbada, frequentemente relacionada com baixa hidratação (NETZLAFF et al., 2006; LEITE-SILVA et al., 2012). A TEWL tem variáveis de acordo com a área corpórea relacionadas à espessura do

estrato córneo, além da microvasculatura dérmica. O valor na face, por exemplo, pode variar de 1 g/h/m² a 15 g/h/m². Após um dano ao estrato córneo, essa perda pode alcançar até 70 g/h/m² (ADDOR; AOKI, 2010). Foi estabelecida uma faixa entre 10 e 20 g/h/m² como valores de aceitação, baseada nas informações da literatura e recomendações do fabricante da sonda Tewameter (COURAGE-KHAZAKA, 2009). Diante desses parâmetros, os valores de TEWL aprovados para avaliação da integridade da barreira variaram entre 13,1 e 19,9 g/m²/h, indicando que a barreira cutânea das peles utilizadas no experimento não apresentava danos (tabela 2-3).

Verificar condição de estabilização da pele enquanto são realizadas as medidas

Tabela 2-3. Resultados da avaliação de perda de água transepidérmica (TEWL) realizada com a sonda Tewameter[®] TM após o descongelamento da pele. Valores indicam que a barreira cutânea das peles utilizadas no experimento não apresentavam danos. Ou mudar esta frase e colocar dados

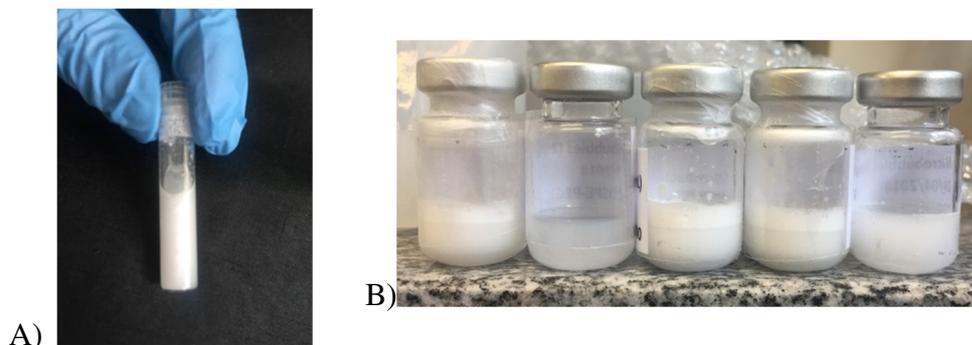
PELE	TEWL g/m ² /h	PELE	TEWL g/m ² /h
1	19,3	9	17,8
2	18,6	10	15,9
3	17,5	11	16,4
4	16,8	12	16
5	14,2	13	15,6
6	19,9	14	13,1
7	16,6	15	13,2
8	15		

4.3 Bubbles

4.3.1 Análise da composição e características gerais

As chamadas *bubbles* se apresentam como uma suspensão leitosa (figura 2-5), em que as vesículas contendo gás estão dispersas no meio líquido. Por ser uma suspensão, necessita ser agitada moderadamente para ressuspender as partículas. Esta suspensão possui recomendação de ser armazenada sob refrigeração (entre 2 e 8 °C). Em B é possível observar diferença de tonalidade entre os conteúdos e a presença ou não de espuma na superfície do líquido.

Figura 2-5. Amostras de suspensão contendo *bubbles* enviadas pelo grupo do professor Austrália para os ensaios em embalagens (A) flaconetes e (B) frasco ampola.



Fonte: autora

Essas variações de aspecto podem indicar uma diferença de concentração de *bubbles* entre as amostras. Supõe-se que uma falta ou falha de homogeneização no momento do envase possa ter ocasionado essa situação, ou algum possível dano pode ter ocorrido pelo transporte, validade ou manuseio da amostra. A presença de espuma, de característica uniforme, pastosa e facilmente ressuspensa é esperada após a extrusão das bolhas, conforme descrito na patente (PAREKH; THAKUR, 2018). Diante dessas observações, algumas análises possíveis foram aplicadas com o objetivo de avaliar a qualidade das amostras recebidas.

A tradução de micro / nanobolhas e ultrassom como uma modalidade para a entrega eficaz e reproduzível de farmacos pode ser dificultada devido à heterogeneidade e instabilidade das formulações relatadas. (THAKUR et al., 2017). A avaliação da composição das *bubbles* utilizadas nos experimentos deste trabalho foi essencial para compreender alguns resultados. Com base nas informações obtidas na patente (PAREKH; THAKUR, 2018), resumidas na tabela 2, primeiramente, analisou-se a técnica de produção eleita pelo grupo e concluiu-se que está se baseou em escolhas que pudessem ser mais eficientes com relação a estabilidade e menor tamanho das partículas quando comparada com outras técnicas de obtenção de *bubbles* (LIU; MIYOSHI; NAKAMURA, 2006; XING et al., 2010; TURÁNEK et al., 2015; MO et al., 2018). Uma limitação das formulações de micro/nanobolhas disponíveis comercialmente tem sido seu tamanho de bolha heterogêneo (PAUL et al., 2014; THAKUR et al., 2017). A composição de DSPC, DSPEmPEG-2000, gás perfluoropropano e o método de obtenção adotado na produção das *bubbles* reduziu significativamente o tamanho

e a heterogeneidade das bolhas quando comparada a outras técnicas, com vesículas nano-dimensionais altamente ecogênicas retidas por até oito semanas sob condições otimizadas de armazenamento (THAKUR et al., 2017).

A existência de polietilenoglicol (PEG-2000) ligado ao fosfolípídeo no invólucro serve como estabilizador estérico, ou seja, além de aumentar a resistência do envoltório, conferindo uma barreira significativa ao escape de gás do núcleo para o meio aquoso, fornece às partículas a característica de não se aproximarem umas das outras numa distância maior que o dobro da espessura da camada (XING et al., 2010), o que evita a coalescência. O gás perfluoropropano (PFP), um hidrocarboneto halogenado de cadeia pequena, pesado em comparação a outros gases (C_3F_8 , peso molecular 188,02 g/mol), não tóxico mostrou aumentar tanto a estabilidade quanto a ecogenicidade do agente de contraste ultrassônico, devido a sua diferença de densidade com o ar e sua hidrofobicidade. É postulado que moléculas de gases maiores têm menor probabilidade de se difundirem e gases hidrofóbicos têm uma maior afinidade pelos lipídios, portanto serão encapsulados de forma mais estável (XING et al., 2010; THAKUR et al., 2017). Após a produção, as nanobolhas permanecem geralmente estáveis em temperatura refrigerada de 4 °C sob uma atmosfera de gás perfluoropropano durante cerca de duas semanas sem variação significativa no tamanho e morfologia da bolha na medição do tamanho e observação visual, mostrando boa estabilidade (THAKUR et al., 2017; PAREKH; THAKUR, 2018).

4.3.2 Análise visual da morfologia

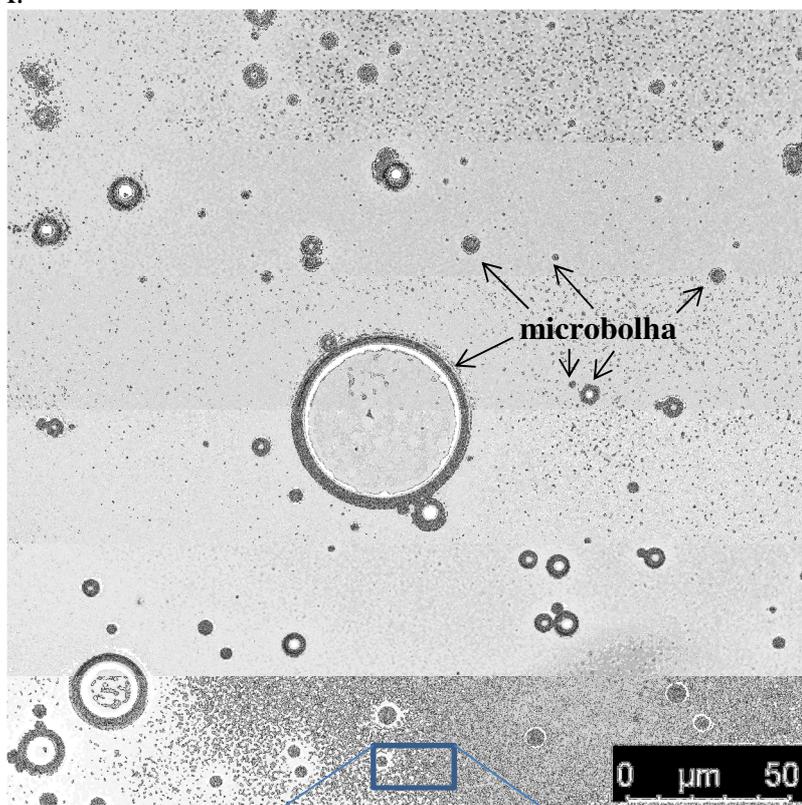
A imagem óptica do campo claro forneceu uma confirmação visual direta de bolhas micrométricas e mostrou que estas se apresentam com uma morfologia esférica com uma estrutura núcleo-envoltório, embora o envoltório fosse difícil de distinguir na imagem da microscopia. De uma forma geral as bolhas parecem maiores do que seu tamanho real devido à formação de halo, resultado da luz refletida por uma superfície altamente reflexiva, a partir da luz forte de iluminação (figura 2-7A).

Uma observação importante ocorrida durante a visualização foi que as microbolhas foram reduzindo de tamanho com o decorrer dos minutos, uma situação coerente uma vez que as *bubbles* não estão nas condições adequadas de conservação. Inicialmente considerou-se uma heterogeneidade nos tamanhos das bolhas apresentadas, como pode ser visto na sinalização feita na figura 2-7A, entretanto a coloração acinzentada ao fundo da imagem

instigou a análise da mesma amostra em um aumento maior. Com a preparação de uma nova lâmina na mesma diluição preparada na visualização anterior, submeteu-se a visualização no microscópio óptico (Zeiss® Axio 4.8) em aumento de 100x. A imagem revelou uma subpopulação de bolhas com tamanhos muito inferiores a 1 μm , que se movimentam rapidamente, indicando serem bolhas nanométricas pelo formato esférico que apresentaram (figura 2-7B). A movimentação das partículas poderia indicar a possibilidade de serem bactérias, que possuem tamanho máximo de 5 μm , entretanto a morfologia esférica e a confirmação de ausência de crescimento microbiano apresentado no ensaio microbiológico (item 4.3.4 – capítulo 2) excluíram essa possibilidade e considerou-se serem as *bubbles*.

Figura 2-6. Imagem óptica de campo claro obtida em microscópio confocal (Leica®) em aumento de 63x (A) e imagem obtida em microscópio óptico (Zeiss®) em aumento de imersão (100x), revelando subpopulação de nanopartículas (B).

A.



B.



Fonte: acervo da autora

4.3.3 Avaliação do tamanho e concentração das amostras de *bubbles*

As *bubbles* foram avaliadas pela técnica de NTA (Análise de Rastreamento de Nanopartículas) com o objetivo de obter a distribuição de diâmetro da *bubbles* e a concentração das mesmas na amostra. A figura 2-8 representa a leitura realizada na amostra e apresenta a distribuição dos tamanhos de partículas encontradas. Informações obtidas pelo software do NTA indicaram que 80% das partículas presentes na amostra possuem tamanho menor que 300nm, sendo que o valor de maior ocorrência, ou seja, a medida de frequência que mais aparece, também chamada de “moda”, foi de 242nm (rever pois esses dados não são possíveis de comparar. Valores de D10 e D90 foram respectivamente 135,6 e 451,5nm. Com relação a concentração, a amostra de 1mL apresentou $5,4 \times 10^{12}$ partículas. A tabela 2-4 apresenta esses valores com os respectivos desvios padrões.

Figura 2-7. Distribuição de tamanho de bolhas utilizadas nos experimentos apresentada em gráfico obtido pela NTA.

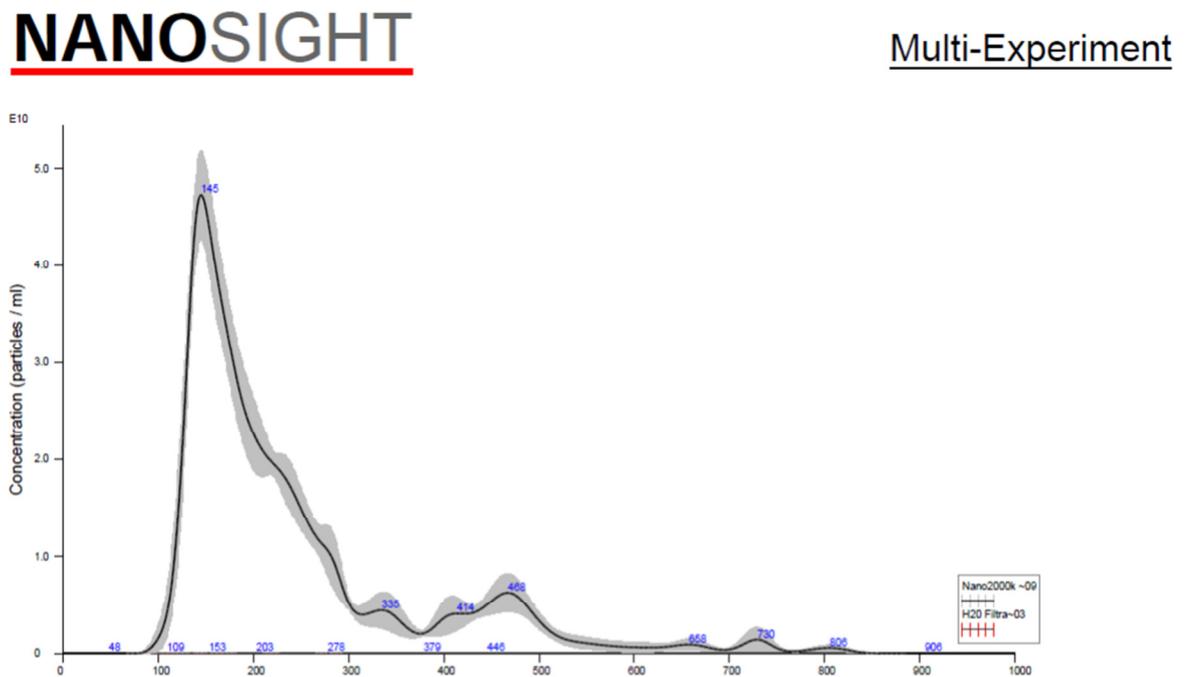


Tabela 2-4. Informações comparativas das *bubbles* usadas nos experimentos deste estudo, obtido com a técnica NTA - *Nanoparticle Tracking Analysis* comparado com valores médios registrados na patente, obtido por técnica similar, DLS - *Dynamic light scattering* (PAREKH; THAKUR, 2018). Ao lado das amostras consta a informação do período após a fabricação em que a análise foi realizada.

<i>Bubbles</i>	Técnica aplicada	Tamanho médio (nm)	Dispersão dos tamanhos
Patente (56 dias)	DLS	211,2±64,5	PDI: 0,353±0,035
Atual (~300 dias)	NTA	242,6±7,0	Moda: 148,9±6,2nm D10: 135,4±2,8nm D90: 454,6±13,8nm

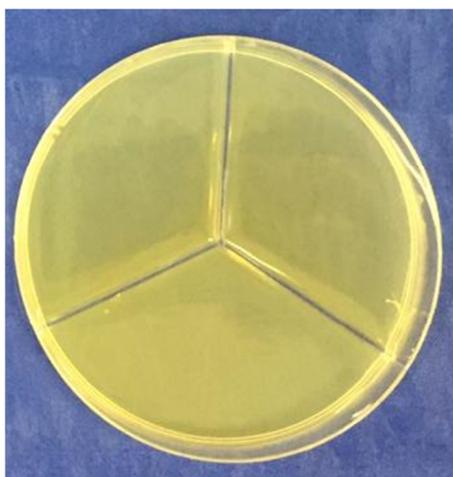
Considerando o tempo de fabricação da amostra em uso (abril de 2018), condição de transporte e estocagem aplicadas durante toda a trajetória do trabalho e a própria manipulação aplicada durante os experimentos, os valores obtidos na análise de rastreamento de nanopartículas demonstraram que houve uma redução no tamanho das partículas ao comparar com os valores informados na patente das *bubbles*, que foram obtidos após 56 dias de produção, e também por outra técnica, a de DLS (*Dynamic Light Scattering*). Esta técnica emprega apenas o espalhamento de luz com intensidades diferentes e obtém a distribuição de volume e quantidade pelo tamanho da partícula por teoria de Mie, conseguindo medir a distribuição de tamanho de partículas com mesmo tamanho, mas não sendo tão preciso, apresentando diferenças de tamanhos muito grandes. Entretanto, esta técnica indica outro valor, o índice de polidispersividade (PDI). O valor baixo de PDI indicado no estudo apresentado na patente, também apresentado na tabela 2-4, sugere que a distribuição do tamanho de partícula é homogêneo (PAREKH; THAKUR, 2018).

O NanoSight é uma tecnologia que vem sendo muito empregada para caracterização de nanobolhas, uma vez que é utilizado desde o desenvolvimento das partículas até o controle de qualidade. A tecnologia de NTA permite analisar de forma única e direta o tamanho das nanobolhas e visualizá-las por meio de vídeos. O equipamento emprega parâmetros que restringem a identificação de partículas com diâmetro menores que 1µm. Segundo informação do manual do fabricante (Malvern®), tanto a tecnologia de DLS quanto a de NTA conferem resultados confiáveis. A diferença está na resolução de cada técnica. NTA permite maior resolução na distribuição de tamanho, pois analisa diretamente as partículas visualizadas pela câmera.

4.3.4 Análise microbiológica

Objetivou-se com essa análise verificar a integridade microbiológica da suspensão ou possível contaminação de *bubbles* uma vez que uma possível contaminação poderia representar um importante interferente. A análise microbiológica foi realizada em agar BHI, um meio de cultura rico em nutrientes, utilizado para cultivo de importantes contaminantes como estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos (ANVISA, 2004). A coloração original amarela e límpida foi mantida após 24 e 48 horas após inoculação da amostra, não houve de crescimento característico, o que indica a ausência de contaminação bacteriana (figura 2-9).

Figura 2-8. Placa de petri com agar BHI inoculada com amostra “pura” de *bubbles*. Imagem foi obtida após 48h da inoculação e confirma que não houve crescimento microbiano.

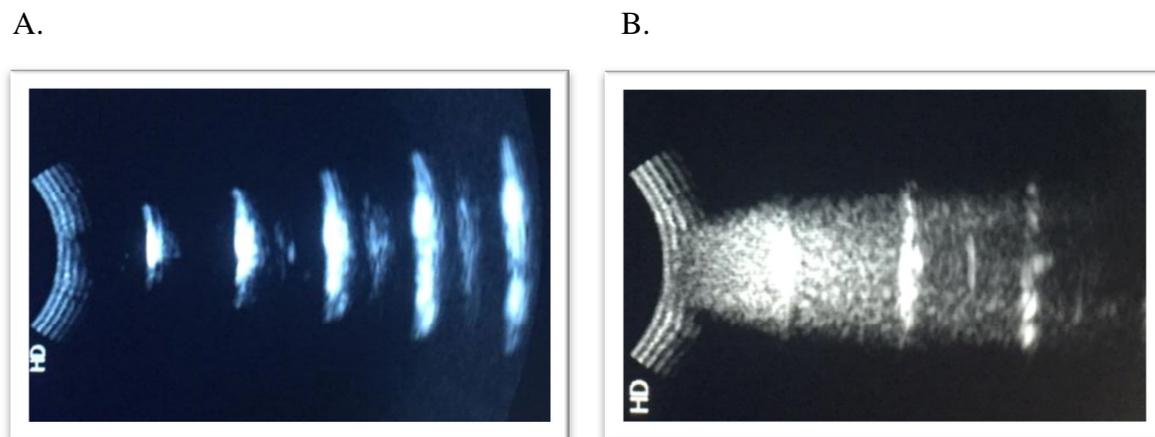


Fonte: autora

4.3.5 Avaliação da capacidade ecogênica

As amostras foram submetidas à exposição de ultrassonografia (Philips® HD-7) e indicaram, na comparação das imagens de antes e após a aplicação das *bubbles*, que as partículas ainda mantêm suas características de ecogenicidade, indicando que o gás perfluoropropano ainda está presente dentro das *bubbles* (figura 2-10).

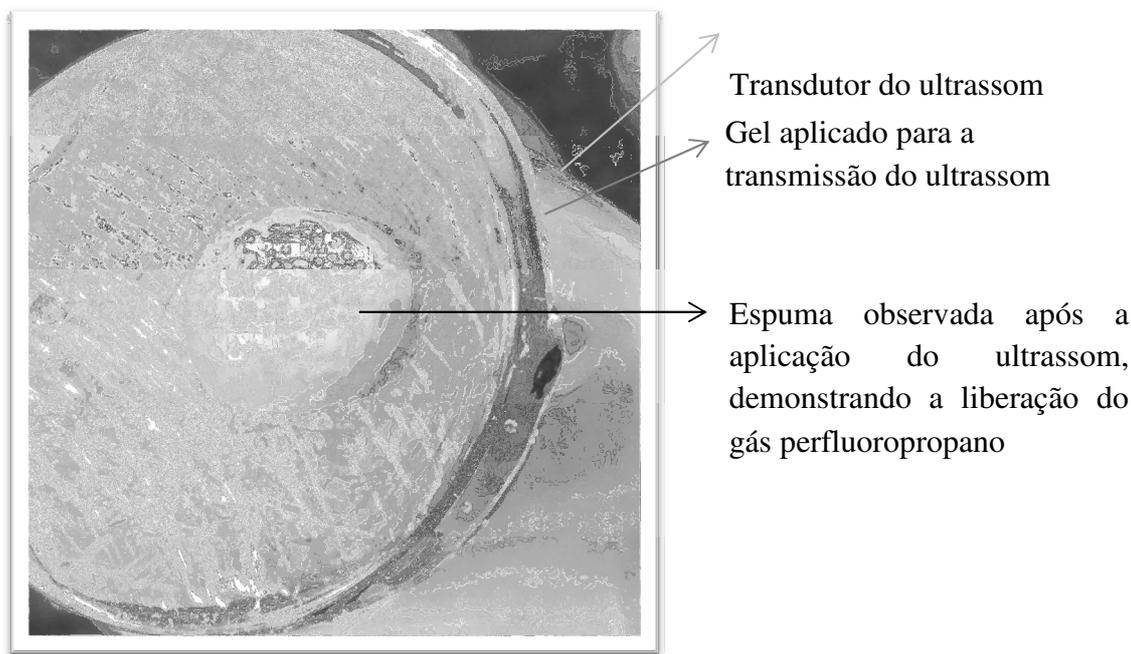
Figura 2-9. Imagem ecogênica comparando antes (A) e após (B) a aplicação das *bubbles* em solução salina. Imagem obtida em equipamento de ultrassom clínico Philips® HD-7.



Fonte: acervo da autora

O ensaio alternativo que foi possível ao aplicar o transdutor do ultrassom (Johari® digital, modelo Ultrasound JUS-2) na placa de petri contendo a amostra, imediatamente demonstrou a presença de gás no interior das *bubbles*, pois foi possível observar a formação de espuma na superfície da placa, demonstrando a liberação do gás perfluoropropano (figura 2-11). Estas avaliações confirmam que, mesmo decorrido aproximadamente 300 dias da data de produção, as *bubbles* ainda possuem gás, apenas não sendo possível comparar a quantidade, por não haver referencia dessa informação nas literaturas consultadas.

Figura 2-6. Formação de espuma após amostra aplicada na placa de petri ser exposta ao ultrassom.



Fonte: acervo da autora

Os resultados das análises das *bubbles* foram essenciais para confirmar a qualidade da amostra de *bubbles* aplicada nos experimentos e sugerem que, decorrido o tempo entre a fabricação e a aplicação nos experimentos, as *bubbles* reduziram de tamanho quando comparada com a amostra recém-gerada (PAREKH; THAKUR, 2018), apesar de terem mantido as características morfológicas e de ecogênicidade. A análise microbiológica completou a análise, indicando a usar não crescimento da amostra e ausência de qualquer contaminante que poderia modificar a funcionalidade das *bubbles*.

4.4 Formulações

A cafeína é uma substância solúvel em água, podendo precipitar durante a fabricação das formulações em gel, (FERNANDES, EDER DE MENEZES; DAMASCENO; FERRARI; AZEVEDO, 2015). Solúvel no propileno Desta forma, a precipitação da cafeína se torna um fator limitante, pois sua concentração no local de aplicação pode ser reduzida. Esta característica influenciou a definição da concentração da cafeína em 1% (p/p) na formulação, além deste valor ser uma concentração usual de mercado e estar dentro da faixa máxima de

8% de cafeína permitida pela agência reguladora nacional (ANVISA, 2002; RAMALHO; CURVELO, 2006). Na concentração de 1% de cafeína, o gel apresentou-se límpido e visualmente homogêneo. LUO e LANE (2015) relataram que a cafeína precisa permanecer em solução para permear, estar em uma alta atividade termodinâmica e também não cristalizar no estrato córneo. O conceito de atividade termodinâmica representa a tendência que o fármaco tem em “liberar-se” do veículo. Supõe-se que aumento nesta atividade leva ao aumento da velocidade de permeação do fármaco através da pele. A atividade termodinâmica é diretamente proporcional à solubilidade do fármaco no veículo e é máxima quando se tem solução saturada (MARTINS; VEIGA, 2002). A concentração de *bubbles* a 2% foi sugerida pelo prof. Harendra Parekh, uma vez que não existe referência de aplicações desta por via tópica.

Após a associação, desejou-se investigar se a cafeína poderia interagir com as *bubbles*, repeli-las ou simplesmente destruí-las. A análise NTA com o NanoSight NS 300 (Malvern®) indicou que a mistura diminuiu o tamanho médio das *bubbles*, mas em contrapartida aumentou a concentração destas na amostra, ou seja, aumentou o número médio de *bubbles* por mL.

Tabela 2-5. Comparação de tamanhos e concentração entre amostras contendo *bubbles* isolada e outra com associação à cafeína.

Amostras	Tamanho médio (nm)	Dispersão dos tamanhos (nm)	Concentração (partículas/mL)
<i>Bubbles</i>	242,6±7,0	Mode: 148,9±6,2 D10: 135,4±2,8 D90: 454,6±13,8	5,4x10 ¹²
<i>Bubbles</i> + cafeína	212,7±3,9	Mode: 137±5,0 D10: 119,4±1,7 D90: 390,6±20,1	7,78x10 ¹²

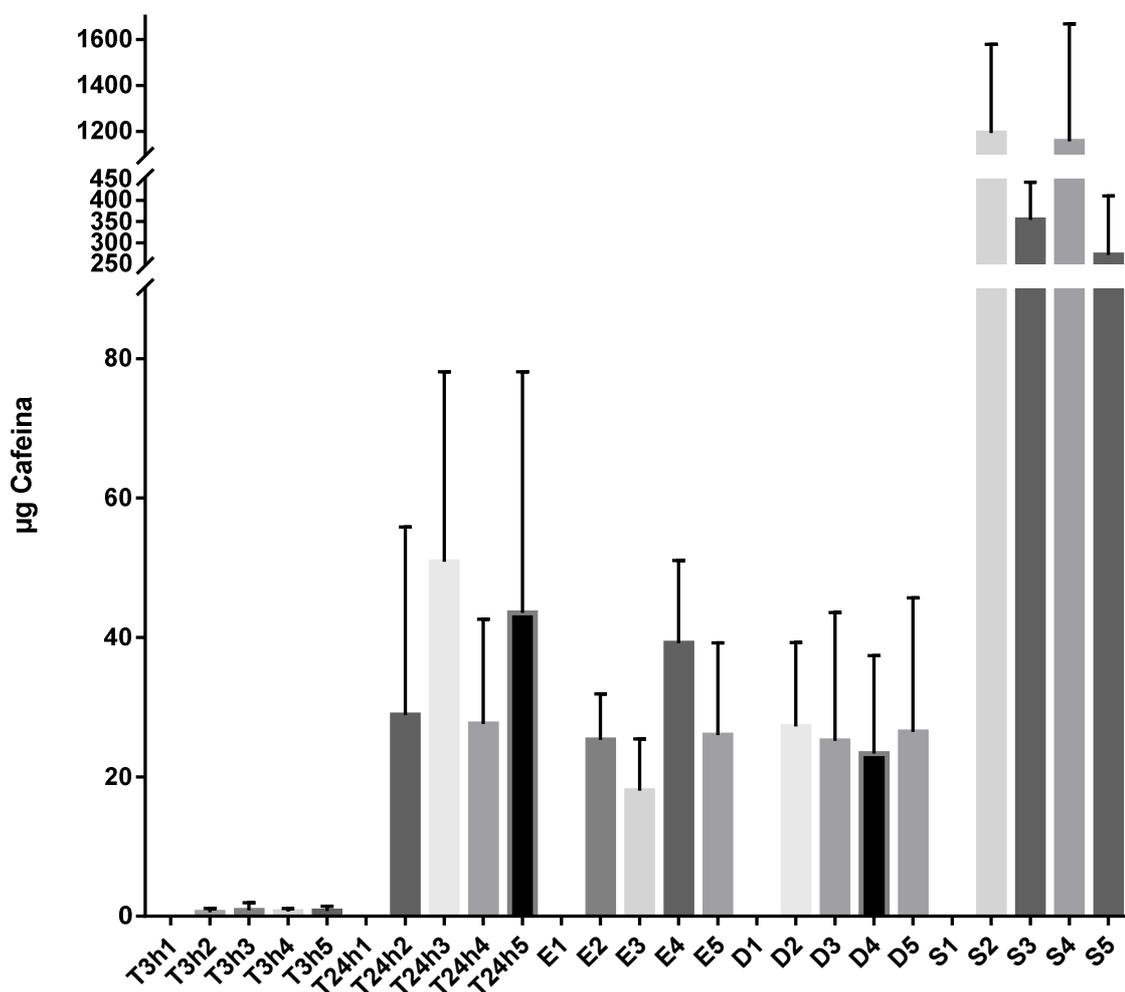
Mesmo com os números indicando e sugerindo uma possível interação entre cafeína e *bubbles*, este ensaio não é conclusivo, pois é importante relatar que as análises de NTA das amostras descritas na tabela 5 foram realizadas com 24 (vinte e quatro) dias de diferença entre elas, podendo ser uma justificativa para a diminuição das partículas. Entretanto ainda fica a dúvida com relação ao aumento da concentração. Conclui-se que outros ensaios devem ser realizados, especialmente com novas *bubbles*, para que um resultado mais conclusivo seja obtido.

4.5 Avaliação da permeação *in vitro*

Os estudos utilizando método de avaliação de absorção cutânea *in vitro* com membranas biológicas ou sintéticas em substituição ao uso de animais apresentam vantagens, como economia e rapidez na obtenção de resultados, controle das condições do experimento e a possibilidade de avaliar um maior número de ensaios e réplicas, entre outras (BABY, 2007). Este método mede a difusão de substâncias químicas pela membrana escolhida por meio da análise quantitativa da amostra coletada no sistema reservatório (OECD 428, 2004). Para estudos transdérmicos, as células de difusão de Franz são as mais utilizadas. Experimentos de permeação *in vitro* são um complemento valioso para estudos de permeação *in vivo*, pois simulam o sistema vivo, fornecem um meio conveniente para avaliar as características de permeação de fármacos e permitem a aplicação de qualquer tipo ou quantidade de veículo (THE EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 1997).

As leituras das amostras coletadas de líquido receptor, swab (S), epiderme (E) e derme (D) foram realizadas com base em n=2, e gerou o gráfico representado na figura 2-12. Foram realizados 12 ensaios durante todo o período do mestrado, no entanto apenas os dois últimos ensaios foram realizados com os parâmetros realmente ajustados, conforme descrição no item 3.5.

Figura 2-11. Quantificação de cafeína nas amostras coletadas nos experimentos que avaliaram a permeação da cafeína estimuladas pelas *bubbles* estimuladas pelo ultrassom comparadas com controles. A numeração de 1-5 corresponde às formulações aplicadas na pele, sendo 1. Controle negativo (gel puro); 2. Gel+cafeína; 3. Gel+cafeína +US; 4. Gel+cafeína+*bubbles*; 5. Gel+cafeína+*bubbles*+US. T3h: amostra de líquido receptor coletada no tempo 3 horas; T24h: amostra de líquido receptor coletada no tempo 24 horas; E: amostra obtida da epiderme; D: amostra obtida da derme e S: amostra correspondente às coletas realizadas na superfície da epiderme, ou seja, swab e tape somadas.



Ao realizar a análise estatística sobre os valores adquiridos entre os grupos apresentados no gráfico, Anova one way indicou diferença significativa com $p < 0,05$, no entanto, ao aplicar o teste de Tukey, as maiores diferenças ocorreram nas amostras de líquido receptor, epiderme e derme versus a superfície. Aplicou-se também o Anova one way e teste de Tukey para avaliar comparação apenas entre os grupos líquido receptor, epiderme e derme

versus a superfície, novamente o Anova one way indicou diferença significativa entre os grupos com p-valor < 0,05, e o teste de Tukey indicou que as maiores ocorreram entre os grupos T3h e T24h.

Os dados apresentados no gráfico demonstram a concentração de cafeína nas amostras analisadas. Apenas houve detecção de cafeína a partir da tomada de 3 horas. Os valores encontrados na epiderme, derme e superfície indicam que a maior parte da concentração de cafeína aplicada manteve-se entre a superfície e as camadas da pele. Comparando-se as concentrações de cafeína entre os grupos e as diferentes formulações, parece não haver influencia da aplicação das *bubbles* e o ultrassom para incentivar a permeação.

Observa-se que a grande maioria dos trabalhos sobre liberação de fármacos com formulações tópicas tem sido realizada utilizando-se células clássicas de difusão *in vitro* do tipo Franz. Estudo relatou a permeação *in vitro* da cafeína na pele humana e suína. Foram aplicadas doses infinitas de cafeína ($285 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ de uma solução a 1% p/v em solução salina tamponada com fosfato) aos compartimentos doadores de células de Franz e as experiências de permeação foram conduzidas até 6 h. Quantidades cumulativas de cafeína permeada foram $\sim 10 \text{ mg}/\text{cm}^2$ para epiderme humana separada por calor (SCHREIBER et al., 2005). Estudo realizado em 2009 aponta para um importante papel da via folicular na permeação da cafeína (TRAUER et al., 2009). Nos estudos *in vitro* e *ex vivo*, no tempo T 10 minutos não foi detectada a presença de cafeína nos líquidos receptores corroborando a literatura que mostra a não permeação da cafeína nos primeiros minutos (NIELSEN; SORENSEN; NIELSEN, 2009; GAJEWSKA et al., 2015).

Ultrassom contínuo e pulsado foi usado para promover a entrega de cafeína na pele humana *in vitro* por Boucaud et al. (2001). Uma solução de cafeína radiomarcada (5 mCi/mL) foi aplicada ao compartimento doador na dose de $3 \text{ mL} / 3,14 \text{ cm}^2$. O ultrassom foi aplicado na frequência de 20 Hz e uma intensidade de $2,5 \text{ W} / \text{m}^2$. Embora a quantidade de cafeína que permeava após 8 h aumentou tanto para tratamentos contínuos ($\sim 35 \text{ ng}/\text{cm}^2$) como pulsados ($\sim 25 \text{ ng}/\text{cm}^2$) comparados com o controle ($\sim 10 \text{ ng}/\text{cm}^2$), um aumento de temperatura também foi associado com a aplicação de ultrassom (LUO; LANE, 2015). O ultrassom de modo contínuo apresentou ser mais eficaz na cinética de difusão da água, enquanto o transporte transdérmico de cafeína através da pele humana foi maior pelo modo pulsado de tratamento (BOUCAUD et al., 2001). O modo pulsado é a intensidade periodicamente interrompida, com nenhuma energia ultrassônica sendo produzida durante o período desligado. A intensidade

ultrassônica é a energia/segundo a cada cm^2 de uma superfície perpendicular à emissão das ondas. É calculada em W/cm^2 .

Na aplicação de ultrassom, preconiza-se a utilização de grossa camada de gel, entre a pele e o transdutor, para melhor obtenção de um ponto focal (BARCAUI et al., 2014). No caso do experimento realizado neste trabalho, como a amostra já estava sendo aplicada em veículo gel, não foi acrescentada mais outra camada de gel para não diluir a amostra. É importante relatar que nesse processo de aplicação do transdutor houve perda da amostra contendo cafeína, e esta foi coletada com swab e quantificada junto com as amostras de swab, sendo considerados valores de superfície, ou seja, que não foi permeado.

Foi hipotetizado que a cavitação ocorre perto da superfície do estrato córneo e, portanto, temporariamente desorganiza as bicamadas e / ou corneócitos fosfolipídicos intercelulares, criando um canal aquoso transitório no estrato córneo, facilitando assim a absorção transdérmica (UEDA; SUGIBAYASHI; MORIMOTO, 1995; MITRAGOTRI S., 2006). Resultados obtidos com amostras de pele de ratos sem pelos sustentam esta hipótese, pois a permeabilidade cutânea da cafeína (droga hidrofílica) foi significativamente aumentada pelo ultrassom de baixa frequência (BOUCAUD et al., 2001). Este fato sugere que a sonicação possui um efeito maior sobre a permeação cutânea de drogas hidrofílicas, que geralmente apresentam baixa permeabilidade. Essas informações poderiam justificar os valores de cafeína encontradas nas tomadas de derme, epiderme e líquido receptor nas formulações em que a cafeína não possuía estímulo das *bubbles*, que indicam ter ocorrido penetração da cafeína, mas não justificam os demais casos.

Quando expostas ao ultrassom em baixa frequência, as *bubbles* se rompem. É suposto que a energia libertada após a cavitação de vesículas ecogênicas de tamanho tenha potencial para aumentar a captação celular localizada do fármaco e / ou aumentar a profundidade de penetração do fármaco no tecido (PAREKH; THAKUR, 2018). O gás liberado leva à formação de orifícios nos corneócitos, aumentando o espaço intercelular e perturbação dos lipídios do estrato córneo instantaneamente, possibilitando a passagem de macromoléculas (LIU; MIYOSHI; NAKAMURA, 2006). Essa pode ser uma justificativa sustentável para o fato de não ter ocorrido a detecção de um valor maior de cafeína nas amostras contendo *bubbles* estimuladas pelo ultrassom, uma vez que foi possível comprovar que o maior tamanho de partículas detectada pela técnica de NTA foi de 454,6nm.

Ressalta-se que este é um comportamento esperado, e não se tem conhecimento sobre uma possível interação entre *bubbles* e as substâncias ativas. Alguns estudos apresentaram a

eficiência das *bubbles* na entrega das substâncias terapêuticas, como em aplicações na retina e tumores (LIU; MIYOSHI; NAKAMURA, 2006; THAKUR et al., 2017). Nesses casos, atentou-se para o fato que a substância ativa ciprofloxacina foi inserida na síntese das *bubbles*, ou seja, foi aprisionada junto com o gás no núcleo das bolhas. A patente das *bubbles* referencia o uso tópico destas (PAREKH; THAKUR, 2018), mas não apresenta dados sobre a efetividade das mesmas.

6. Conclusão

A avaliação dos aspectos físicos químicos indicou que as *bubbles* trabalhadas neste estudo possuem tamanho inferior em comparação às informações obtidas do lote de origem, ou seja, características avaliadas até 56 dias após a produção do lote. Em contrapartida, as características de morfologia e ecogenicidade foram mantidas. Aspectos microbiológicos também foram avaliados, indicando não haver contaminação por microorganismos. Uma avaliação breve realizada com uma mistura de *bubbles* e cafeína sugerem que existe uma interação entre elas, uma vez que o tamanho das *bubbles* nessa mistura foi ainda menor, e a concentração delas na suspensão também foi superior.

O estudo do comportamento da permeação e retenção cutânea do complexo *bubble*+cafeína+ultrassom apresenta originalidade, entretanto os resultados para o ensaio de permeação *in vitro* indicaram que as *bubbles* e o ultrassom não proporcionaram diferença estatística que pudesse caracterizar que esse conjunto *seja* efetivo como promotor de permeação da cafeína, entretanto sugere-se que a possível efetividade das *bubbles* esteja relacionada às características de solubilidade da cafeína, e poderia ser maior caso o fármaco estudado possuísse característica lipofílica.

Conclusão Geral

Constatou-se neste estudo que as *bubbles* são seguras, mesmo quando associadas a cafeína e ao ultrassom. Os dados preliminares obtidos com base na utilização de modelos de culturas celulares de fibroblastos murinos e queratinócitos indicam os produtos são seguros aplicação tópica, e que os estudos *in vivo* podem seguir. Os resultados obtidos neste estudo com relação à cafeína corroboram pesquisas anteriores, uma vez que todas elas evidenciam que essa substância é segura para aplicação tópica. Os dados com relação a aplicação das *bubbles* tornam-se relevantes, uma vez que as referências da aplicação destas para uso tópico são escassas ou inexistentes. Levando em consideração a importância da cafeína na possibilidade de reduzir e melhorar o aspecto da celulite, e pelas características intrínsecas da matéria prima que dificulta a permeação na pele, e do potencial que a associação com as *bubbles* e ultrassom podem proporcionar, fica evidente o desejo de que os estudos sejam continuados.

Referências

- ABREU, C. L. D. C. **Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3t3**. 2008. 54 2008. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>>.
- ABREU, C. L. do C.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Metodologias Alternativas à Experimentação Animal : Aplicação no Controle da Qualidade de Produtos sujeitos à Ação da. **Revista CFMV**, v. 45, p. 15–23, 2008.
- ADDOR, F. A. S.; AOKI, V. Barreira cutânea na dermatite atópica Skin barrier in atopic dermatitis. **Anal Brasileiro de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 184–194, 2010.
- AESCHBACHER, H. U.; MEIER, H.; JACCAUD, E. The effect of caffeine in the *in vivo* SCE and micronucleus mutagenicity tests. **Mutation research**, v. 174, p. 53–58, 1 jun. 1986.
- ANVISA. **Parecer Técnico nº 1, de 29 de janeiro de 2002. Utilização de metilxantinas em preparações cosméticas**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107901/Parecer+Técnico+nº+1+de+2002/faa1d486-5bc5-44de-b1b1-2eadd540fda4>>. Acesso em: 2 maio. 2018.
- ANVISA, A. N. de V. S. Descrição dos meios de Cultura Empregados nos exames Microbiológicos. In: **Anvisa**. [s.l: s.n.]p. <http://www.anvisa.gov.br/servicossaude/manuaia/mic>.
- AULTON, M. E. **Aulton Delineamento de Formas Farmacêuticas**. [s.l.] Elsevier Editora Ltda., 2016.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxic and morphological effects of phenylpropanolamine, caffeine, nicotine, and some of their metabolites studied *In vitro*. **Toxicology in vitro**, v. 6, n. 6, p. 493–502, 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0887233392900605>>.
- BABY, A. R. **Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. 2007. Universidade de São Paulo, 2007.
- BARCAUI, E.; CARVALHO, A. C. P.; PIÑEIRO-MACEIRA, J.; BARCAUI, C. B. Ultrassonografia de alta frequência (22MHz) na avaliação de neoplasias cutâneas malignas. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 6, 2014.
- BD (Becton Dickinson GmbH), **Instruções de utilização – meios em placas prontos a usar**. 2013. Disponível em <http://www.bd.com>, acesso em 28 fev. 2019
- BLAGOEVA, P. M.; BALANSKY, R. M.; MIRCHEVA, T. J. Potentiation by caffeine of the frequencies of micronuclei induced by mitomycin C and cyclophosphamide in young mice.

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 246, n. 1, p. 123–127, 1991.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Short-term quantitative *in vitro* cytotoxicity assay involving an S-9 activating system. **Cancer Letters**, v. 34, n. 3, p. 243–248, 1987. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030438358790173X>>.

BOUCAUD, A.; MACHET, L.; ARBEILLE, B.; MACHET, M. C.; SOURNAC, M.; MAVON, A.; PATAT, F.; VAILLANT, L. *In vitro* study of low-frequency ultrasound-enhanced transdermal transport of fentanyl and caffeine across human and hairless rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 69–77, 2001.

CAMPOS, P. M. B. G. M.; MERCÚRIO, D. G. Farmacologia e a Pele. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, n. Edição Especial Dermatologia, p. 15–21, 2009.

CARVALHO, M. B. de; RAMIREZ, A.; GILKA JORGE F, G.; ANDRÉ LUZ, G.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; NETO JOSÉ CARLOS, B.; CURIONI, O. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, 1 dez. 2002.

CHRISTENSEN, M. S. A succesful topical therapy for cellulite. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 6, p. 349–353, 2014.

COLIPA; ECVAM. 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Phototoxicity Assay DB-ALM Protocol INVITTOX n ° 78. **ECVAM DB-ALM: Protocols**, p. 1–19, 2008.

COURAGE-KHAZAKA, E. G. **Manual Sonda Tewameter TM**. Tecnotests Produtos e Serviços Ltda, , 2009. . Disponível em: https://cosmeticsonline.com.br/produtos/arquivos/A38_manual_mpa5_port_tewameter_18-03-09.pdf. Acesso em 28 fev. 2019.

ESTEVES-PEDRO, N.; RODAS, A. C. .; DAL BELO, C.; OSHIMA-FRANCO, Y.; SANTOS, M.; LOPES, P. Implementation of the Three Rs in the Human Hazard Assessment of Brazilian Medicinal Plants: An Evaluation of the Cytotoxic and Genotoxic Potentials of *Dipteryx alata* Vogel. **Alternatives to laboratory animals : ATLA**, v. 39, p. 189–196, 1 maio 2011.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084, 3 maio 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>>.

FERNANDES, EDER DE MENEZES; DAMASCENO, G. A. de B.; FERRARI, M.; AZEVEDO, E. P. de. Incremento na dissolução da caffeine em base de ammonium acryloyldimethyltaurate/vp copolymer: desenvolvimento farmacotécnico de géis anti-celulite.

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 36, n. 1, p. 69–75, 2015.

FERNÁNDEZ, M. J.; LÓPEZ, A.; SANTA-MARIA, A. Apoptosis induced by different doses of caffeine on Chinese hamster ovary cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 23, n. 4, p. 221–224, 1 jul. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jat.910>>. Acesso em: 3 maio. 2018.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells. A Manual of basic technique and specialized applications**. 6th ed ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2010.

GAJEWSKA, M.; PAINI, A.; BENITO, J. V. S.; BURTON, J.; WORTH, A.; URANI, C.; BRIESEN, H. *In vitro* -to- *in vivo* correlation of the skin penetration , liver clearance and hepatotoxicity of caffeine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 75, p. 39–49, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.10.017>>.

GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Novedades en fotoprotección. **Actas Dermo-Sifiliograficas**, v. 101, n. 8, p. 659–672, 2010.

ICCVAM. *In vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Test. **ICCVAM Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods**, v. NIH n° 07-, n. Research Triangle Park: National Toxicology Program, 2006.

ISHIDATE, M.; HARNOIS, M. C.; SOFUNI, T. A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 195, n. 2, p. 151–213, 1988. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165111088900231>>.

KERZENDORFER, C.; O'DRISCOLL, M. UVB and caffeine: Inhibiting the DNA damage response to protect against the adverse effects of UVB. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 7, p. 1611–1613, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2009.99>>.

KIRKLAND, D. Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 702, n. 2, p. 135–138, 29 out. 2010.

KLIBANOV, A. Ultrasound contrast agents: Development of the field and current status. **Top Curr Chem**, v. 222, p. 73–106, 2002.

KNOP, L. B.; MARIA, D. A. MÉTODOS SUBSTITUTIVOS E A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL : UM ENFOQUE INOVADOR. **resbcal**, v. 4, n. 2, p. 101–104, 2016.

LATTIN, J. R.; PITT, W. G. Factors Affecting Ultrasonic Release from eLiposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 4, p. 1373–1384, 2015.

LEITE-SILVA, V. R.; DE ALMEIDA, M. M.; FRADIN, A.; GRICE, J. E.; ROBERTS, M. S. Delivery of drugs applied topically to the skin. **Expert Rev. Dermatol**, v. 7, n. 4, p. 383–397, 2012.

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia aplicada**. 2^a ed ed. São Paulo: Medfarma, 2004.

LIU, Y.; MIYOSHI, H.; NAKAMURA, M. Encapsulated ultrasound microbubbles : Therapeutic application in drug / gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 89–99, 2006.

LU, Y.-P.; NOLAN, B.; LOU, Y.-R.; PENG, Q.-Y.; WAGNER, G. C.; CONNEY, A. H. Voluntary exercise together with oral caffeine markedly stimulates UVB light-induced apoptosis and decreases tissue fat in SKH-1 mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 31, p. 12936–41, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1937570&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LUO, L.; LANE, M. E. Topical and transdermal delivery of caffeine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1–2, p. 155–164, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.050>>.

MANUAL JOHARI, Instructions Ultrasound digital Jus-2, 2014.

MARGOLIN, H.; RESNICK, A.; RIMPO, Y.; ARCHER, P.; GALLOWAY, M.; BLOOM, D.; ZEIGER, E. Statistical analyses for *in vitro* cytogenetic assay using Chinese hamster ovary cells. **Environmental mutagenesis**, v. 8, p. 183–204, 1 jan. 1986.

MARIA, Carlos A. B. de; MOREIRA, Ricardo F. A. Cafeína: Revisão sobre Métodos de Análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

MARTINS, M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33–54, 2002.

MATHIJSSEN, R. H. J.; SPARREBOOM, A.; VERWEIJ, J. Determining the optimal dose in the development of anticancer agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 11, p. 272, 25 mar. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.40>>.

MITRAGOTRI, S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 255, 1 mar. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrd1662>>.

MITRAGOTRI S., B. D. L. R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis.

Therapeutic nano/micro technology, v. III, p. 224–236, 2006. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029918482&partnerID=40&md5=22eb1560c188014a2170aec03058bbd1>>.

MO, C.; WANG, J.; FANG, Z.; ZHOU, L.-M.; ZHANG, L.-J.; HU, J. Formation and stability of ultrasonic generated bulk nanobubbles. **Chinese Physics B**, v. 27, n. 11, 2018.

MORISON, W. L.; MCAULIFFE, D. J.; PARRISH, J. A.; BLOCH, K. J. *In vitro* assay for phototoxic chemicals. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 6, p. 460–463, 1982. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12510144>>.

NETZLAFF, F.; KOSTKA, K.-H.; LEHR, C.-M.; SCHAEFER, U. F. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells *in vitro*. Limitations shown by transport data testing. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 1, p. 44–50, 1 maio 2006.

NIELSEN, J. B.; SORENSEN, J. A.; NIELSEN, F. The Usual Suspects — Influence of Physicochemical Properties on Lag Time , Skin Deposition , and Percutaneous Penetration of Nine Model Compounds. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 72, n. Part A, p. 315–323, 2009.

OCAMPO, I. Z.; DE QUEIROZ SOUZA PASSOS, P.; RAMIREZ DE CARVALHO, L.; LIRA DA CRUZ, C. A.; ESTEVES-PEDRO, N. M.; MEDEIROS DA SILVA, F.; HIGA, O. Z.; DIAS, L. A. P.; OKAZAKI, K.; VIEIRA, D. P. *In vitro* cytotoxic and genotoxic evaluation of peptides used in nuclear medicine (DOTATATE and Ubiquicidin29-41) in CHO-K1 cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2301–2310, 29 dez. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10616-016-0024-9>>. Acesso em: 13 jan. 2019.

OECD 129. OECD Guidance document on using cytotoxicity test to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. n. 129. **OECD. Organization for Economic Co-operation and Development**, n. jun, p. 1–16, 2010. Disponível em: <[http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=en/jm/mono\(2010\)46&dclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=en/jm/mono(2010)46&dclanguage=en)>.

OECD 286. Guidance Document on Good *In vitro* Method Practices (GIVIMP). **OECD Series on Testing and Assessment**, p. <https://doi.org/10.1787/9789264304796-en>, 2018.

OECD 428. OECD Guideline for the testing of chemicals. Skin absorption: *in vitro* method, n. 428. **OECD. Organization for Economic Co-operation and Development**, n. April, p. 1–8, 2004.

OECD 432. *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. n. 432. **OECD. Organization for**

Economic Co-operation and Development, n. April, p. 1–15, 2004. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-432-in-vitro-3t3-nru-phototoxicity-test_9789264071162-en>.

OECD 487. OECD TG487 - In-vitro mammalian cell micronucleus test. **Organisation for Economic Co-operation and Development publishing**, n. September, p. 1–26, 2016.

OGAWA, I.; FURUKAWA, S.; ABE, M.; TANAKA, Y.; HAYASHI, S.; USUDA, K. Multi-endpoint genotoxic assay using L5178Y (Tk+/- -3.7.2c) cells. **The Journal of toxicological sciences**, v. 34, p. 547–553, 1 out. 2009.

OJEH, N.; STOJADINOVIC, O.; PASTAR, I.; SAWAYA, A.; YIN, N.; TOMIC-CANIC, M. The effects of caffeine on wound healing. **International Wound Journal**, v. 13, n. 5, p. 605–613, out. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25041108>>. Acesso em: 3 fev. 2019.

PAUL, S.; NAHIRE, R.; MALLIK, S.; SARKAR, K. Encapsulated microbubbles and echogenic liposomes for contrast ultrasound imaging and targeted drug delivery.

Computational mechanics, v. 53, n. 3, p. 413–435, mar. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26097272>>.

PILLONI, M.; ENNAS, G.; CASU, M.; FADDA, A. M.; FRONGIA, F.; MARONGIU, F.; SANNA, R.; SCANO, A.; VALENTI, D.; SINICO, C. Drug silica nanocomposite: preparation, characterization and skin permeation studies. **Pharmaceutical development and technology**, v. 18, n. 3, p. 626–33, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22324371>>.

RAMALHO, A. T.; CURVELO, S. Substâncias cosmetologicamente ativas, caracterização, indicação, eficácia e segurança: cafeína. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, v. 3, n. 2, p. 183–190, 2006. Disponível em: <http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/449/cbf1_06.pdf?sequence=1>. Acesso em: 2 maio. 2018.

RODAS, A. C. D.; HIGA, O.; MAIZATO, M.; LEIRNER, A.; PITOMBO, R. N. M. Genotoxicity and Cytotoxicity of bovine pericardium treated with glutaraldehyde and preserved in formaldehyde. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, v. 17^a, p. 7915–7923, 2006.

SALVADORI, D. M. .; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. E.; MARQUES, E. (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas-RS: Editora da Ulbra, 2003. p. 201–219.

SAWAMURA, A. M. S.; FRANCO, S. L. Sistemas terapêuticos transdérmicos. **Arq.Apadec**, v. 8, n. 1, p. 40–47, 2004.

SCHREIBER, S.; MAHMOUD, A.; VUIA, A.; RÜBBELKE, M. K.; SCHMIDT, E.; SCHALLER, M.; KANDÁROVÁ, H.; HABERLAND, A.; SCHÄFER, U. F.; BOCK, U.; KORTING, H. C.; LIEBSCH, M.; SCHÄFER-KORTING, M. Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. **Toxicology in vitro**, v. 19, n. 6, p. 813–822, 2005.

SIVAK, A.; RUDENKO, L.; TEAGUE, L. G. Variations Among Species and Cell Types in the Effects of Caffeine on Mutagen- Induced Cytotoxicity and Postreplication Repair of DNA. v. 162, p. 143–162, 1982.

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 43 Suppl, n. March, p. S11-7, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388845>>.

SPIELMANN, H.; BALLS, M.; DUPUIS, J.; PAPE, W. J.; PECHOVITCH, G.; DE SILVA, O.; HOLZHÜTTER, H. G.; CLOTHIER, R.; DESOLLE, P.; GERBERICK, F.; LIEBSCH, M.; LOVELL, W. W.; MAURER, T.; PFANNENBECKER, U.; POTTHAST, J. M.; CSATO, M.; SLADOWSKI, D.; STEILING, W.; BRANTOM, P. The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: Results of phase II (blind trial). Part 1: The 3T3 NRU phototoxicity test. **Toxicology in vitro**, v. 12, n. 3, p. 305–327, 1998.

SPIELMANN, H.; LOVELL, W. W.; HOLZLE, E.; JOHNSON, B. E.; MAURER, T.; MIRANDA, M. A.; PAPE, W. J. W.; SAPORA, O.; SLADOWSKI, D. *In vitro* Phototoxicity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 2. **ATLA**, v. 22, p. 314–348, 1994.

THAKUR, S. S.; WARD, M. S.; POPAT, A.; FLEMMING, N. B.; PARAT, M. O.; BARNETT, N. L.; PAREKH, H. S. Stably engineered nanobubbles and ultrasound - An effective platform for enhanced macromolecular delivery to representative cells of the retina. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–17, 2017.

THE EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. Guidelines for Percutaneous Absorption / Penetration. In: **Anais...**1997.

TODARO, G. J.; GREEN, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 6, p. 299–313, 1963.

TRAUER, S.; PATZELT, A.; OTBERG, N.; KNORR, F.; ROZYCKI, C.; BALIZS, G.; BÜTTEMEYER, R.; LINSCHIED, M.; LIEBSCH, M.; LADEMANN, J. Permeation of topically applied caffeine through human skin – a comparison of *in vivo* and *in vitro* data. p. 181–186, 2009.

TSUANG, Y.-H.; SUN, J.-S.; CHEN, L.-T.; SUN, S. C.-K.; CHEN, S.-C. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 1, p. 7, 7 out. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17150127>>.

TURÁNEK, J.; MILLER, A. D.; KAUEROVÁ, Z.; LUKÁČ, R.; MAŠEK, J.; KOUDELKA, Š.; RAŠKA, M. Lipid-Based Nanoparticles and Microbubbles – Multifunctional Lipid-Based Biocompatible Particles for *in vivo* Imaging and Theranostics. In: **Advances in Bioengineering**. [s.l.] IntechOpen, 2015a.

TURÁNEK, T.; MILLER, A.; KAUEROVÁ, Z.; LUKÁČ, R.; MAŠEK, J.; KOUDELKA, Š.; RAŠKA, M. Lipid-based Nanoparticles and Microbubbles - Multifunctional lipid-based biocompatible particles for *in vivo* imaging and theranostic. In: **Advances in Bioengineering**. Rijeka: IntechOpen, 2015b. p. ch. 4.

UEDA, H.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Skin penetration-enhancing effect of drugs by phonophoresis. **Journal of Controlled Release**, v. 37, n. 3, p. 291–297, dez. 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168365995000879>>. Acesso em: 3 maio. 2018.

UEDA, T.; F ZHAI, H.; REN, F.; NODA, N.-A.; SANO, Y.; TAKASE, Y.; YONEZAWA, Y.; TANAKA, H. Design and performance of honeycomb structure for nanobubbles generating apparatus having different cell dimensions. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 372, p. 12018, 2018.

VASCONCELLOS, F.L.L. Crio Laser Forese utilizado como método biofísico na promoção da penetração cutânea da cafeína. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2017.

VELASCO, M. V. R.; TANO, C. T. N.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; CONSIGLIERI, V. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Effects of caffeine and siloxanetriol alginate caffeine, as anticellulite agents, on fatty tissue: Histological evaluation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 1, p. 23–29, 2008.

XING, Z.; WANG, J.; KE, H.; ZHAO, B.; YUE, X. The fabrication of novel nanobubble ultrasound contrast agent for potential tumor imaging. **Nanotechnology**, v. 145607, n. 21,

2010.

ZHENG, H.; DAYTON, P. A.; CASKEY, C.; ZHAO, S.; QIN, S. FERRARA, K. W.

Ultrasound-driven microbubble oscillation and translation within small phantom vessels.

Ultrasound in Medicine & Biology, v. 33, n. 12, p. 1978–1987, 2007.

Anexos

Anexo 1: certificado de análise do fornecedor da cafeína



Certificado de Análise

Produto: Cafeína Anidra	P.M: 194,19
Fórmula Molecular: $C_8H_{10}N_4O_2$	Lote Interno: 30356
Lote Original: CA201609032	Data Val: 31/08/2020
Data Fab: 17/09/2016	Procedência: Brasil
Origem: China	DCB: 01642
Fabricante: Jilin Ghulan	CAG: 58-08-2
Data de Emissão: 15/08/2017	

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Aparência	Cristais ou pó cristalino branco a quase branco	De acordo
Solubilidade	Ligeiramente solúvel em água, livremente solúvel em água quente, pouco solúvel em etanol 96%. Dissolve-se em soluções concentradas de benzoatos ou salicilatos alcalinos	De acordo
Identificação	A- Ponto de Fusão: 234°C a 239°C B- IR – Conforme o padrão C- O precipitado dissolve D- Desenvolve uma coloração azul intensa E- Reação de Xantinas - Positiva	237,4°C De acordo De acordo De acordo De acordo
Perda por Secagem	Máximo 0,5%	0,10%
Aparência da Solução	Clara e incolor	De acordo
Acidez	< 0,2 mL de NaOH 0,01M	< 0,2mL
Substâncias Relatadas	Impurezas não especificadas – Máximo 0,10% Impurezas totais – Máximo 0,1% Limite de desrespeito – Máximo 0,05%	Não detectado Não detectado Não detectado
Sulfatos	Máximo 500 ppm	< 500ppm
Metais Pesados	Máximo 20 ppm	< 20ppm
Cinzas Sulfatadas	Máximo 0,1%	0,06%
Teor (Base Anidra)	98,5% - 101,5%	100,23%
Substâncias facilmente carbonizáveis ^{1,2}	Não mais intensa que solução Fluid D	De acordo
Outros Alcaloides ^{1,2}	Nenhum precipitado é formado	De acordo
Solventes Residuais ^{1,2}	Triclorometano – Máximo 60 ppm	Não detectado
Impurezas orgânicas ^{1,2}	Máximo 0,1%	Não detectado

Referência: BP2015 / Teste adicional do fabricante¹
Metodologia: BP2015 / USP38² / Metodologia do Fabricante³

Conservação: Conservar em recipiente hermético protegido de umidade, ao abrigo de luz e calor.
Controle da Temperatura: 15 a 30°C. Controle da Umidade: Não mais que 70%.

Classificação: Farmacêutico

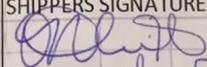
Conclusão: Todos os resultados estão dentro das especificações.

OBS.: Análise Interna
Certificado original se encontra à disposição de nossos clientes.

Resultados: (X) Aprovado

Dra. Amanda Dias Garrido
CRF – SP 62927
Supervisora do Controle de Qualidade

Anexo 2: documento de envio da suspensão de *bubble* da Austrália

QUANTITY		DESCRIPTION OF GOODS	UNIT VALUE	TOTAL
5		liposome products for research testing - NOT FOR HUMAN APPLICATION	1 \$	5 \$
Total value for custom purpose only in USD				
CERTIFIED TRUE & CORRECT				
COUNTRY OF ORIGIN		SHIPPER'S SIGNATURE & TITLE		
AUSTRALIA		 Senior research Fellow The University of Queensland		

 THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND AUSTRALIA		<h2>PRO FORMA</h2>
DATE: 27/04/18		
SHIPPER:	CONSIGNEE:	
Vânia Rodrigues Leite e Silva	Carolina Fioni UNIFESP - DIADEMA	

Anexo 3: Parecer Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da segurança in vitro de formulação tópica contendo "bubbles" de cafeína

Pesquisador: CAROLINA ANDREA LEIVA DALGIN FIORE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 69000717.1.0000.5505

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.179.344

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 19 de Julho de 2017

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

Anexo 4: Termo de consentimento Livre Esclarecido



Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP DIADEMA Termo de Consentimento Livre Esclarecido

O(a) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa "Avaliação da segurança in vitro de formulação tópica contendo "bubbles" de cafeína" através da doação da pele excedente de procedimento cirúrgico. Esta pele será utilizada em ensaios in vitro para avaliar a segurança do uso de formulação contendo "bubbles" de cafeína aplicada via tópica, veiculada em gel e estimuladas pelo uso de ultrassom como método físico para aumentar a permeação cutânea.

A doação da pele para este estudo será de suma importância para obter resultados que ainda não foram avaliadas no meio científico. Esta pele será preparada para ser submetida à técnicas para obtenção de células isoladas, como os queratinócitos. O projeto poderá gerar resultados significativos, que tornará viável ou não o uso dessas substâncias em produtos para uso tópico.

Para participar deste estudo o(a) Sr.(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. O Sr.(a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade.

Este projeto de mestrado está sob a responsabilidade da aluna de pós-graduação Carolina Andrea Leiva Dalsin Fiore do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo, sob a coordenação da Profa. Dra. Patrícia Santos Lopes do Instituto de Ciências Químicas, Ambientais e Farmacêuticas, Departamento de Ciências Exatas e da Terra da Universidade Federal de São Paulo campus Diadema e co-orientação da Profa. Dra. Vânia Rodrigues Leite e Silva.

Como pesquisadora responsável, me comprometo a tornar público nos meios acadêmicos e científicos os resultados obtidos de forma consolidada sem qualquer identificação de indivíduos (ou instituições) participantes. Todos os dados obtidos a seu respeito, assim como qualquer material coletado, só serão utilizados neste estudo.

Caso você concorde em participar desta pesquisa, assine ao final deste documento, que possui duas vias, sendo uma delas sua, e a outra, do pesquisador responsável/coordenador da pesquisa. Seguem os telefones e o endereço institucional

do pesquisador responsável e do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP, nos quais você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação nele, agora ou a qualquer momento.

Contato do pesquisador responsável: Rua São Nicolau, 210, Centro, Diadema – Prédio de Pesquisa, 4º andar Laboratório de Cultura Celular, no Telefone 55 11 4044-0500 ramal 3594.

Contato do comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Unifesp – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: oepunifesp@unifesp.br.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa "Avaliação da segurança in vitro de formulação tópica contendo "bubbles" de cafeína", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar através da doação de pele excedente da minha cirurgia. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Diadema, _____ de _____ de 2017.

Nome completo (participante)

Data

Nome completo (pesquisador responsável)

Data

Anexo 5: aprovação qualificação



Universidade Federal de São Paulo
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



RESULTADO DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

NOME DO(A) ALUNO(A): CAROLINA ANDREA LEIVA DALSIN FIORE.

DATA DO EXAME: 17/05/2018.

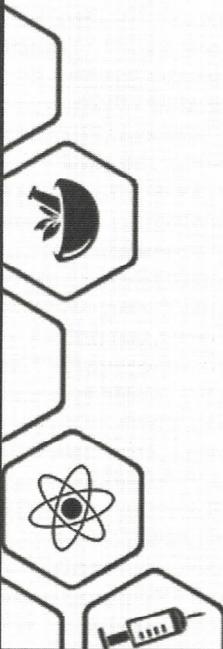
BANCA EXAMINADORA: PROFS. DRS.

NOME	ASSINATURA	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Newton Andréo Filho		X	
Andrea Cecília Dorion Rodas		X	
Patricia Santos Lopes(orientador)		X	

DECISÃO FINAL: APROVADA (X) REPROVADA ()

Comentários da Qualificação (opcional)

A aluna ainda tem tempo suficiente para o
término dos experimentos.



I SCI - FARMA

Simpósio em Ciências Farmacêuticas da UNIFESP Diadema

CERTIFICADO

Declaramos que o trabalho intitulado "Avaliação da qualidade sanitária da água purificada produzida e utilizada em farmácias de manipulação e indústria cosmética", de autoria de Fiore, C.A.L.D.; Marcondes, E.; Lopes, P.S., foi apresentado na Sessão de Pôsteres do I Simpósio em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, no dia 10 de novembro de 2017.



Prof. Dra. Daniela Gonçalves Galasse Rando
Coordenador Responsável Técnico e Científico



Coordenação da Câmara de
Extensão e Cultura - DIADEMA



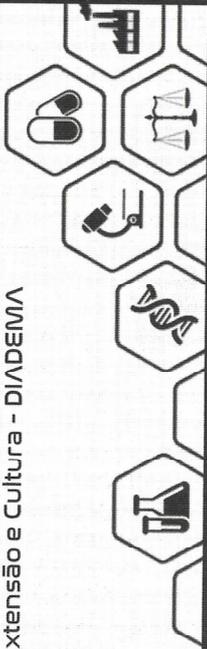
UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO



pharminder jr.



C.A.A.F.
Centro Acadêmico de Farmácia



Anexo 7: Participação no Congresso ABC – 2018, apresentação de pôster e Prêmio pela colocação em 2º lugar.

CERTIFICADO

A Comissão Científica certifica que o trabalho CIENTÍFICO E-POSTER, intitulado
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE BUBBLES DE CAFÉINA
recebeu o 2º LUGAR no 31º Congresso Brasileiro de Cosmetologia

Carolina Andrea Leiva Dalsin Fiore; Júlia Ernesto Vaz, Newton Andreo-Filho; Harendra Parekh, Vânia Rodrigues Leite-Silva; Patrícia Santos Lopes
abc ASSOCIAÇÃO COSMETOLOGIA
Universidade Federal de São Paulo
São Paulo, 24 de Maio de 2018.

31º Congresso Brasileiro de Cosmetologia
Desafios Tecnológicos e o Consumidor do Futuro
22 a 24 de MAIO - 2018
São Paulo Expo - São Paulo/SP

Tânia C. de Sá Dias
Coordenadora Geral
31º Congresso Brasileiro de Cosmetologia - Associação Brasileira de Cosmetologia

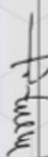
Vânia Leite
Presidente

Filiado à
IFSCC INTERNATIONAL FEDERATION OF SOCIETIES OF COSMETIC CHEMISTS
FELASCC Federação Brasileira de Associações de Cientistas Cosméticos

www.congressodecosmetologia.com.br

CERTIFICATE

We certify that the work **PHOTOTOXICITY EVALUATION OF CAFFEINE AND BUBBLES: ULTRASOUND AS A PERMEATION ENHANCER**, authorship of **CAROLINA ANDREA LEIVA DALSIN FIORE, VÂNIA RODRIGUES LEITE E SILVA, NEWTON ANDREO FILHO, PATRÍCIA SANTOS LOPES**, was presented as **POSTER PRESENTATION** at the IV Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences - Biological Drugs: From Technology to Pharmaceutical Care, held in São Paulo (SP), Brazil, from September 6 to 8, 2018.


Maria José Soares Mendes Giannini
President Congress


Teresa Dalla Costa
President ABCF



IV ABCF CONGRESS

ABCF - 2018
BRAZILIAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
Biological Drugs: from Technologies to Pharmaceutical Care
September 06 to 08, 2018
CENTRO FECOMERCO DE EVENTOS, SÃO PAULO, SP

III CONGRESO LATINOAMERICANO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AL USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN E INDUSTRIA

30-31/Oct y 01/Nov 2018

www.colama2018.com

Buenos Aires • Argentina

Reducir, Refinar y Reemplazar: nuestra responsabilidad y compromiso.

COLAMA 2018



Organizado por:



Certificamos que el trabajo
“Permeação em pele humana da cafeína associada às
“Bubbles” estimuladas pelo ultrassom.”
de los autores
Fiore C., Ueoka A.R., Leite-Silva V.R., Andreo-Filho N., Lopes P.S.
ha sido presentado en formato póster


PRESIDENTE AACYTAL
Dr. Ernesto Gullin


PRESIDENTE COMITÉ CIENTÍFICO III COLAMA
Dra. Adela Rosenkranz


PRESIDENTE COMITÉ ORGANIZADOR III COLAMA
Dr. Marcelo Asprea

Anexo 9: aceite para participar no Congresso Colamicq com apresentação de e-poster



COMUNICADO IMPORTANTE

Prezado Autor,

A Comissão Científica do 24º COLAMIQC tem a honra de informar que seu trabalho foi **APROVADO** para ser apresentado no referido evento na categoria **E-PÔSTER**.

[CLIQUE AQUI E CONFIRA A LISTA DE TRABALHOS APROVADOS](#)

Até 1 de abril 2019 o autor principal deverá:

• **Conforme o regulamento (III. TRABALHOS COMPLETOS), os autores/ apresentadores deverão enviar o trabalho pelo seguinte link:**

<https://bit.ly/2TsDIuv>

• Inscrever-se no congresso pelo link:

www.colamiqc2019.com.br/inscricoes

IMPORTANTE: Será cancelada a participação e publicação dos trabalhos completos enviados que estejam incompletos ou fora do prazo.