**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO**

CRISTINA MARA ZAMARIOLI

**Nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando curcuminoides
(NLS-CT): estudos *in vitro* e *in vivo***

**RIBEIRÃO PRETO
2018**

CRISTINA MARA ZAMARIOLI

**Nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando curcuminoides
(NLS-CT): estudos *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa Enfermagem Fundamental.

Área de concentração: Enfermagem Fundamental

Linha de Pesquisa: Fundamentação teórica, metodológica e tecnológica do processo de cuidar em enfermagem.

Orientadora: Emilia Campos de carvalho
Coorientador: Luis Alexandre Pedro de Freitas

**RIBEIRÃO PRETO
2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Zamarioli, Cristina Mara

Nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando curcuminoides (NLS-CT): estudos *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão

Preto, 2018. 202p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.

Orientador: Emilia Campos de Carvalho

Coorientador: Luis Alexandre Pedro de Freitas

1. curcuminoides. 2. nanopartículas lipídicas sólidas. 3. radiodermite. 4. enfermagem

ZAMARIOLI, Cristina Mara

Nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando curcuminoides (NLS-CT): estudos *in vitro* e *in vivo*.

Tese de Doutorado apresentada à Escola de
Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências,
Programa Enfermagem Fundamental.

Aprovado em: / /

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus, que com seus trabalhadores incansáveis, conspirou para a realização de uma pesquisa como esta, partindo de uma aparente “tábula rasa”.

À todos que poderão ser beneficiados pelo produto que está sendo desenvolvido, podendo ser um alívio nas vidas tão sofridas como as dos pacientes oncológicos.

Aos meus pais, que com muito empenho, amor e dedicação permitiram meu retorno ao lar e a minha permanência em tempos difíceis. Meu eterno amor e respeito. Sem vocês nada disto teria sido possível!!!!

Ao meu irmão querido e minha sobrinha tão minha. Família é a alma da gente se expressando através do outro. Muitos dias não pude compartilhar da presença de vocês. Só tenho que pedir desculpas por isso!

À enfermagem que, com muita garra, tem tentado melhorar a qualidade de vida dos pacientes contando, por vezes, com um arsenal pequeno numa guerra tão grande.

Ao grupo de pesquisa Enfermagem e Comunicação que tem se empenhado em pesquisar temas alternativos, com ousadia e dedicação.

À Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo que tem possibilitado um enorme avanço na produção do conhecimento para a Enfermagem enquanto ciência.

À Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por permitir este intercâmbio de conhecimento de forma tão generosa e acolhedora.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Professora Dra. Emilia Campos de Carvalho. Uma pessoa ímpar, com uma visão à frente e uma mente empreendedora. Uma pioneira na enfermagem em estudos com um elevado grau de complexidade. Rápida e iluminada que nunca cerceou minhas ideias e vôos. Sempre segura, objetiva, honesta e apaziguadora. Obrigada pelo crescimento individual, coletivo e acolhimento. Minha eterna admiração e respeito Mestre. Teve também muita paciência com minha teimosia e inquietação! Muito obrigada!!!!

Ao Professor Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas, uma pessoa adorável, com um espírito jovem e bem-humorado, que abriu as portas de seu laboratório simplesmente acreditando num sonho. Obrigada pelos seus ensinamentos, ponderações e paciência com as minhas limitações. Minha gratidão e respeito.

Aos meus amigos de longa data, que tiveram muita paciência com minha ausência e esquecimentos: Renata Karina Reis, Simone Yuriko Kameo, Aline Aparecida Monroe, Liliam dos Santos Naccor e Cristiane Bezerra de Menezes.

Aos meus amigos do Laboratório de Enfermagem e Comunicação: Aline, Ana Cláudia, Danielle, Francine, Vanessa, Cristiano, Bárbara, Talita, Natália, Adilson, Janaina, Sheila, Carol e Railka pela companhia, ombro amigo e contribuição para o meu crescimento durante este período.

À Rose, tão acolhedora e prestativa... Praticamente me levou pelas mãos durante este período. Esta Bá é um espetáculo!

Aos companheiros do Laboratório de Física Industrial e Processos Industriais Farmacêuticos: Cristiane, Tatiane, Thiago, Rayssa, Taty (Manaus) e Aurea pela ajuda imensurável para o desenvolvimento desta pesquisa. Tornaram-se meus amigos!

Aos técnicos de laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: em especial à Maria Perpétua e Patrícia pelas contribuições durante o desenvolvimento deste projeto e pelos inúmeros ensinamentos.

À generosa e sempre atenciosa professora Rose Mary Zumstein Georgetto Naal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Sua ajuda me fez pensar de forma diferente o modelo de ensino e acolhimento.

À professora Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto que me recebeu de portas abertas e com muita paciência, proporcionando a realização de grande parte deste projeto.

Aos técnicos de laboratório da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto: em especial ao Gustavo e ao Dimitrius. A ajuda deles foi essencial neste projeto!

À querida Dra. professora Elza Tiemi Skamoto do Laboratório de Genética da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Simplesmente me recebeu, acreditou no meu projeto e permitiu que seu laboratório fosse aberto para mim. Gratidão!

Aos amigos Paulo, Ana Paula e Júnior do Laboratório de Genética Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sempre disponíveis.

Ao Professor Dr. Harley Francisco de Oliveira da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela atenção, carinho e disponibilidade sempre. Possibilitou grandemente a realização deste projeto. Gratidão!

Aos queridos funcionários do setor de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Sem a ajuda de vocês tudo teria sido muito difícil.

Ao professor Dr. Thiago Mattar Cunha da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela ajuda numa etapa importante desta tese. Simplesmente me acolheu.

Ao Alexandre, que em uma época difícil de seu doutorado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, conseguiu um tempo para me ajudar. Muito obrigada!

Ao Marcelo Batalhão, técnico do Laboratório de Fisiologia da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Sua ajuda foi importantíssima quanto ao manejo dos animais, uma grande limitação minha.

Aos funcionários do setor de pós-graduação desta escola que sempre foram solícitos, me ajudando em momentos delicados.

Ao estatístico Jonas Boldini com sua preciosa lição e auxílio em várias etapas desta tese. Tenha certeza que aprendi demais. Muito obrigada!

À minha querida amiga Margareth Miyasaki por toda ajuda na fase final desta tese e sua companha amiga nestes anos todos!

Ao Programa de Enfermagem Fundamental, que foi fundamental nesta etapa da minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por fornecer recursos para minha formação e, conseqüentemente, para a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte no desenvolvimento desta pesquisa.

E agradeço a todos que por ventura não foram citados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

EPÍGRAFE

O que é o sucesso?

Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto de crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu.

Isto é ter sucesso!

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

ZAMARIOLI, C. M. **Nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando curcuminoides (NLS-CT): estudos *in vitro* e *in vivo***. 2018, 202f. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Objetivos: Etapa 1 - avaliar características organolépticas e físico-químicas de formulações tópicas contendo nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando curcuminoides; Etapa 2 - avaliar a citotoxicidade das nanopartículas lipídicas sólidas e dos curcuminoides encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas ou não em cultura de células de fibroblastos e queratinócitos com ou sem serem submetidos a RI; avaliar a atividade alergênica dos curcuminoides encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas ou não encapsulados; Etapa 3 - avaliar a toxicidade aguda de uma formulação contendo curcuminoides encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas na pele e em órgãos-alvo de camundongos BALB após 21 dias de aplicação tópica; induzir radiodermite em camundongos BALB; avaliar o efeito de formulações tópicas contendo curcuminoides encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas na prevenção e no tratamento de radiodermite, em camundongos BALB. **Método:** Etapa 1 - inspeção visual, cor, sensibilidade ao tato e odor, quantificação do pH, análise do comportamento reológico e quantificação de ativo (curcuminoides) das formulações; Etapa 2 – avaliação da viabilidade celular de queratinócitos, fibroblastos e mastócitos, quantificação da % de liberação da enzima β -hexosaminidase em mastócitos; Etapa 3 - avaliação do peso, consumo alimentar e comportamento dos animais; quantificação de marcadores sanguíneos de toxicidade renal (ureia e creatinina) e hepática (TGP, FA e proteínas totais); análises histológicas qualitativas do coração, fígado, rim, pulmão e pele; quantificação de colágeno na pele; analisar a probabilidade de desenvolvimento de radiodermite, em grupos independentes, após crescentes doses de radiação ionizante; quantificação de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, KC e FNT- α) avaliação do grau de radiodermite. **Resultados:** Etapa 1 – as formulações permaneceram estáveis por três meses, sem alteração de características organolépticas e físico-químicas; aos seis meses a formulação mais concentrada ficou mais opaca e observou-se aumento do pH e da perda de curcumina e curcuminoides totais; Etapa 2 - os resultados mostraram que as nanopartículas lipídicas sólidas são mais citotóxicas para os queratinócitos do que para os fibroblastos nas doses avaliadas, apesar de serem menos citotóxicas que os curcuminoides não encapsulados; não se observou diferença na viabilidade destas células sem ou após radiação ionizante (2 Gy); as nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcuminoides e os curcuminoides não encapsulados não estimularam a liberação de β -hexosaminidase em mastócitos, sugerindo que a formulação com nanopartículas não possui propriedades alergênicas. Etapa 3 – a formulação tópica contendo nanopartículas lipídicas sólidas com 30 mg de curcuminoides não conferiu toxicidade local e nem aos órgãos-alvo; os animais não apresentaram perda ponderal, alterações comportamentais ou mudanças na ingestão alimentar ou hídrica; foi possível a indução de radiodermite a partir de 25 Gy, sendo 30 Gy a que apresentou maior probabilidade de desenvolvimento; os animais não apresentaram perda ponderal, redução do consumo alimentar e hídrico significativos; o painel de citocinas avaliado evidenciou que a pele responde ao tratamento de forma diferente do controle da radiação; não foi observado infiltrado inflamatório; a quantificação do colágeno mostrou grande variabilidade. **Conclusões:** Devido a uma toxicidade mínima do sistema nanocarreador desenvolvido, somos encorajados a realizar testes futuros para aplicações clínicas em dermocosmética e na prevenção e tratamento de lesões cutâneas ou osteoarticulares.

Palavras-chave: curcuminoides; nanopartículas lipídicas sólidas; radiodermite; enfermagem.

ABSTRACT

ZAMARIOLI, C. M. **Solid lipid nanoparticles encapsulating curcuminoids (SLN-TC): in vitro and in vivo studies.** 2018, 202f. Thesis (Ph.D.) - Ribeirão Preto School of Nursing, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Aims: Step 1 – to evaluate organoleptic and physicochemical characteristics of topical formulations containing solid lipid nanoparticles encapsulating curcuminoids; Step 2 – to evaluate the cytotoxicity of solid lipid nanoparticles and curcuminoids encapsulated in solid lipid nanoparticles or not in culture of fibroblast and keratinocytes cells without and after being submitted to IR; to evaluate the allergenic activity of encapsulated curcuminoids in solid or non-encapsulated lipid nanoparticles; Step 3 – to evaluate the acute toxicity of a formulation containing encapsulated curcuminoids in solid lipid nanoparticles on the skin and target organs of BALB mice after 21 days of topical application; to induce radiodermatitis in BALB mice; to evaluate the effect of topical formulations containing encapsulated curcuminoids in solid lipid nanoparticles in the prevention and treatment of radiodermatitis in BALB mice. **Method:** Step 1 - visual inspection, color, sensitivity to touch and odor, pH quantification, rheological behavior analysis and quantification of active (curcuminoids) of the formulations; Step 2 - evaluation of the cellular viability of keratinocytes, fibroblasts and mast cells, quantification of the release % of β -hexosaminase enzyme in mast cells; Step 3 - evaluation of weight, food consumption and behavior of the animals, quantification of markers of renal toxicity (urea and creatinine) and hepatic (TGP, FA and total proteins), qualitative histological analysis of the skin, heart, liver, kidney and lung and quantitative analysis of collagen in the skin; analysis of the probability to developing radiodermatitis in independent groups after increasing doses of ionizing radiation; quantification of the cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, KC and TNF- α) and collagen, qualitative histological analysis of the skin, and the degree of radiodermatitis. **Results:** Step 1 - the formulations remained stable for three months, without alteration of organoleptic and physicochemical characteristics; at six months the more concentrated formulation became more opaque and there was an increase in pH and loss of curcumin and total curcuminoids; Step 2 - the results showed that solid lipid nanoparticles are more cytotoxic for keratinocytes than for fibroblasts at the doses evaluated, although they were less cytotoxic than non-encapsulated curcuminoids; no significant difference was observed in the viability of these cells without or after ionizing radiation (2 Gy); the solid lipid nanoparticles containing curcuminoids and non-encapsulated curcuminoids did not stimulated β -hexosaminidase release in mast cells, suggesting that the nanoparticle formulation does not have allergenic properties. Stage 3 - the topical formulation containing solid lipid nanoparticles with 30 mg curcuminoids did not confer local toxicity and nor to the target organs the animals did not showed any weight loss, behavioral changes or changes in food or water ingestion; the radiodermatitis induction was possible from 25 Gy, with the dose of 30 Gy being the most likely to develop; the animals had no significant weight loss, nor reduction in food and water ingestion, the cytokine panel evaluated showed that skin responds to treatment differently from radiation control, no inflammatory infiltrate was evident and the quantification of collagen showed great variability. **Conclusions:** Due to the minimal toxicity of the developed nanocarrier system, we are encouraged to perform future tests for clinical applications in dermocosmetic and in the prevention and treatment of cutaneous or osteoarticular lesions.

Keywords: curcuminoids; solid lipid nanoparticles; radiodermatitis; nursing.

RESUMEN

ZAMARIOLI, C. M. **Nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando curcuminoides (NLS-CT): estudios in vitro e in vivo**. 2018, 202f. Tesis (Doctorado) - Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto de la Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Objetivos: Paso 1: evaluar las características organolépticas y fisicoquímicas de formulaciones tópicas que contienen nanopartículas lipídicas sólidas que encapsulan curcuminoides; Paso 2: evaluar la citotoxicidad de nanopartículas lipídicas sólidas y curcuminoides encapsulados en nanopartículas lipídicas sólidas o no en cultivo de fibroblastos y células queratinocíticas sin y después de someterse a IR; para evaluar la actividad alergénica de curcuminoides encapsulados en nanopartículas lipídicas sólidas o no encapsuladas; Paso 3: evaluar la toxicidad aguda de una formulación que contiene curcuminoides encapsulados en nanopartículas lipídicas sólidas sobre la piel y los órganos diana de ratones BALB después de 21 días de aplicación tópica; inducir radiodermatitis en ratones BALB; evaluar el efecto de formulaciones tópicas que contienen curcuminoides encapsulados en nanopartículas lipídicas sólidas en la prevención y tratamiento de la radiodermatitis en ratones BALB. **Método:** Paso 1 - inspección visual del aspecto, color, sensibilidad al tacto y olor, cuantificación del pH, análisis del comportamiento reológico y cuantificación de activos (curcuminoides) mediante cromatografía líquida de alta resolución de las formulaciones; Paso 2 - evaluación de la viabilidad celular de queratinocitos, fibroblastos y mastocitos, cuantificación del % de liberación de la enzima β -hexosaminasa en mastócitos. Paso 3 - evaluación del peso, consumo de alimentos y comportamiento de los animales en los tres estudios además de la cuantificación de marcadores de toxicidad renal (urea y creatinina) y hepáticos (TGP, FA y proteínas totales), análisis histológico cualitativo de la piel, corazón, hígado, riñón y pulmón y análisis cuantitativo de colágeno en la piel en el estudio de toxicidad; análisis de la probabilidad de desarrollar radiodermatitis en grupos independientes después de dosis crecientes de radiación ionizante (6, 10, 15, 20, 25 y 30 Gy); cuantificación de las citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, KC y TNF- α) en la piel de los ratones mediante ELISA, análisis histológicos cualitativos de la piel, cuantificación de colágeno en la piel y grado de radiodermatitis en el estudio de dosis-respuesta. **Resultados:** Paso 1 - las formulaciones permanecieron estables durante tres meses, sin alteración de las características organolépticas y fisicoquímicas, a los seis meses la formulación más concentrada se volvió más opaca y hubo un aumento en el pH y la pérdida de curcumina y curcuminoides totales; Paso 2: los resultados mostraron que las nanopartículas sólidas de lípidos son más citotóxicas para los queratinocitos que para los fibroblastos a las dosis evaluadas, aunque eran menos citotóxicas que los curcuminoides no encapsulados, no se observaron diferencias significativas en la viabilidad de estas células sin o después de radiación ionizante (2 Gy), las nanopartículas lipídicas sólidas que contienen curcuminoides y curcuminoides no encapsulados no estimuló la liberación de β -hexosaminidasa en los mastocitos, lo que sugiere que la formulación de nanopartículas no tiene propiedades alergénicas. Etapa 3: la formulación tópica que contiene nanopartículas lipídicas sólidas con 30 mg de curcuminoides no confiere toxicidad local y ni a los órganos diana los animales no mostraron ninguna pérdida de peso, cambios de comportamiento o cambios en la ingestión de alimentos o agua después de 21 días; la inducción de radiodermatitis fue posible a partir de 25 Gy, siendo la dosis de 30 Gy la más propensa a desarrollarse, los animales no tuvieron una pérdida de peso significativa ni la ingestión de alimentos y agua, el panel de citocinas evaluó que la piel responde al tratamiento de forma diferente a control de la radiación, no se evidenció infiltrado inflamatorio y la cuantificación del colágeno mostró una gran variabilidad. **Conclusiones:** debido a la toxicidad mínima del sistema de nano vehículo desarrollado, se nos anima a realizar pruebas futuras para aplicaciones clínicas en dermocosmética y en la prevención y tratamiento de lesiones cutáneas o osteoarticulares.

Palabras clave: curcuminoides; nanopartículas sólidas lipídicas; radiodermatitis; enfermedad.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema do estudo de toxicidade.....	61
Figura 2 -	Ilustração em D0 do local de tricotomia para posterior aplicação da formulação.....	61
Figura 3 -	Processo de quantificação de colágeno pelo ImageJ	63
Figura 4 -	Fotografia do camundongo um (1) no D0, após anestesia e tricotomia para iniciar a radiação da pata posterior esquerda.....	68
Figura 5 -	Posicionamento dos camundongos para a administração da RI.....	69
Figura 6 -	Esquema do estudo piloto de indução de radiodermite	70
Figura 7 -	Esquema do estudo dose-resposta.....	74
Figura 8 -	Imagens dos 5 camundongos nos dias 0, 7, 14 e 21 para observação do local de aplicação da formulação.....	111
Figura 9 -	Fotomicrografias de cortes do coração dos animais dos grupos controle (C) e experimental (E1 a E5), após 21 dias de tratamento tópico com Gel contendo NLS – CT (30 mg). Ribeirão Preto, 2017.....	112
Figura 10 -	Fotomicrografias de cortes do fígado dos animais dos grupos controle (C) e experimental (E1 a E5), após 21 dias de tratamento tópico com Gel contendo NLS – CT (30 mg). Ribeirão Preto, 2017.....	113
Figura 11 -	Fotomicrografias de cortes de pulmão dos animais dos grupos controle (C) e experimental (E1 a E5), após 21 dias de tratamento tópico com Gel contendo NLS – CT (30 mg). Ribeirão Preto, 2017.....	114
Figura 12 -	Fotomicrografias de cortes do rim dos animais dos grupos controle (C) e experimental (E1 a E5), após 21 dias de tratamento tópico com Gel contendo NLS – CT (30 mg). Ribeirão Preto, 2017.....	114
Figura 13 -	Fotomicrografias da pele dos animais dos grupos controle (C) e experimental (E1 a E5), após 21 dias de tratamento tópico com Gel contendo NLS – CT (30 mg). Ribeirão Preto, 2017.....	115
Figura 14 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da pele dos camundongos nos diferentes grupos no D7 pós-irradiação com 30 Gy, em comparação com um controle da pele normal.....	143
Figura 15 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da pele dos camundongos nos diferentes grupos no D14 pós-irradiação com 30 Gy, em comparação com um controle da pele normal	145
Figura 16 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da pele dos camundongos nos diferentes grupos no D21 pós-irradiação com 30 Gy, em comparação com um controle da pele normal.....	146
Figura 17 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da pele dos camundongos nos diferentes grupos no D28 pós-irradiação com 30 Gy, em comparação com um controle da pele normal.....	147

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Sobreposição da densidade SEP2 sobre a distribuição das células HaCat	57
Gráfico 2 -	Sobreposição da densidade Weibull sobre a distribuição das células CCD	59
Gráfico 3 -	Sobreposição da densidade Beta sobre a distribuição de porcentagem de liberação de β -hexosaminidase pelos macrófagos.....	60
Gráfico 4 -	Sobreposição da densidade Logística (LO) sobre a distribuição do peso dos camundongos no estudo de toxicidade da formulação.....	64
Gráfico 5 -	Sobreposição da Densidade Beta (BE) sobre a distribuição da porcentagem de colágeno na pele dos camundongos no estudo de toxicidade da formulação.	66
Gráfico 6 -	Diagnóstico do Modelo Misto para a variável colágeno no estudo de toxicidade da formulação.....	67
Gráfico 7 -	Sobreposição da densidade distribuição Inversa Gamma (IGAMMA) sobre a distribuição dos pesos dos camundongos no estudo de indução de radiodermite.....	71
Gráfico 8 -	Diagnóstico do Modelo Misto para a variável peso (g) no estudo de indução de radiodermite.....	72
Gráfico 9 -	Sobreposição da densidade Weibull sobre a distribuição dos pesos dos camundongos no estudo dose-resposta.....	77
Gráfico 10 -	Diagnóstico do Modelo Misto para a variável peso (g) no estudo dose-reposta.....	78
Gráfico 11 -	Distribuição da variável IL-1 β ao longo do estudo	82
Gráfico 12 -	Distribuição da variável FNT - α ao longo do estudo	83
Gráfico 13 -	Distribuição da variável IL-6 ao longo do estudo	83
Gráfico 14 -	Distribuição da variável IL-10 ao longo do estudo	84
Gráfico 15 -	Distribuição da variável KC ao longo do estudo	84
Gráfico 16 -	Distribuição da porcentagem de colágeno ao longo do estudo	85
Gráfico 17 -	Variações médias de pH das formulações nos tempos pré-estabelecidos	88
Gráfico 18 -	Reogramas das formulações nos tempos 0, 3 e 6 meses, de 0 a 60 s, a 37°C	90
Gráfico 19 -	Reogramas das formulações nos tempos 0, 3 e 6 meses, de 0 a 300 s, a 37°C	91
Gráfico 20 -	Boxplots das células HaCat após os diferentes tratamentos (NLS, NLS-CT e CT), com e sem serem submetidas a 2 Gy de RI	94
Gráfico 21 -	Viabilidade celular de queratinócitos (HaCat) após os diferentes tratamentos	95

Gráfico 22 -	Boxplots das células CCD após os diferentes tratamentos, com e sem 2 Gy de RI	97
Gráfico 23 -	Viabilidade celular de fibroblastos (CCD) após diferentes tratamentos.....	98
Gráfico 24 -	Boxplots da porcentagem de liberação de β -hexosaminidase pelos mastócitos por grupo de tratamento e doses	100
Gráfico 25 -	Liberação de β hexosaminidase por mastócitos	102
Gráfico 26 -	Viabilidade celular de mastócitos tratados com CT	105
Gráfico 27 -	Boxplot da variável peso ao longo do estudo de toxicidade, por grupo e dia	106
Gráfico 28 -	Parâmetros renais e hepáticos dos camundongos, após 21 dias de experimento	110
Gráfico 29 -	Boxplots da variável peso, segundo dose de RI e dia de avaliação no estudo de indução de radiodermite	119
Gráfico 30 -	Efeito das doses de RI no desenvolvimento de radiodermite Grau 1, ao longo de 21 dias de observação	123
Gráfico 31 -	Efeito das doses de RI nos sinais de dor nos camundongos, por grupo de avaliação durante os 21 dias de observação	123
Gráfico 32 -	Boxplots da variável peso (g), segundo grupo de tratamento e dia de avaliação no estudo dose-resposta	125
Gráfico 33 -	Boxplot da IL-1 β por dia e grupo. Ribeirão Preto, 2017	129
Gráfico 34 -	Boxplot do TNF - α por dia e grupo. Ribeirão Preto, 2017	132
Gráfico 35 -	Boxplot da IL-6 por dia e grupo. Ribeirão Preto, 2017	135
Gráfico 36 -	Boxplot da IL-10 por dia e grupo. Ribeirão Preto, 2017	138
Gráfico 37 -	Boxplot para o KC por dia e grupo	140
Gráfico 38 -	Boxplots da porcentagem de colágeno nos diferentes grupos do estudo, nos intervalos de tempo avaliados	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Seleção de modelos para a análise de viabilidade celular dos queratinócitos (HaCaT). Ribeirão Preto, 2017	57
Tabela 2 -	Seleção de modelos para a análise de viabilidade celular dos fibroblastos (CCD). Ribeirão Preto, 2017	58
Tabela 3 -	Seleção de modelos para a análise do peso dos camundongos no estudo de toxicidade da formulação. Ribeirão Preto, 2017	64
Tabela 4 -	Seleção de modelos para a análise da % de colágeno na pele dos camundongos no estudo de toxicidade da formulação. Ribeirão Preto, 2017.....	65
Tabela 5 -	Seleção de modelos para a análise do peso dos camundongos no estudo de indução de radiodermite. Ribeirão Preto, 2017	71
Tabela 6 -	Seleção do modelo para o peso dos camundongos no estudo dose-resposta. Ribeirão Preto, 2017.....	77
Tabela 7 -	Valores referentes à viscosidade aparente, índice de fluxo e tixotropia, para as formulações estudadas no T0, T3 e T6, à 25 °C $\pm$ 3 °C / 75% $\pm$ 5 UR, nos distintos tempos de análise. Ribeirão Preto, 2016	89
Tabela 8 -	Concentração de curcumina e curcuminoides totais nas formulações, ao longo de seis meses de análise. Ribeirão Preto, 2016.....	92
Tabela 9 -	Análise de regressão para a linhagem HaCat, antes e após a RI, considerando média e dispersão dos valores obtidos. Modelo ajustado <i>Skew Exponential Power type 2 distribution</i> (SEP2). Ribeirão Preto, 2017.....	96
Tabela 10 -	Análise de regressão para a linhagem CCD, antes e após a RI, considerando média e dispersão dos valores obtidos. Modelo ajustado <i>Weibull distribution Third parameterization</i> (WEI3). Ribeirão Preto, 2017.....	99
Tabela 11 -	Dados descritivos do teste de inibição da liberação de β -hexosaminidase. Ribeirão Preto, 2017	101
Tabela 12 -	Análise de regressão da % de liberação da β -hexosaminidase, considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, segundo grupo e dose de tratamento. Ribeirão Preto, 2017.....	102
Tabela 13 -	Comparação entre a % de liberação da β -hexosaminidase pelos mastócitos em relação às diferentes doses de CT. Ribeirão Preto, 2017	103
Tabela 14 -	Dados descritivos do teste de viabilidade celular dos mastócitos após tratamento com CT por 24 h. Ribeirão Preto, 2017.....	104
Tabela 15 -	Comparações Múltiplas Dunn com correção de Bonferroni para as diferentes doses de CT utilizadas nos mastócitos. Ribeirão Preto, 2017.....	105

Tabela 16 -	Medidas relativas ao peso (g) dos camundongos dos grupos experimental (n=5) e controle no estudo de toxicidade (n=3). Ribeirão Preto, 2017.....	107
Tabela 17 -	Análise de efeitos mistos do peso, considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, segundo grupo e dia. Ribeirão Preto, 2017.....	107
Tabela 18 -	Média do consumo diário de água (mL) e de ração (g) nos grupos experimental (n=5) e controle (n=3) no estudo de toxicidade. Ribeirão Preto, 2017.....	108
Tabela 19 -	Marcadores sanguíneos para avaliar toxicidade renal e hepática da formulação de NLS-CT (n=8). Ribeirão Preto, 2017.....	109
Tabela 20 -	Medidas resumo do colágeno nos dois grupos (n= 36*). Ribeirão Preto, 2017.....	116
Tabela 21 -	Ajuste do modelo misto para a variável colágeno. Ribeirão Preto, 2017.....	117
Tabela 22 -	Medidas relativas ao peso avaliadas nos diferentes grupos de indução de radiodermite (n=25). Ribeirão preto, 2017.....	120
Tabela 23 -	Análise de regressão do peso considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, nos diferentes grupos e dias no estudo de indução de radiodermite. Ribeirão Preto, 2017.....	121
Tabela 24 -	Média do consumo de ração (g) e água (mL), por animal e por dose de RI (n=25). Ribeirão Preto, 2017.....	122
Tabela 25 -	Medidas relativas ao peso (g) dos camundongos nos diferentes grupos experimentais, por tempos estabelecidos. Ribeirão Preto, 2017.....	125
Tabela 26 -	Análise de modelo misto do peso dos animais no estudo dose-reposta. Ribeirão Preto, 2017.....	127
Tabela 27 -	Média de consumo de água (mL) e de ração (g), por grupo e tempo de avaliação. Ribeirão Preto, 2017.....	127
Tabela 28 -	Porcentagem de radiodermite por Grau nos diferentes grupos. Ribeirão Preto, 2017.....	128
Tabela 29 -	Medidas resumo da IL-1 β ao longo do estudo. Ribeirão Preto, 2017.....	130
Tabela 30 -	Análise de regressão da IL-1 β , considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, segundo dia e grupo de tratamento. Ribeirão Preto, 2017.....	131
Tabela 31 -	Medidas resumo do FNT – α ao longo do estudo. Ribeirão Preto, 2017.....	133
Tabela 32 -	Análise de regressão do FNT- α , considerando a média e da dispersão dos valores obtidos, segundo dia e grupo de tratamento. Ribeirão Preto, 2017.....	134
Tabela 33 -	Medidas resumo da IL-6 ao longo do estudo. Ribeirão Preto, 2017.....	136

Tabela 34 -	Análise de regressão da IL-6, considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, segundo dia e grupo de tratamento. Ribeirão Preto, 2017.....	136
Tabela 35 -	Medidas resumo da IL-10 ao longo do estudo. Ribeirão Preto, 2017.....	138
Tabela 36 -	Análise de regressão da IL-10, considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, segundo dia e grupo de tratamento. Ribeirão Preto, 2017	139
Tabela 37 -	Medidas resumo do KC ao longo do estudo. Ribeirão Preto, 2017	141
Tabela 38 -	Análise de regressão do KC, considerando a média dos valores obtidos, segundo dia e grupo de tratamento. Ribeirão Preto, 2017	142
Tabela 39 -	Medidas resumo relativas à porcentagem de colágeno na pele dos camundongos nos diferentes grupos. Ribeirão Preto, 2017	148
Tabela 40 -	Análise de regressão em relação à média e a dispersão da % de colágeno na pele dos camundongos. Ribeirão Preto, 2017.....	149

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Resumo do estudo de toxicidade	118
Quadro 2 -	Resumo do estudo de indução de radiodermite.....	124
Quadro 3 -	Resumo do estudo dose-resposta	150

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.	25
1.1. ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES	25
1.2. TOXICIDADE	27
1.3. CURCUMINOIDES	30
1.4. RADIAÇÃO IONIZANTE	33
1.5. RADIODERMITE	38
1.6. PROCESSO DE DANO E REPARO TECIDUAL	41
2. OBJETIVOS.	46
2.1. ETAPA 1: ESTUDOS DE ESTABILIDADE	46
2.2. ETAPA 2: ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	46
2.3. ETAPA 3: ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	47
3. MÉTODO.	49
3.1. ETAPA 1: ESTUDOS DE ESTABILIDADE	49
3.1.1. Avaliação organoléptica	50
3.1.2. Avaliação físico-química	50
3.1.2.1. pH	50
3.1.2.2. Comportamento reológico	51
3.1.2.3. Teor de ativo	51
3.2. ETAPA 2: ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	52
3.2.1. Linhagens celulares e cultivo	52
3.2.2. Ensaio de viabilidade celular com queratinócitos e fibroblastos	52
3.2.2.1. Ensaio de viabilidade celular com queratinócitos e fibroblastos após radiação ionizante	53
3.2.3. Ensaio direto – liberação de β -hexosaminidase	53
3.2.4. Ensaio de viabilidade celular com mastócitos	54
3.2.5. Análise estatística	55
3.3. ETAPA 3: ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	60
3.3.1. Toxicidade da formulação	61
3.3.1.1. Parâmetros sanguíneos	62
3.3.1.2. Análises histológicas	62
3.3.1.3. Análise estatística	63
3.3.2. Estudo de indução de radiodermite	67
3.3.2.1. Análise estatística	70
3.3.3. Estudo dose-resposta	73
3.3.3.1. Análises histológicas	75

3.3.3.2. Análise de citocinas.....	76
3.3.3.3. Análise estatística.....	77
3.4. ASPECTOS ÉTICOS.....	85
4. RESULTADOS.....	87
4.1. ETAPA 1: ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	87
4.1.1. Características organolépticas.....	87
4.1.2. Características físico-químicas.....	87
4.1.2.1. pH.....	88
4.1.2.2. Reologia.....	88
4.1.2.3. Teor de ativo.....	92
4.2. ETAPA 2: ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	93
4.2.1. Ensaio de viabilidade celular com queratinócitos e fibroblastos.....	93
4.2.2. Ensaio direto – liberação de β-hexosaminidase.....	100
4.3. ETAPA 3: ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	106
4.3.1. Estudo de toxicidade.....	106
4.3.2. Estudo de indução de radiodermite.....	119
4.3.3. Estudo dose-resposta.....	124
5. DISCUSSÃO.....	153
5.1. ETAPA 1: ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	153
5.2. ETAPA 2: ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	155
5.2.1. Viabilidade celular de queratinócitos e fibroblastos.....	155
5.2.2. Liberação de β-hexosaminidase e citotoxicidade em mastócitos.....	157
5.3. ETAPA 3: ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	158
5.3.1. Estudo de Toxicidade.....	158
5.3.2. Estudo de indução de radiodermite.....	161
5.3.3. Estudo dose-resposta.....	163
6. CONCLUSÕES.....	168
POTENCIALIDADES.....	172
REFERÊNCIAS.....	174
APÊNDICES.....	196
ANEXOS.....	201

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

A incidência de câncer no mundo pode ser influenciada pelas vulnerabilidades próprias do indivíduo, pelas condições sociais que favorecem o desenvolvimento de determinados tipos de neoplasias, bem como pelas características e recursos que relacionadas aos serviços de saúde; dentre as doenças e agravos não transmissíveis (DANT), representa a segunda causa de morte na população, cerca de 21% (INCA, 2017). A exposição a diferentes fatores concorre para o desenvolvimento das diferentes neoplasias, numa equação final ainda desconhecida, a despeito de sua incidência variar em função do desenvolvimento urbano e, consequente, da condição de vida da população.

No Brasil, este fato pode ser observado no número de tratamentos ambulatoriais e nas taxas de internações hospitalares, informações estas obtidas dos Registros Hospitalares de Câncer (RHC) e dos Registros de Câncer de Base Populacional (RBP), além da taxa de óbitos, disponíveis nos órgãos oficiais. São várias as frentes de trabalho e de pesquisa que demandam distintos recursos (além dos exclusivamente financeiros) que podem estar voltados para iniciativas de promoção da saúde, prevenção das neoplasias passíveis de prevenção, desenvolvimento e emprego de meios diagnósticos, implementação de diferentes tratamentos, reabilitação e para os cuidados paliativos.

Paralelamente a isto, observamos um aumento da preocupação com a qualidade de vida relacionada à saúde dos pacientes oncológicos, escopo de debates e inúmeras pesquisas. Na enfermagem, o reflexo desta mudança pode ser observado no ensino, na assistência, na gestão e também nas pesquisas.

Neste cenário, apesar dos avanços observados no tratamento do paciente com câncer, ainda nos deparamos com graus consideráveis de toxicidades locais ou sistêmicas a ele relacionadas. A radioterapia, uma das formas de tratamento empregadas, pode promover toxicidade locorregional que, segundo os radioterapeutas, tem diminuído nas últimas décadas, tanto em decorrência da modernização dos equipamentos quanto dos protocolos de tratamento.

O foco de interesse desta tese é a radiodermite, uma toxicidade cutânea que pode ocorrer tanto em protocolos exclusivos de radioterapia quanto em associação com a quimioterapia e que pode causar muito desconforto, dor e, às vezes, atraso no tratamento oncológico.

Permeando este cenário, temos o crescente incentivo para a incorporação de substâncias menos tóxicas e economicamente viáveis no processo de reparo tecidual, corroborando o também crescente interesse no uso de fitoterapia e fitofármacos. Pensando no potencial uso de fitofármacos para prevenção e tratamento da radiodermite aguda, pretendemos avaliar a

aplicabilidade de uma formulação tópica contendo curcuminoides. Trata-se de uma preocupação constante para a enfermagem oncológica e o fato de um produto estar sendo pensado, é algo relevante para a área.

Os curcuminoides, em particular a curcumina, possuem um potencial terapêutico largamente estudado ao longo das últimas décadas. São utilizados como corantes naturais e, uma possível pigmentação cutânea poderia representar um entrave à sua aplicação em formulações tópicas. Se presente, tal pigmentação poderia mascarar o eritema, uma das características cardinais de avaliação da radiodermite, além de interferir em questões estéticas e de autoestima. A alternativa então, para amenizar esta ocorrência, pode ser o seu encapsulamento que, além de reduzir tal entrave, também confere a propriedade de liberação mais prolongada dos curcuminoides.

Em etapa anterior, durante o mestrado, buscamos iniciar os procedimentos para o alcance de tal propósito. O sistema desenvolvido para encapsular estes curcuminoides foi a nanopartícula lipídica sólida (NLS) e, para esta finalidade, utilizamos o método da microemulsão, no Laboratório de Física Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Estas NLS com curcuminoides (NLS-CT) foram incorporadas numa base, na forma de gel, com o polímero hidroxietilcelulose (Natrosol®), comumente utilizado em formulações tópicas (ZAMARIOLI, 2014).

Em continuidade, considerando o potencial terapêutico dos curcuminoides na prevenção e tratamento da radiodermite, o uso de tecnologia para a redução da pigmentação cutânea e a promoção de liberação controlada destas substâncias, este estudo foi proposto.

No percurso da presente investigação, as análises foram dedicadas, inicialmente, à estabilidade da formulação, pois é necessário garantir a viabilidade técnica, funcional e a segurança da formulação desenvolvida. Estas análises estão contempladas na Etapa 1 desta tese.

Na sequência, na Etapa 2, foram contemplados os estudos *in vitro*, compreendendo a avaliação de possível citotoxicidade das NLS e dos curcuminoides encapsulados ou não em NLS (CT e NLS-CT, respectivamente), além do potencial para reparo de dano ao DNA, após as células serem expostas a radiação ionizante (RI). Ainda, foi intuito desta etapa uma avaliação do potencial alergênico das NLS-CT e dos CT.

Por fim, na Etapa 3, *in vivo*, foram realizados testes de toxicidade da formulação em camundongos, tanto na via pretendida (pele) quanto em órgãos-alvo (fígado, rins, pulmão, coração). Para tal finalidade foram feitas análises histológicas e avaliados alguns marcadores bioquímicos no sangue, além da aparência macroscópica da pele, vivacidade dos animais, consumo alimentar e hídrico.

Todavia, como a intenção era produzir uma formulação com atividade anti-inflamatória e antioxidante para prevenção e tratamento de radiodermatites induzidas por radiação ionizante (RI), foi necessário induzir a radiodermite nos camundongos. Foram avaliadas doses diferentes e progressivas de RI, no intuito de produzir esta toxicidade cutânea, sem comprometimento sistêmico do animal.

A partir da indução de radiodermite foi desenvolvido um estudo de dose-resposta para avaliar o efeito da formulação, em três concentrações diferentes, na prevenção e tratamento de radiodermatites.

Este trabalho foi desenvolvido em várias etapas e contou com a colaboração de muitos profissionais de distintas formações; trata-se de um exemplo de como o conhecimento é amplo e de como é necessário transpor barreiras para o real progresso da ciência. A transdisciplinaridade fica evidente nesta tese.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Aulton (2005), qualquer formulação que ainda não esteja sendo comercializada é considerada pré-formulação. Deste ponto de vista, neste estudo, quando se lê o termo formulação deve-se considerar que se trata de uma pré-formulação, sendo, portanto, uma terminologia meramente ilustrativa.

No desenvolvimento de uma formulação passível de aplicação em seres humanos alguns testes são recomendados e, entre eles, os que visam a garantia do seu grau de estabilidade relativa, desde a fabricação até o término de sua validade.

1.1. Estabilidade de formulações

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) indica algumas características a serem avaliadas durante os estudos de estabilidade de formulações, que se aplicavam às desenvolvidas neste projeto; compreendem a avaliação organoléptica e físico-química (ANVISA, 2004).

As características organolépticas estão baseadas na aceitação do produto em desenvolvimento pelo consumidor final e avaliam, entre diferentes aspectos, cor, odor e sensação ao tato. Estas características são avaliadas por inspeção visual, olfatória e tátil.

Quanto aos aspectos físico-químicos, são recomendadas análises para identificação das alterações na estrutura da formulação, nem sempre perceptíveis por inspeção visual, bem como avaliação de parâmetros como pH, viscosidade e teor de ativo, aplicáveis neste estudo (ANVISA, 2004).

Alterações no pH podem ocorrer em função de impurezas, hidrólise, decomposição e erro no processo, podendo provocar a diminuição da limpidez do gel (CORRÊA et al., 2005). Esta instabilidade pode ocorrer também devido ao tempo de estocagem e/ou condições inadequadas de transporte e armazenamento (FERREIRA, 2000; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). Quando observamos pH abaixo de 3,4, o odor desagradável das formulações está relacionado à hidrólise de ésteres de ácidos graxos, presentes na fase oleosa das emulsões (ANVISA, 2012).

Já a viscosidade é uma medida de resistência de um fluido à aplicação de determinada força (AULTON, 2005). Segundo Thompson (2006) e Corrêa et al. (2005), quanto maior a viscosidade, maior é a resistência e a força a ser aplicada para produzir o fluxo com uma determinada velocidade.

Os géis hidrossolúveis, como os de hidroxietilcelulose, possuem comportamento reológico do tipo pseudoplástico e tixotrópico, ou seja, deformam durante a aplicação de determinada força, tornando-se mais fluidos, o que facilita o espalhamento e recuperação da viscosidade inicial, evitando que escorra (AULTON, 2005).

Já o teor de ativo está relacionado ao potencial terapêutico da formulação. As formas farmacêuticas desenvolvidas devem garantir que os princípios ativos incorporados permaneçam estáveis o maior tempo possível (ANVISA, 2012), antes de ocorrer degradação pela luz, temperatura, oxidação ou interação. Estas análises permitem que o produto final esteja dentro de uma faixa considerada segura e efetiva de ação. Existem várias metodologias de análise, entre as quais estão a espectrofotometria e cromatografia líquida.

A produção de estruturas na escala nano e micrométrica têm sido amplamente estudada, tanto para aplicações na indústria alimentícia quanto de medicamentos e cosméticos (CODEVILLA et al., 2015). Encapsular uma substância, isolada ou não, pode ser uma alternativa quando o composto apresenta problemas relacionados à volatilidade, viscosidade, baixa solubilidade (CODEVILLA et al., 2015). Ainda, pode ser uma alternativa para a produção de formas com alvo-celular específico, além de permitir uma liberação controlada do princípio ativo encapsulado sob certas condições (SUN; RADOSZ; SHEN, 2012; GÓMEZ-ESTACA et al., 2015).

De acordo com Codevilla et al. (2015), o encapsulamento também está associado à melhora de características organolépticas de um produto, podendo mascarar sabores, odores e cores indesejáveis. Além de agir no sentido de melhorar a estabilidade, protegendo uma molécula de degradação ou perda de funcionalidade em decorrência de fotossensibilidade, oxidação, pH, umidade ou a interação com outros componentes da matriz alimentar (GÓMEZ-ESTACA et al., 2015; YAO; MCCLEMENTS; XIAO, 2015; PINHEIRO; COIMBRA; VICENTE, 2016).

Quando são produzidas novas formas farmacêuticas deve-se pensar na estabilidade, assim como nos efeitos dos excipientes farmacêuticos utilizados. Identificar possíveis reações locais e sistêmicas também é recomendável, antes de sua utilização em seres humanos.

Na sequência serão apresentados estudos recomendados pela agência regulatória para avaliar a toxicidade.

1.2. Toxicidade

No desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas o processo de produção deve ser avaliado, pois pode promover impacto ambiental e na saúde. Atualmente muito se tem falado acerca do processo de fabricação dos insumos, consumo de energia, utilização de solventes alternativos e de fontes que podem ser renováveis (ARMENTA; GARRIGUES; GUARDIA, 2015; CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; FREITAS et al., 2017).

No âmbito deste estudo interessa-nos abordar alguns aspectos relacionados à toxicidade na produção das NLS, bem como da sua incorporação em bases para uso tópico e sua conservação. Tais aspectos são centrais neste estudo dada a formulação empregada nas diferentes etapas. Portanto, voltaremos nossas considerações à toxicidade durante a produção quanto ao solvente, substâncias empregadas, à base e conservantes, em especial a água, o polisorbato 80, lecitina, cera de abelha, curcuminoides, Natrosol®, Nipagim® e Nipasol®.

Segundo Souto et al. (2011) há um inconveniente em determinados métodos de produção de nanopartículas lipídicas sólida, pois utilizam solventes orgânicos. Na preparação de NLS por microemulsão a água é utilizada como solvente, proporcionando menor toxicidade durante o preparo.

A literatura aponta a utilização de polisorbato 80 (*Tween* 80), cujo nome químico é monooleato de sorbitan etoxilado, um adjuvante aniônico bastante utilizado em cosméticos, produtos alimentícios e formas farmacêuticas medicamentosas orais, parenterais e tópicas (SHAHANI; PANYAM, 2011; PARIZE et al., 2012; ZHANG et al., 2011; LIN et al., 2009; NAYAK et al., 2010; KAKKAR et al., 2011; PUGLIA et al., 2012; YADAV et al., 2012; ZHANG et al., 2012). Trata-se de um éster miscível em água (0,1 mL/mL), com pH entre 5,5 e 7,2 em uma solução aquosa a 1%. Não há produtos perigosos da sua decomposição e a toxicidade não é esperada em condições normais.

Outro adjuvante é a lecitina, cujo principal componente é a fosfatidilcolina. A fosfatidilcolina é de particular interesse e pode ser utilizada como excipiente, por razões tecnológicas, ou como ingrediente fisiologicamente ativo em várias aplicações (TAVEIRA, 2009; LOPES, 2016; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). A lecitina é uma mistura complexa de fosfolípidos, triglicerídios, ácidos graxos, esteróis e glicolípídios, que pode ser caracterizada pelo seu teor de lípidios polares (acetona insolúveis não inferior a 50%). É um constituinte natural de todas as células e que possui funções essenciais para os seres humanos, animais e plantas. Sua composição fosfolipídica é que determina a sua funcionalidade nas diferentes aplicações.

Poucos estudos utilizaram a cera de abelha como carreador em sistemas lipídicos. Trata-se de um produto da secreção glandular de abelhas operárias, cuja composição lipídica é basicamente de ácidos graxos, entre os quais o cerótico e palmítico, além de ésteres alcoólicos, traços de própolis (aproximadamente 6%), de pólen e diferentes pigmentos. É uma substância oleosa, que se solidifica em forma de lâminas delgadas, a cor varia de branca a amarelada, de odor característico e ponto de fusão entre 60 °C e 65 °C.

A literatura traz a utilização do Natrosol® como base de escolha em diferentes formulações. Trata-se de um gel derivado da celulose e de grande interesse para a veiculação de ativos em dermatologia; possui caráter não-iônico e tolera bem pH ácido (FERREIRA, 2000).

Como conservantes de formulações tópicas aceitos pela ANVISA e também comumente utilizados a literatura aponta o Nipagim® e o Nipasol®. O Nipagim®, metilparabeno (para-hidróxibenzoato de metila), é um pó cristalino, fino, branco e praticamente inodoro (FARMACOPEIA BRASILEIRA III, 1977). Possui amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos; apresenta ponto de fusão em 131°C e faixa de ebulição de 270°C a 280°C.

Já o Nipasol® é um conservante antimicrobiano derivado do ácido p-hidroxibenzóico; apresenta baixa toxicidade, compatibilidade com uma ampla gama de ingredientes e é ativo em ampla faixa de pH.

Os curcuminoides são substâncias que apresentam baixa toxicidade e ensaios clínicos em humanos não pontam toxicidade em doses até 10 g/dia por via oral (CHENG et al., 2001). No entanto, a utilização de doses elevadas pode aumentar o risco de desenvolvimento de úlceras (GUPTA; KULSHRESTHA; SRIVASTAVA, 1980). Na Farmacopeia Brasileira, tintura de cúrcuma não é recomenda em alcoolistas, diabéticos e em pessoas portadoras de cálculos biliares, obstrução de ductos biliares ou úlceras gastroduodenais (WHO, 1999; VANACLOCHA, 1999; PHILP, 2004).

A curcumina parece inibir a agregação de plaquetas e está contraindicada em pessoas medicadas com anticoagulantes ou antiagregadores plaquetários. É estável tanto no estômago como no intestino delgado; absorvida rapidamente pelo trato gastrointestinal, devido à sua elevada afinidade pelos lipídios. Existem poucas interações farmacológicas conhecidas até o momento.

A toxicidade destas NLS está atribuída mais aos adjuvantes utilizados no seu preparo do que ao próprio princípio ativo carreado. Segundo Fischer e Chan (2007), estudos

complementares aos *in vitro* são necessários, pois a maioria dos estudos nesta área utiliza modelos de cultura de células, sendo os resultados considerados apenas como exploratórios.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a compatibilidade biológica de qualquer substância para uso clínico. Somente após comprovada a sua baixa toxicidade é que se pode dar continuidade aos ensaios necessários, *in vivo* (ROGERO et al., 2003).

Para as análises da toxicidade, considerando a necessidade e aplicação do produto em desenvolvimento, podem ser desenvolvidos estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local, carcinogenicidade, estudos de interesse para avaliação da segurança farmacológica, estudos de toxicogenética, entre outros (ANVISA, 2013).

Ainda, podem ser avaliados marcadores sanguíneos de toxicidade renal e hepática. Hepatotoxicidade, segundo Araújo (2012), embora raramente associada aos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), classe na qual os curcuminoides podem ser incluídos, pode apresentar-se como severa. Este fato contribuiu para a retirada do mercado de muitos fármacos, dada a pouca previsibilidade em modelos pré-clínicos e em experimentos clínicos padronizados (KAPLOWITZ, 2005).

É sabido que estabelecer uma relação de causa e efeito entre uma formulação e um dano hepático pode ser muito difícil. Segundo Sharon (1995), na clínica dos pequenos animais, indicadores sensíveis de alterações hepatobiliares normalmente são observadas em anormalidades nas atividades séricas de enzimas hepáticas, podendo estas serem decorrentes de alterações reversíveis ou irreversíveis na permeabilidade celular, na indução de enzimas microsomais ou na gênese de lesões estruturais associadas à necrose, colestase ou isquemia hepatocelular. Ainda, considera que muitos processos patológicos envolvendo o fígado podem causar elevações, proporcionalmente distintas, nas enzimas hepáticas, devido à variação na distribuição de cada enzima específica no lóbulo hepático (SHARON, 1995).

Um parâmetro que pode ser associado a dano hepatobiliar é a fosfatase alcalina (FA). Geralmente qualquer hepatopatia ativa pode aumentar seus valores, mas as maiores elevações nos níveis desta enzima ocorrem nos casos de obstrução do trato biliar. Drogas hepatotóxicas apresentam elevações menores desta enzima (MILLER; GONÇALVES, 1999). A FA, também presente em diferentes tecidos, no fígado é observada nos microvilos dos canálculos biliares e na superfície sinusoidal dos hepatócitos, estando aumentada em casos de obstrução biliar.

Lesão hepática induzida por medicamentos pode manifestar-se, geralmente, entre um e 90 dias após a administração, nas doses usualmente empregadas (TAJIRI; SHIMIZU, 2008). A manifestação clínica é variável, pode provocar pequenas alterações nas enzimas hepáticas até a insuficiência hepática grave, que pode evoluir para o óbito (LUNARDELLI; BECKER; BLATT, 2016). No entanto, medicamentos que causam aumentos transitórios de Aspartato Aminotransferase (AST) ou Transaminase Glutâmico-oxalacética (TGO) e na Alanina Aminotransferase (ALT) ou Transaminase Glutâmico-pirúvica (TGP) no soro não causam hepatotoxicidade grave (TAJIRI; SHIMIZU, 2008).

Elevações na TGO podem indicar comprometimento celular, pois se encontra presente em uma variedade de células, tanto no citoplasma quanto nas mitocôndrias (ref). A TGP, apesar de estar presente em outras células, tem uma concentração aumentada no citoplasma de células do fígado, tornando-se um marcador mais sensível da funcionalidade deste órgão.

De acordo com Balaji e Chempakam (2010) a curcumina e seus derivados podem causar hepatotoxicidade dose-dependente. Foram observadas hepatotoxicidade em ratos com 0,2 a 1% de extrato etanólico de cúrcuma administrados durante 14 dias.

No caso de toxicidade renal, de acordo com Melgaço et al. (2010), AINEs estão associados com níveis séricos elevados de ureia, creatinina, potássio e presença de oligúria (EJAZ; BHOJANI; JOSHI, 2004). Dado aos efeitos comparáveis aos AINES que os curcuminoides possuem, é aconselhável observar níveis séricos destes marcadores. Esta toxicidade está relacionada à capacidade de inibição da síntese de prostaglandinas (BRICKS; SILVA, 2005), via inibição da Ciclooxygenase 2 (COX – 2).

Ainda, Melgaço et al. (2010) relatam que, dada a ação das prostaglandinas nos rins, pode ocorrer muitas alterações na função, porém estas são mais observáveis em sujeitos que já apresentam risco. Relacionam aos AINEs as seguintes alterações: distúrbios hidroeletrólíticos, insuficiência renal aguda, síndrome nefrótica (com nefrite intersticial), necrose papilar e outras (DUNN, 1987; MELGAÇO et al., 2010).

A seguir estão descritas alguma das principais ações dos curcuminoides.

1.3. Curcuminoides

São várias as ações descritas na literatura que são atribuídas à curcumina, entre elas anti-inflamatória (CHENG et al., 2001; AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009), antifúngica (LUTOMSKI; KEDZIA; DEBSKA, 1974; COWAN, 1999), antimicrobiana (BHAVANI-SHANKAR; SREENIVASA-MURTHY, 1979), antioxidante (FUJISAWA et al., 2004;

AUGUSTYNIAK et al., 2010), antiproliferativa (DAVIE; SPENCER, 1999; LU et al., 1993), dentre outras (DAS; KASOJU; BORA, 2010; GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008; IRVING et al., 2011; THANGAPAZHAM; SHARMA; MAHESHWARI, 2006; WRIGHT; SPENCER; FLOWERS, 2006; FREITAS; TEIXEIRA; ZAMARIOLI, 2015).

Quando se trata da atividade anti-inflamatória, as pesquisas demonstram que a curcumina possui vários alvos moleculares, entre eles a regulação da atividade da COX-2, lipoxigenase (LPO) e de indutores de óxido nítrico sintase (INOS), além de regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α), via inibição da via do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF- κ B), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) (JURENKA, 2009; SURH; et al., 2001; JOBIN et al., 1999; HUANG et al., 1991; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008).

A COX-2 é responsável pela conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos, induzida pela prostaglandina H sintase, que tem sua expressão aumentada em processos inflamatórios (OTONI; NARDIN, 2014; CHO; LEE; KIM, 2007). O efeito da curcumina sobre a COX-2 é devido à inibição da sinalização da proteína I κ B quinase, impedindo a translocação nuclear da subunidade funcionalmente ativa do NF- κ B, bloqueando a ativação do NF- κ B (BOURS, 2000).

No processo inflamatório, mediadores químicos originados nos tecidos lesados e nas células migratórias podem provocar distúrbios na membrana celular, estimulando a ativação da fosfolipase A2 e a liberação de ácido araquidônico e seus metabólitos, além de fator ativador de plaquetas (PAF) e enzimas lisossômicas. Estas enzimas, potencialmente citotóxicas, destroem células adjacentes, potencializando os efeitos locais.

A ação anti-inflamatória de muitos fármacos acontece pela inibição da síntese de PG. Em geral agem diretamente nos tecidos onde são sintetizados, sendo rapidamente metabolizados a produtos inativos em seus sítios de ação. Assim, as PGs não circulam no sangue em concentrações significativas e estão particularmente associadas ao desenvolvimento da dor que acompanha lesão ou inflamação, segundo Gooldman e Gilman (1990). Estudos envolvendo a mensuração eletrofisiológica da descarga nervosa sensorial na presença de PGs indicaram que quando as PGs foram administradas, os receptores da dor se tornaram mais sensíveis a estímulos químicos ou mecânicos (GOOLDMAN; GILMAN, 1990).

Há duas vias principais para a síntese de PGs, a partir do ácido araquidônico. Uma delas, a via da ciclooxigenase, onde as PGs, TXs e prostaciclina (PGI₂) são obtidas através da ação catalítica das enzimas ciclooxigenases. Foram identificadas duas ciclooxigenases, a COX-1,

que é constitutiva e amplamente distribuída e a COX-2, que é produzida em resposta a um estímulo inflamatório (HARVEY et al., 1998).

De outra forma, a lipoxigenase pode atuar sobre o ácido araquidônico para formar 5-HPETE, 12-HPETE e 15-HPETE, que são derivados peroxidados instáveis que são convertidos em seus correspondentes derivados hidroxilados ou, na dependência do tecido, em leucotrienos ou lipoxinas (HARVEY et al., 1998).

Quanto à via do óxido nítrico, estudos pré-clínicos sugeriram que a curcumina pode inibir a indução de NOS por macrófagos. Altas doses de NO parecem ser citotóxicas e induzir a apoptose, já doses mais baixas de NO podem proteger as células malignas de apoptose in vitro através de regulação positiva da COX-2.

Na via das citocinas, o fator de necrose tumoral (TNF) é uma molécula capaz de ativar a apoptose mediada por caspases, NF- κ B, ativador proteína-1 (AP-1), JNK, p38 MAPK e a sinalização ERK (HARANAKA et al., 1984; OLD, 1985; WANG et al., 1985; FIERIS et al., 1986; WALLACH, 1986; AGGARWAL et al., 1985; AGGARWAL, 2003; AGGARWAL; GUPTA; KIM, 2012; KUPRASH et al., 2002; LIEPINSH et al., 2006). Além de originário de monócitos, o TNF- α também é produzido por uma variedade de outros tipos de células incluindo células de K $\ddot{u}$ pfker no fígado, astrócitos no cérebro, células T e células beta no sistema imunitário, e as células de ovário.

Segundo Aggarwal, Gupta e Sung (2013), a produção de TNF a partir de macrófagos ativados por vários estímulos podem ser suprimida, de acordo com vários estudos realizados (CHAN, 1995; ABE; HASHIMOTO; HORIE, 1999; JANG et al., 2001; GAO et al., 2004; STRASSER et al., 2005; WOO et al., 2007; LIANG et al., 2008; CHEUNG et al., 2009; JAIN et al., 2009; NISHIDA et al., 2010; ZHAO et al., 2010; JIN et al., 2007; LEE et al., 2007; ZHANG et al., 2008). Esta regulação do TNF pela curcumina se dá ao nível de transcrição, entre elas pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B).

A curcumina parece exercer um papel de bloqueio da interleucina 2 (IL-2), uma interleucina próinflamatória, através de uma ligação de alta afinidade com seu receptor, interferindo no seu papel sinalizador (FORWARD et al., 2011). Está associada ao aumento da secreção de IL-4 e IL-13, interleucinas antiinflamatórias (GAO et al., 2015) e a regulação negativa de TNF e IL-6, interleucinas próinflamatórias, via fator nuclear kappa B (DAS; VINAYAK, 2014).

Quanto à atividade antioxidante da curcumina, esta parece estar relacionada à sua capacidade de regular as concentrações intracelulares das enzimas catalase, superóxido

dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPO), além de sequestrar radicais superóxidos e hidroxila (SOBRATTEE et al., 2005).

Ainda, os resultados do estudo de Ogiwara et al. (2013) demonstram que a curcumina suprime três principais danos de fita dupla contra eventos genotóxicos mediados pela inibição da Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP): danos de junção não homóloga (NHEJ), Recombinação Homóloga (HR) e nos pontos de checagem de danos ao DNA em G2/M, indicando que a supressão da atividade de histona acetiltransferases CBP e p300 é um importante mecanismo de supressão NHEJ por curcumina (OGIWARA et al., 2013).

Na sequência será abordada a RI e suas aplicações clínicas para, posteriormente, analisarmos a radiodermite.

1.4. Radiação ionizante

Num dado momento da história, final do século XIX, observou-se grandes descobertas na química e na física nuclear. Momento no qual Roentgen descobriu o Raio-X, o casal Currie, Pierre e Marie, descobriram os elementos Polônio e Radium e quando foi observada, pela primeira vez, a capacidade de emissão de “radiação penetrante” a partir de sais de Urânio por Becquerel (SALVAJOLI; SOUHAMI; FARIA, 2013). Ainda, foi observado por Rutherford que esta radiação era de três espécies diferentes: Alfa (α), Beta (β) e Gama (γ) (SALVAJOLI; SOUHAMI; FARIA, 2013).

Esta radioatividade, ou capacidade de emitir estes raios, é a transformação de um núcleo atômico de um nuclídeo em outro, ou seja, de um elemento em outro. Nesta transformação, o núcleo atômico emite um ou mais tipos de radiação, num processo que pode ser denominado de desintegração ou transmutação.

As pesquisas subsequentes demonstraram que as partículas Alfa (α) possuem carga positiva e massa maior que o elétron; a radiação Beta (β) pode ter carga negativa (β^-) quando o núcleo possui excesso de nêutrons ou carga positiva (β^+) quando têm excesso de prótons; e a Gama (γ), também denominada de fóton, representa uma energia em excesso no núcleo que se formou após a emissão de partículas.

O Raio-X e a radiação Gama (γ) são classificadas como eletromagnéticas e têm uma menor capacidade de provocar ionização do que as corpusculares Alfa (α) e Beta (β). Por ordem de capacidade de penetração, que é inversamente proporcional à capacidade de ionização, temos a Gama (γ), o Raio-X, a Beta (β) e a Alfa (α).

Portanto, podemos compreender a radiação como um fenômeno de propagação energética através de um meio material ou do espaço (meio menos denso), podendo ser de natureza corpuscular ou eletromagnética (SALVAJOLI; SOUHAMI; FARIA, 2013, 2013).

A Radiação ionizante (RI) possui energia suficiente para ejetar elétrons dos átomos, produzindo íons. As radiações eletromagnéticas, por não possuírem massa, são indiretamente ionizantes, precisando ejetar elétrons do meio para produzirem efeito biológico (SEGRETO, 2013).

Segundo Okuno e Yoshimura (2010), radiação ionizante pode arrancar qualquer elétron de um átomo se tiver energia maior que o de ligação deste elétron ao átomo. Quando os tecidos biológicos são expostos a RI, as moléculas que o compõem podem absorver esta energia e liberar um elétron (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; OKUNO, 1988). A partir deste evento, pode ocorrer desestabilização que resulta em rearranjo de ligações químicas, alterando, em alguns casos, a estrutura química das moléculas (STORER, 1966). Tais eventos podem comprometer a integridade de estruturas ou funções biológicas importantes (PINAR et al., 2007).

De acordo com Segreto (2013), a ionização de elementos importantes promove dano de forma direta e representa cerca de 30% dos efeitos biológicos da radiação eletromagnética, o chamado efeito direto (SEGRETO, 2013).

Ou ainda, esta radiação pode interagir com a água que compõe a matriz extracelular (MEC) ou no citoplasma, produzindo radicais livres e radicais reativos, no chamado efeito indireto da radiação, responsável por cerca de 70% dos efeitos biológicos (SEGRETO, 2013).

A indução de danos ao DNA é realizada de maneiras diferentes, dependendo da dose, taxa de dose e qualidade da radiação. Estes efeitos podem ser classificados em letais e subletais, sendo os primeiros irreversíveis, não podendo ser reparados pelos mecanismos celulares, levando a célula à morte. Já os subletais podem ser reparados em algumas horas. Todavia, se outro dano subletal for imputado à célula e, essa soma de danos subletais gerar um letal, isto pode levar a célula à morte.

Estes danos podem ser divididos em danos à fita simples e à fita dupla do DNA. Os de fita simples são os mais frequentes e, segundo Caldecott (2008), surgem numa frequência de dezenas de milhares por célula diariamente e são produzidas por radiação de baixo poder de transferência. Já os danos de fita dupla são mais citotóxicos (KOZAK et al., 2009) e podem comprometer a estabilidade genômica, sendo gerados por radiação de alto poder de transferência.

Para Segreto (2013), um (1) Gy produz cerca de 1.000 quebras simples e 40 duplas. O reparo destas lesões pode ser enzimático, por excisão de base, por excisão de nucleotídeo, por erro de duplicação (*mismatch repair*) e de quebra dupla, este último via recombinação homóloga ou não-homóloga (*non-homologous end joining*).

Uma das principais respostas celulares às quebras da fita dupla de DNA é a fosforilação da histona H2AX, que precede o aparecimento das enzimas de reparo do DNA envolvidas nas vias de recombinação homóloga (HR) e junção de pontos não homólogos (NHEJ) (KATAOKA et al., 2007).

As RI podem promover, além dos danos mencionados, rupturas, formação de ligações anormais (*crosslinking*) entre pares de uma mesma molécula ou entre moléculas diferentes, rompimento de ligação de hidrogênio, alterando a conformação espacial das moléculas. Os sistemas de reparo atuam no DNA lesado restaurando espontaneamente o “radioproduto” instável; por excisão e substituição do fragmento; por recombinação ou pelo sistema SOS.

A variação da resposta radiobiológica é diferente entre os distintos tecidos biológicos e entre os tecidos normais e doentes (SEGRETO, 2013). Alguns apresentam manifestações clínicas em curto período de tempo e são classificados como de resposta rápida, outros já apresentam manifestações após períodos mais longos e são chamados de tecidos de resposta lenta.

Como exemplos de tecidos de resposta rápida estão as membranas mucosas, a pele, tecido hematopoético e algumas neoplasias. Possuem como características comuns a rápida divisão celular e a susceptibilidade à apoptose das células que os compõem (SEGRETO, 2013). Já entre os tecidos de resposta lenta estão o ósseo, o conjuntivo, muscular e nervoso, mais associados à morte clonogênica, perda de atividade metabólica e à alteração vascular (SEGRETO, 2013).

Tecidos de resposta rápida repovoam o local lesado, recuperando a homeostase, porém quase não reparam as lesões radioinduzidas, e os de resposta lenta as reparam, dependendo da dose (SEGRETO, 2013).

Outra característica importante é a organização dos tecidos para a tolerância das doses de radiação. Estes podem estar organizados de modo que uma pequena área lesada comprometa a função do mesmo (série) ou em unidades funcionais independentes (paralelo), não sofrendo danos funcionais após pequenos volumes irradiados e a perda de poucas unidades funcionais. Nos primeiros, a reparação pode ocorrer através da migração de células adjacentes à área não irradiada, sendo a pele um representante; nos últimos, podemos citar o rim e o pâncreas, onde o reparo se dá pelas células locais que sobreviveram à irradiação (SEGRETO, 2013). Além do

tipo de tecido, a tolerância à radiação está associada ao volume irradiado, tipo de radiação e fracionamento.

Existem alguns sistemas de verificação para prevenir que as células entrem em processo de divisão com danos. Um deles é o bloqueio no ciclo celular em G1/S, onde ocorre a inibição do início da replicação do material genético e algumas moléculas como a ATM, p53 e CHK2 estão envolvidas (KUO; YANG, 2008). Quando o dano não é resolvido no bloqueio anterior ou é ocasionado na fase S, ocorre o bloqueio da replicação, via ATM, Nbs1, CHK2 e ciclina E (KUO; YANG, 2008). Outro bloqueio mais tardio no ciclo celular é em G2/M, última chance que as células possuem para repararem os danos.

Outra forma de interação das radiações ionizantes está relacionada com o meio que constitui as células ou onde estão suspensas. O maior componente destes meios é a água e o que resulta da hidrólise da água é a produção de radicais livres, que são os responsáveis por cerca dos outros 70 % dos efeitos atribuídos à radiação ionizante, o chamado efeito indireto.

Além da água, os lipídeos são particularmente importantes e também produzem radicais livres (HADDAD; PELOSI, 2013). Os radicais livres produzidos via RI, quando interagem diretamente com estruturas celulares, aumentam a complexidade e os locais de danos. O efeito indireto é causado por radiólise da água intracelular que, na sequência, promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes ROS podem induzir mutações através da oxidação direta do DNA ou de desoxirribonucleotídeos incorporados a ele (MICHAELS et al., 1992).

Os radicais livres produzidos englobam peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem ser destruídos pela catalase e peroxidase; superóxido ($O_2^{\bullet-}$), derivado do O_2 molecular, combatidos pela superóxido dismutase (SOD); hidroxila (HO), mais reativo e ligado à peroxidação lipídica; hidroxiperoxila ($HO_2^{\bullet}$) e oxigênio *singlet* (1O_2).

O sistema de defesa antioxidante atua na detoxificação do agente, antes de ser causada a lesão e, entre as principais moléculas envolvidas estão a glutathione peroxidase (GSH-Px), a glutathione reduzida (GSH), a SOD, a catalase e a vitamina E (estrutural de membrana). Atuando em outra frente, na reparação da lesão, quando esta não foi passível de prevenção, está o ácido ascórbico (Vitamina C), a glutathione redutase (GSH-Rd) e a GSH-Px.

Ainda, tem-se o óxido nítrico (NO), uma molécula de curta duração, cujas funções estão relacionadas à vasodilatação, inibição de agregação de plaquetas, neurotransmissão, defesa imunológica e sinalização intracelular. É classificado como uma espécie de radical livre, pois apresenta um elétron não emparelhado, fato que lhe atribui a função de aumentar a produção de muitos intermediários reativos. Alguns destes produtos intermediários podem danificar o DNA diretamente ou interferir com o reparo dos danos.

Um elevado nível de produção intracelular de radicais livres reativos pode alterar o equilíbrio entre os ciclos celulares, na proliferação e na diferenciação celulares, além de comprometer a reparação de danos ao DNA (ROY et al., 2004; SATO et al., 2006), induzindo a morte celular (SUZUKI et al., 1983). Dada esta característica das RI, uma de suas aplicações clínicas é no tratamento do câncer, onde se objetiva eliminar o tumor ou evitar a proliferação deste, repovoando o local tratado com células saudáveis.

Os estudos atuais no campo dos efeitos indesejáveis provocados pela RI deparam-se com os desafios relacionados aos próprios tecidos e aos produtos chamados de protetores químicos. A maioria dos produtos desenvolvidos apresenta eficácia relacionada à ação indireta da radiação, ou seja, na produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (STORER, 1996), que levam a morte celular ou induzem mutações (ILYASOVA et al., 2011; SUHAIL et al., 2012). No entanto, existe um limite teórico para a eficácia destes produtos devido à incapacidade de influenciarem a ação direta, e um exemplo de proteção de ação direta seria a redução de danos ao DNA ou o aumento na taxa de reparo destes danos (JEGGO; GEUTING; LOBRICH, 2011).

Alguns agentes foram estudados para a promoção de radioproteção, entre eles a cisteína e a cisteamina, que possuem um grupo funcional sulfidril; radioprotetores que apresentam um fator de redução de dose (FRD) que atuam diretamente nos radicais livres como a amifostina. No entanto, estes produtos apresentaram toxicidade considerável.

Acredita-se que um bom radioprotetor deva:

“... alcançar todos os tecidos que precisam ser protegidos na sua forma ativa; reduzir a toxicidade do tratamento convencional; não proteger o tumor com o mesmo grau de proteção dos tecidos normais; emitir o tratamento com doses suficientemente altas para melhorar o resultado do tratamento, além de ser bem tolerado pelo paciente (SEGRETO, 2013, p. 69).

Sendo assim, além de eliminar as células neoplásicas nos tratamentos oncológicos, estas RI podem proporcionar uma reação locorregional que pode evoluir para uma lesão, no trajeto do campo de radiação. Conforme já mencionado, é interesse estudar a radiodermite, além de avaliar possíveis interferências de agentes químicos exógenos nos mecanismos de reparo de danos. Na sequência abordaremos a radiodermite, no intuito de melhor compreendê-la.

1.5. Radiodermite

A aplicação da radioterapia não provoca dor e, em muitos tratamentos, nos quais são utilizadas baixas doses, os efeitos colaterais são mínimos. Entretanto, doses mais altas estão relacionadas a complicações cutâneas mais severas, pois podem provocar dano à camada germinativa da pele.

A natureza, gravidade e duração dependem dos órgãos que receberam a radiação, do tipo de tratamento e do paciente, sendo, na maioria das vezes, previsíveis e esperadas. Sabe-se que o tipo de equipamento (WELLS; MACBRIDE, 1999), energia, o fracionamento de dose, posicionamento do paciente, entre outros, estão associados, atualmente, à redução da intensidade deste fenômeno. Porém ainda se trata de uma equação que envolve múltiplos fatores (PIRES; SEGRETO; SEGRETO, 2008).

De acordo com uma revisão, cerca de 85% dos pacientes em tratamento radioterápico irão apresentar radiodermite, nos graus moderado à severo (SALVO et al., 2010).

Pra e Grillo (2013) afirmam que alterações na densidade das células basais da pele podem ser observadas após 20 Gy a 25 Gy de dose total, após fracionamento diário de 2 Gy; e que menor densidade celular é observada após 50 Gy, sem aumento da microvascularização. Consideram ainda, que o período de *turnover* da pele seja de 30 dias, aproximadamente, e que a dose de tolerância seja de 45 Gy a 50 Gy, com complicações da ordem de 5%.

Complicações precoces da RI na pele são o eritema, descamação seca e descamação úmida. Podem ocorrer nos primeiros 70 dias e são dose-dependentes (PRA; GRILLO, 2013). A evolução normalmente observada é eritema, que evolui para pigmentação, epilação e descamação seca, que em alguns casos pode evoluir para descamação úmida.

Segundo Ryan et al. (2011), não existem tratamentos úteis ou marcadores preditivos para a radiodermite. Todavia, o tamanho da mama é um fator importante quando se analisa reações de pele (POROCK et al., 1998). De acordo com Pires, Segreto e Segreto (2008), não se tem na literatura um parâmetro matemático que consiga estimar o quanto um determinado fator aumenta a probabilidade de desenvolvimento de radiodermite aguda mais severa.

Num estudo realizado com 86 mulheres submetidas à radioterapia na mama que pretendeu avaliar e classificar as reações de pele, além de caracterizar fatores intervenientes, concluiu-se que a altura da mama e a técnica de tratamento contribuíram para a reação de pele grau 3 e apenas a altura da mama para a gravidade da reação. Relataram que a chance de ocorrer reação grau 3 aumenta 2,61 vezes a cada aumento de 1 unidade de altura da mama em cm (PIRES; SEGRETO; SEGRETO, 2008).

Se na predição ainda não observamos muitos avanços, na própria definição existem controvérsias. Alguns autores consideram a radiodermite uma reação de pele à radiação (FIRMINO, 2007; PIRES; SEGRETO; SEGRETO, 2008) e outros uma lesão propriamente dita (CNEN, 2009).

Jagetia e Rajanikant (2012) consideram que RI interfere no processo de cicatrização, retardando ou tornando crônica a lesão, por alterar as condições locais da área irradiada.

A RI tem efeitos citotóxicos para os fibroblastos, diminuindo a função de produção e síntese, além da proliferação celular; promovendo diminuição do pH do meio, alterando a cinética das reações químicas, o que pode comprometer moléculas importantes como proteínas, lipídeos e carboidratos.

Portanto, o mecanismo de produção de lesão por RI é complexo e depende de vários fatores, dentre eles a radiosensibilidade que é influenciada por parâmetros físicos como transferência linear de energia (LET), a taxa de dose (dose absorvida por unidade de tempo), o volume irradiado, a dose absorvida total e o fracionamento. Ainda, devem ser considerados os fatores biológicos como o estado metabólico e nutricional, idade, entre outros. Todavia, 80% das variações das reações dos tecidos normais não podem ser explicadas pelos fatores mencionados (HALL; GIACCIA, 2006; TUCKER et al., 1996; TURESSON et al., 1996).

A avaliação da radiodermite também possui alguns pontos a serem considerados. Existem várias escalas, porém a sua complexidade não está contemplada em um único instrumento.

O Grupo Oncológico de Tratamento Radioterápico (RTOG) da Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC) possui uma escala do tipo Likert de 0 a 4 pontos que provavelmente é a mais usada no mundo, onde o Grau 0 representa - Sem reação; Grau 1 - Eritema leve, epilação, descamação seca; Grau 2 - Eritema doloroso, descamação úmida, edema moderado; Grau 3 - Descamação úmida, confluenta, edema importante e Grau 4 - Ulceração, hemorragia, necrose.

Já os Critérios Comuns de Toxicidade (CTC) do Instituto Nacional de Câncer americano (NCI), a escala também é do tipo Likert de 0 a 4, onde Grau 0 representa - Nenhum; Grau 1 - Eritema fraco ou descamação seca; Grau 2 - Eritema de moderado a vigoroso ou uma descamação úmida local, principalmente confinada a dobras e pregas cutâneas; Grau 3 - Descamação úmida confluenta de $\geq 1,5$ cm de diâmetro e não confinada às dobras cutâneas; edema desprezível e Grau 4 - Necrose cutânea ou ulceração de toda a espessura da derme, pode incluir sangramento não induzido por trauma menor ou abrasão (SAAD et al., 2002, p. 68-9).

Nota-se que o quadro álgico só é abordado pelo RTOG, no Grau 2 enquanto no CTC a dor não está presente, sendo avaliada em outra escala como dor relacionada à radioterapia; já a pigmentação da pele não é avaliada em ambas.

A literatura aponta ainda a utilização da Escala de Avaliação das Reações Cutâneas Induzidas por Radiação (RISRAS) desenvolvida por Noble-Adams (1999), que investiga, além da aparência clínica da pele, como isto afeta a vida diária.

O fato da radiodermite afetar as atividades diárias pode ter repercussões diretas na qualidade de vida relacionada à saúde dos pacientes. Em oncologia, a despeito do aumento na sobrevida global dos pacientes e do tempo livre de progressão de doença, a preocupação com a qualidade desta vida adicional que está sendo ofertada aos pacientes tornou-se foco de acentuada atenção após a década de 80 (BARROS; SANTOS, 2001).

No âmbito da prevenção de radiodermite, um estudo com mulheres com câncer de mama aponta que os produtos tópicos mais indicados são os corticosteroides e o MAS065D (*Xclair*) (ANDRADE et al., 2012). Este último um creme hidratante com atividade anti-inflamatória não esteroidal que apresenta as propriedades de formar barreira; é preparado à base de ácido hialurônico, manteiga de karité (emoliente), ácido glicirrintínico (extrato de alcaçuz com propriedades anti-inflamatórias), *Vitis vinifera* (atividade antioxidante) e telmesteína (atividade anti-elastase e anticolágena in vitro).

Blecha e Guedes (2006), numa revisão da literatura sobre radiodermite, não identificaram a frequência de uso de um produto que possa ser recomendado na prática assistencial, chamando a atenção para o fato de que a maioria dos produtos identificados nos trabalhos não estava disponível no Brasil.

Nos últimos anos foram testados muitos produtos para o tratamento da radiodermite, uns à base de corticoides (SCHMUTH et al., 2002), calêndula (POMMIER et al., 2004), fenitoína (FIRMINO, 2007), fatores de crescimento recombinante derivado de plaqueta humana (rhPDGF) (HOM; MANIVEL, 2003), oxigenoterapia hiperbárica (PRA; GRILLO, 2013), sulfadiazina de prata (GUEDES; NASCIMENTO, 2003), Aloe vera (HEGGIE et al., 2002), fator de crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-GSF) (KOUVARIS et al., 2001), entre outros. A preocupação está no controle de sintomas, na prevenção de infecção associada e na reepitelização da área afetada.

Uma revisão sobre os cuidados com a pele e produtos utilizados pelos pacientes durante a radioterapia para câncer de mama aponta para questões relacionadas à lavagem das roupas, uso de desodorantes e investigações sobre a utilização de cremes, géis ou soluções. Este fato evidencia que há campo de estudo para produtos tópicos na gestão e no retardo do aparecimento

da radiodermite e aponta também, que as pesquisas falham ao destacar um produto que tenha um demonstrável benefício em relação aos comumente utilizados e que os números amostrais não são muito relevantes (BUTCHER; WILLIAMSON, 2012).

A fisiopatologia da lesão induzida pela radiação ionizante será objeto do item a seguir.

1.6. Processo de dano e reparo tecidual

O processo de dano e reparo tecidual perpassa pelo processo inflamatório. Normalmente está associado a uma lesão, ou invasão microbiológica localizada que culmina com a destruição, diluição, inativação e ou aprisionamento do agente agressor e do tecido lesado (GALLIN; SNYDERMAN, 1999). No caso da lesão induzida por RI, o agente inicialmente físico promove alterações químicas locais, conhecida como inflamação estéril.

O que caracteriza a fase inicial conhecida como aguda são os sinais clássicos de dor, calor, rubor (eritema), tumor (edema), podendo evoluir para perda funcional. Microscopicamente, envolve uma complexa e intrincada rede de eventos, entre eles uma vasoconstricção inicial, seguida de vasodilatação de arteríolas, capilares e vênulas, aumento da permeabilidade vascular e do influxo sanguíneo, extravasamento de fluidos e proteínas, ativação, marginação e migração de leucócitos para o local da lesão (GALLIN; SNYDERMAN, 1999).

A migração de leucócitos para a área lesada é estimulada por produtos derivados da quebra de colágeno e elastina, fatores do sistema complemento e citocinas (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Esta fase é conhecida como fase inflamatória do processo de cicatrização (BUSANELLO et al., 2014).

As células inicialmente lesadas liberam prostaglandinas (PG), histamina, leucotrienos, cininas e epinefrina na circulação periférica ou por estímulo do sistema nervoso periférico (SNP), elementos do complemento e, caso ocorra quebra da barreira e rompimento de vasos sanguíneos, as plaquetas se marginam e ocorre a agregação. Além disso, ocorre depósito de fibrinas para conter a hemorragia e a liberação de fatores imunomodulatórios e proteínicos na circulação. Entre estes estão o fator de crescimento plaquetário (PDGF), o fator de crescimento transformador α e β (TGF- α e TGF- β), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento endotelial (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de coagulação (V e VIII), albumina, fibrinogênio, fibronectina, laminina, trombospondina, fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas, entre outros (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

As atividades celulares são reguladas por um balanço entre as citocinas e suas isoformas com atividades contrárias. O meio celular muda após a lesão; a matriz de fibrina e fibronectina é poupada por células inflamatórias, enquanto os fibroblastos e células inflamatórias predominam. A reepitelização se inicia nos primeiros dias após a lesão, com revascularização, fibroplasia e epitelização. Pode ocorrer aumento na proliferação ou migração de fibroblastos para a área lesada e os principais componentes associados são o PDGF, TGF- β , EGF e fibronectina.

A angiogênese torna-se ativa após o segundo dia, estimulada pelo aumento do nível de lactato, diminuição do pH e diminuição da tensão de oxigênio. Os fatores envolvidos nesta etapa são, primordialmente, o FGF e VEGF (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A reconstrução do tecido lesado começa imediatamente após a lesão. Durante as primeiras 24 horas, células basais se alongam e iniciam a migração para a área desnuda da superfície da lesão. Se a lesão não provocou perda de anexos como folículos pilosos, e glândulas, estas estruturas contribuem para o processo migratório, em monocamadas.

O processo de proliferação se inicia após 24 horas e as moléculas envolvidas são o EGF, TGF- α , fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e, adicionalmente, metaloproteínas (MMP), cálcio, magnésio, colágeno tipo I e V, entre outras (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Esta fase é conhecida, didaticamente por proliferativa (BUSANELLO et al., 2014).

A síntese de proteínas e contração da lesão ocorre, predominantemente, após o quarto ou quinto dia. A qualidade e quantidade da matriz extracelular refletem na força e resistência do tecido cicatricial. As células envolvidas neste processo são os fibroblastos, estimulados por TGF- β , PDGF e EGF. A matriz madura contém colágeno, proteoglicanas, trombospondina e proteína ácida rica em cisteína (SPARC) (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A contração começa entre quatro e cinco dias e persiste por, aproximadamente, duas semanas; há predomínio de miofibroblastos. Já o remodelamento se inicia após três semanas, podendo durar meses. Entre as substâncias responsáveis estão o interferon γ , o TGF - α e metaloproteínas (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Esta fase também é chamada de fase de remodelação (BUSANELLO et al., 2014).

Os fibroblastos são células derivadas do mesênquima responsáveis pela produção de componentes da matriz extracelular (MEC), além de ser essencial durante a maturação do animal e na fase embrionária. O termo fibroblasto é utilizado para descrever diferentes tipos celulares que compartilham similaridades morfológicas quando observadas ao microscópico ótico; porém, apresentam funções distintas: fibrócitos quando presentes na MEC, *stem cells* e

células que sintetizam proteínas; em tecido contrátil são os miofibroblastos e, em alguns momentos, onde ocorre fagocitose, são conhecidos com histiócitos.

Possui a capacidade de evocar uma reação fibrótica em resposta a diferentes estímulos. A promoção de aderência dos fibroblastos, quimiotaxia, proliferação e síntese de MEC e enzimas são processos críticos na homeostase e no remodelamento do tecido cicatricial.

Sua função para a MEC é decorrente da síntese de vários compostos, entre eles: colágenos, elastina, ácido hialurônico, proteoglicanos, glicoproteínas, que contribuem para a força tensora dos tecidos. TNF- α e IL-1 β induzem um aumento da transcrição do protooncogene JUN (c-jun), que é em parte ativado pela proteína ativadora 1 (AP-1) nos fibroblastos, o que promove um aumento na síntese de collagenase (POSTLETHWAITE; KANG, 1999). Em fibroblastos da derme de seres humanos, o receptor p55 do TNF, media a expressão de collagenase pelo TNF- α .

Ainda, o TNF- α reduz a expressão gênica do colágeno tipo I e é um potente quimioatrativo para fibroblastos dérmicos humanos. É uma das primeiras citocinas produzidas por macrófagos ativados. É uma molécula importante na gênese do processo inflamatório e na injúria tissular e age quase sempre em conjunto com a IL-1 β .

Já a IL-1 β possui uma ação regulatória mais fraca na expressão gênica do colágeno tipo I; age em leucócitos, células endoteliais, hepatócitos, miócitos, adipócitos e em certos neurônios. Regula para cima a expressão de moléculas de adesão, citocinas e metabólitos do ácido araquidônico; aumenta a acumulação de neutrófilos, proliferação de fibroblastos e a angiogênese, síntese de proteínas hepáticas de fase aguda e induz febre. Ações similares são observadas pela IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , FCT- β e em alguns membros da família dos interferons.

A IL-4 quando sintetizada por células -T pode atrair fibroblastos e iniciar reparo em sítios onde há reação imunológica; TGF- β , PDGF, bFGF e EGF são fatores quimiotáticos para fibroblastos in vitro e a quimiocina derivada de queratinócitos (KC) é produto da resposta inicial de fibroblastos; colágenos tipo I, II e III promovem sinais quimiotáticos para fibroblastos. O KC (IL-8) é apresentada como principal função biológica a indução da migração de células efectoras, marcadamente neutrófilos para a área inflamatória (OLIVEIRA et al., 2011). Também é produzida por macrófagos, monócitos, células endoteliais e hepatócitos, além dos queratinócitos e fibroblastos

A terminologia utilizada para descrever citocinas pode não ser de fácil compreensão, de acordo com Sundry, Patel e Haynes (1999). Uma citocina pode ter diferentes nomenclaturas, dependendo da sua origem celular, efeito biológico ou tamanho molecular; podem ser

produzidas por distintos tipos celulares e agir em distintos tipos celulares também (atividade peliotrópica). Já as interleucinas são as produzidas por leucócitos e atuam em leucócitos.

Dada a complexidade do mecanismo de reparo de lesões induzidas por radiação ionizante, o desenvolvimento de um produto que pudesse preveni-las ou tratá-las seria um adjuvante no tratamento oncológico. Neste cenário entram as NLS-CT, escopo desta tese.

A hipótese trabalhada nesta tese é que uma formulação tópica e de liberação controlada contendo curcuminoides pode atuar, de forma promissora, na prevenção e tratamento de lesões de pele induzidas pela RI.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Esta pesquisa foi composta por três etapas, cada uma com distintos objetivos.

2.1. Etapa 1: Estudos de estabilidade

O propósito desta etapa foi avaliar a estabilidade de três diferentes doses de curcuminoides nas NLS-CT, a saber: 5 mg, 17,5 mg e 30 mg em 100g de gel. Foram seus objetivos:

- Avaliar as características organolépticas das formulações quanto ao aspecto, cor, tato e odor.
- Avaliar as características físico-químicas da formulação através do pH, comportamento reológico e quantificação de ativo (curcuminoides).

2.2. Etapa 2: Estudos *in vitro*

O propósito desta etapa foi avaliar os efeitos das NLS-CT em culturas de células que possuem papéis fundamentais na via de administração de escolha para as formulações com as NLS-CT, tanto no processo inflamatório quanto no de reparo da pele. Ainda, foi interesse avaliar se estas nanopartículas estimulariam uma resposta alergênica, uma questão de segurança para aplicações futuras. Portanto, foram objetivos desta etapa:

- Avaliar a citotoxicidade das NLS e dos curcuminoides encapsulados em NLS (NLS-CT) ou não (CT) em cultura de células de fibroblastos e queratinócitos humanos de linhagem normais.
- Avaliar a atividade das NLS e dos curcuminoides encapsulados em NLS (NLS-CT) ou não encapsulados (CT) em cultura de células de fibroblastos e queratinócitos humanos de linhagem normais, após serem submetidos a RI.
- Avaliar a capacidade de inibição da liberação da enzima β -hexosaminidase em cultura celular de mastócitos, após serem tratados com curcuminoides encapsulados em NLS (NLS-CT) ou não encapsulados (CT).
- Avaliar a citotoxicidade dos curcuminoides não encapsulados (CT) em cultura de células de mastócitos.

2.3. Etapa 3: Estudos *in vivo*

O propósito desta etapa foi desenvolver induzir radiodermite sem comprometer estruturas importantes no animal para, posteriormente, avaliar o efeito de formulações tópicas contendo NLS-CT na prevenção e tratamento destas lesões cutâneas induzidas pela RI. Foram objetivos desta:

- Realizar um teste de toxicidade aguda de uma formulação tópica contendo curcuminoides encapsulados em NLS (NLS-CT) na pele e em órgãos-alvo de camundongos BALB;
- Induzir radiodermite em camundongos BALB;
- Avaliar o efeito de formulações tópicas contendo curcuminoides encapsulados em NLS (NLS-CT) na prevenção e no tratamento de radiodermite, em camundongos BALB.

3. MÉTODO

3. MÉTODO

Como no Brasil ainda não existe uma regulamentação específica para a nanotecnologia e nanomateriais, seguiremos orientações acerca da estabilidade e toxicidade usuais. De acordo com a Lei da Comunidade Comum Europeia nº 696 de 20 de outubro de 2011, uma formulação para ser considerada um Nano Produto ou Nanotecnologia precisa contemplar alguns pré-requisitos, a saber: possuir pelo menos 50% das partículas com diâmetro externo menor que 100 nm e não conter aglutinantes como adesivos, óleos, ceras, parafinas, graxas, colas, entre outros (COMMISSION RECOMMENDATION, 2011).

As NLS-CT desenvolvidas (ZAMARIOLI, 2014)^{1,2}, apesar de terem tamanho dentro da escala de nanômetros, não possuem diâmetro externo inferior a 100 nm em 50% das partículas e possuem ceras em sua composição.

Nesta etapa foram realizadas as avaliações cujos passos metodológicos estão apresentados nos tópicos a seguir.

3.1. Etapa 1: Estudos de estabilidade

Para esta etapa, foram produzidas NLS-CT, segundo o processo descrito em estudo anterior (ZAMARIOLI et al., 2015)³. Optou-se por avaliar três diferentes doses de curcuminoides nas NLS-CT, a saber: 5 mg, 17,5 mg e 30 mg em 100g de gel. Serão descritas as avaliações que foram realizadas, de acordo com as preconizadas pela agência regulatória brasileira.

As três Formulações (Δ de 12,5 mg entre elas) foram acondicionadas em embalagens brancas e opacas, com tampa de rosca e batoque; embalagens estas que estavam sendo consideradas para o envase do produto final.

Estas concentrações foram baseadas na concepção que se trata de um sistema que utiliza uma menor concentração de princípio ativo e que este é liberado de forma controlada. Ainda, é

¹ As NLS-CT desenvolvidas previamente possuem diâmetro de 123 nm, Índice de Polidispersividade (PdI) de 0,371 e potencial zeta de -29,10 mV, incorporadas em gel de hidroxietilcelulose.

² Número do registro: BR1020150090170, título: "Processo de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcuminoides, nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcuminoides e uso das mesmas", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Instituição financiadora: Universidade de São Paulo.

³ Esta formulação foi submetida a testes preliminares de estabilidade e apresentou boa espalhabilidade e, quando submetida a estresse mecânico a 3.000 rpm por 30 minutos não apresentou separação de fases. Os testes preliminares de estabilidade da formulação consistiram em seis ciclos de 48 horas, sendo 24 horas em estufa a 40°C $\pm$ 2°C e 24 horas em geladeira 5°C $\pm$ 2°C. A formulação (gel) permaneceu homogênea, de coloração amarela clara, brilhante, com odor característico e sem alteração significativa de pH.

sabido que a curcumina apresenta atividade biológica em concentrações plasmáticas baixas (ng/mL) (SHOBA et al., 1998; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008), a despeito de sua baixa solubilidade e consequente também baixa biodisponibilidade por via oral. Ainda, a forma de administração pretendida é a tópica e a ação localizada.

Outra consideração importante é o fato de o Brasil pertencer a Zona Climática IV (úmida e quente) e as condições recomendadas para estudos de estabilidade em temperatura ambiente serem de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ à $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa do ar (UR) (ANVISA, 2012; ORIQUI; MORI; WONGTSCHOWSKI, 2013). Por tratar-se de NLS a base de cera de abelha, uma temperatura próxima a 40°C poderia comprometer a estabilidade das nanopartículas, pois a cera torna-se amolecida em torno desta temperatura. As condições de umidade relativa do ar foram mantidas, porém a temperatura de escolha para os testes foi de 25°C .

3.1.1. Avaliação organoléptica

As características organolépticas avaliadas foram cor, odor e sensação ao tato (APÊNDICE 1), conforme orientação da ANVISA (2004), através de inspeção visual, tátil e olfativa.

3.1.2. Avaliação físico-química

3.1.2.1. pH

O pH das amostras foi aferido numa dispersão de 1g de formulação em 10 mL de água Milli-Q, após 30 minutos de agitação em Vortex modelo AT 56 (Phoenix). Foi utilizado peagâmetro modelo DM 20 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil) e as análises foram feitas em triplicata, no mesmo dia do preparo das formulações, sendo este considerado tempo zero (T0) e, posteriormente, aos três e seis meses (T3 e T6).

3.1.2.2. Comportamento reológico

As amostras das três formulações contendo NLS-CT (5 mg, 17,5 mg e 30 mg) foram analisadas nos mesmos intervalos de tempo (T0, T3 e T6). Foram feitas no reômetro tipo Cone & Placa (R/S Plus Brookfield, Co, Middleboro, MA, EUA), haste CP-25, *gap* 3. Aplicou-se taxa de cisalhamento de 0 a 60 s⁻¹ e de 0 a 300 s⁻¹ (curva ascendente) e de 60 a 0 s⁻¹ e de 300 a 0 s⁻¹ (curva descendente), por tempo total de 120 e 600 segundos a 37°C, respectivamente.

Os reogramas obtidos foram ajustados pela equação de Ostwald, apresentada abaixo:

$$\tau = k\gamma^n \quad (1)$$

Onde: τ é a tensão de cisalhamento
 k é o índice de consistência
 γ é a taxa de cisalhamento
 n o índice de fluxo.

Para calcular o índice de fluxo, a histerese como a área entre as curvas (tixotropia) e os valores de viscosidade aparente utilizou-se o *software* RHEOCALC versão 1,01 (Brookfield, Co, Middleboro, MA, EUA).

3.1.2.3. Teor de ativo

A quantificação de curcuminoides nas formulações foi realizada por cromatografia analítica de alta eficiência, metodologia validada inicialmente por Paulucci et al. (2013) e submetida a revalidação da linearidade e da seletividade por Zamarioli (2014). O método apresenta limite de quantificação de 169 ng/mL e de detecção de 160 ng/mL; equação da reta $y = 0,006x - 0,009$, sendo 0,006 o coeficiente angular e 0,009 o linear, com r^2 de 0,999, demonstrando linearidade, dentro das concentrações analisadas (ANVISA, 2003).

O equipamento de cromatografia foi HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Brazil Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil), coluna C18 da Allcrom (Phenomenex, São Paulo, Brasil) de 250 x 4,6 mm, 100Å; fase móvel acetonitrila (ACN) e água acidificada (ácido cítrico a 1%) na proporção 50:50 (v:v), pH 3,5, vazão de 1,0 mL/min, detector Ultra Violeta (UV) –Visível (Vis) a 418, 420 e 426 nm, volume de injeção de 50 µL, com tempo de eluição de 20 minutos, filtro de 0,45 µm e temperatura do forno de 40°C.

3.2. Etapa 2: Estudos *in vitro*

Serão descritos os passos metodológicos adotados nesta etapa, desde o cultivo de linhagens celulares até o desenvolvimento dos estudos de citotoxicidade, liberação e inibição de β -hexosaminidase, enzima estudada para avaliar atividade alergênica de diferentes substâncias.

3.2.1. Linhagens celulares e cultivo

Foram utilizadas linhagens celulares normais de fibroblastos CCD1072Sk e queratinócitos HaCaT humanos, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido e cultivadas em monocamada, em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com uma mistura de nutriente (HAM-F10) (Sigma-Aldrich) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Campinas, Brasil), em 5% de CO₂ e a 37°C, até atingirem o estado de semiconfluência para posterior subcultivo e preparo para os experimentos.

Outra linhagem de células utilizada nesta etapa foi a RBL-2H3 de mastócitos de ratos alterados, gentilmente fornecidas pelas Professoras Dra. Connie Oliver e Maria Célia Jamur, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Atualmente são cultivadas no Laboratório de Biossensores e Sistemas Microheterogêneos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O meio de cultura utilizado foi DMEM com 15% de SBF.

3.2.2. Ensaio de viabilidade celular com queratinócitos e fibroblastos

As células, cultivadas e semeadas em placas de 96 poços, foram incubadas por 24h e expostas a oito concentrações (0,078 $\mu\text{g/mL}$; 0,156 $\mu\text{g/mL}$; 0,313 $\mu\text{g/mL}$; 0,625 $\mu\text{g/mL}$; 1,25 $\mu\text{g/mL}$; 2,50 $\mu\text{g/mL}$; 5,00 $\mu\text{g/mL}$ e 10,00 $\mu\text{g/mL}$) de NLS e o equivalente, em massa de curcuminoides encapsulados ou não, até o tempo de colheita (120 h após o início do tratamento). Foi feita triplicata em cada concentração analisada.

Após o tempo de incubação de 120 h, a seguinte sequência foi adotada:

- As células, CCD1072Sk e HaCaT, foram observadas;
- O meio foi retirado;
- As células foram lavadas com SBF;

- 100 µL de uma solução contendo DMEM - D1145 (Sigma-Aldrich) foi adicionado em cada poço com o *kit* XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide (Roche Molecular Biochemicals/Mannheim, DE);
- As células foram mantidas em estufa modelo COM-19AIC (UV) (Sanyo Electric Co., Ltd, Japão) no tempo indicado pelo fabricante, por 3 h à 37°C, até o momento da leitura colorimétrica;
- Foi realizada a leitura das placas através do aplicativo Gen5 versão 2.06 (Bio Tek Instruments, Inc, USA).

Com este kit XTT foi possível analisar o número de células viáveis nas culturas, através da clivagem do sal tetrazolium XTT em formazan (cor alaranjado) em células viáveis. O número de células viáveis foi correlacionado com a quantidade do corante, que pode ser quantificado em espectrofotômetro, detectável por uma absorbância de 480 nm (SCELZA et al., 2012). Foram realizados três experimentos independentes para cada linhagem celular.

3.2.2.1. Ensaio de viabilidade celular com queratinócitos e fibroblastos após radiação ionizante

Foram seguidos os mesmos passos metodológicos realizados nos ensaios de citotoxicidade, até o momento da exposição às diferentes concentrações (0,078 µg/mL; 0,156 µg/mL; 0,313 µg/mL; 0,625 µg/mL; 1,25 µg/mL; 2,50 µg/mL; 5,00 µg/mL e 10,00 µg/mL) de NLS e o equivalente, em massa de curcuminoides encapsulados ou não. Após 24h de exposição, as placas com CCD1072Sk e HaCaT foram submetidas a 2 Gy de RI no equipamento na Unidade de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Para cada placa irradiada, uma placa de controle foi mantida nas mesmas condições ambientais.

3.2.3. Ensaio direto – liberação de β-hexosaminidase

A degranulação dos mastócitos foi medida conforme descrito por Naal et al. (2004). As células RBL-2H3 foram primeiramente sensibilizadas com 1 µg/mL de anti-DNP IgE, purificadas como descrito anteriormente (POSNER et al., 1992) e plaqueadas em placa de 96 poços a 5×10^5 células/mL por 24 h, a 37 °C e 5% de atmosfera de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em tampão de Tyrode, a pH 7,4, e pré-tratadas por 20 min, a 37 °C,

com diferentes concentrações de CT ou NLS-CT (0,3 a 50 µg/mL, mantidas em solução estoque em DMSO ou Tyrode, respectivamente), ambas diluídas, posteriormente, em tampão de Tyrode. A degranulação celular foi medida por determinação da quantidade de β-hexosaminidase liberada. Desse modo, as células RBL foram estimuladas pela adição de 100 µL de uma solução a 200 ng/mL de antígeno DNP-BSA (HARDY, 1986), em concentração final de 100 ng/mL, seguido de tratamento com 100 µL de substrato β-hexosaminidase 3,6 mM (4-metilumbeliferil-N-acetil-p-D-glucosaminida, MUG, Sigma-Aldrich), em tampão de Tyrode (pH 7,4) e incubação durante 60 min. A atividade da β-hexosaminidase foi quantificada medindo a intensidade de fluorescência do produto da clivagem mediada por β-hex de MUG, metilumbeliferona, num leitor de microplacas (BioTEK, Winooski, EUA) utilizando filtros de excitação de 360 nm e de emissão de 450 nm. A liberação espontânea de β-hexosaminidase e a β-hexosaminidase total foi determinada nas células em tampão de Tyrode sem antígeno ou com 0,1% de Triton-X-100, respectivamente. As amostras estimuladas pelo antígeno na ausência do CT ou NLS-CT foram tomadas como uma amostra onde a degranulação está no máximo. A fluorescência de controle foi feita apenas em tampão (sem sobrenadante celular) e foi subtraída de todas as leituras. A percentagem de liberação de β-hexosaminidase estimulada foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$\% \beta - Hexosaminidase = \left(\frac{S - N}{T - N} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde: N Normal, fluorescência do veículo (tampão de Tyrode); Amostra S, fluorescência das amostras (+) DNP-BSA, (+) ou (-) CT e NLS-CT e T Total, fluorescência de amostras de células Triton X-100-lisadas.

O valor de IC₅₀ (concentração de curcuminoides, CT, necessária para inibir a degranulação de β-hexosaminidase a partir de células estimuladas com antígeno em 50%) foi determinado graficamente. O efeito inibitório dos curcuminoides na liberação da β-hexosaminidase foi comparado com o fumarato de cetotifeno. Salvo indicação em contrário, os reagentes são da Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg.

3.2.4. Ensaio de viabilidade celular com mastócitos

Células RBL-2H3 foram semeadas em microplacas de 96 poços a 4,0 x 10⁵ células/mL e incubadas durante a noite a 37 °C. Após uma etapa de lavagem com PBS, as células foram tratadas com 200 µL de diferentes concentrações de CT e NLS-CT (0,3-50 µ / mL), diluídas

em meio de cultura celular, seguindo-se uma etapa de incubação de 24 h, a 37 °C. Em seguida, as amostras dos experimentos foram tratadas com 5 µL de uma solução de estoque de resazurina 1,0 mg / mL (Sigma-Aldrich) por novas 3 h de incubação. A viabilidade celular foi avaliada com base nas medições de fluorescência da resorufina, um produto fluorescente resultante da redução da resazurina por células viáveis (excitação a 530 nm, emissão a 590 nm). A fluorescência registrada de amostras de controle não tratadas foi tomada como 100% de viabilidade celular

3.2.5. Análise estatística

Os dados descritivos desta etapa foram expressos através de medidas de tendência central e de dispersão. Graficamente, os resultados foram apresentados em termos de viabilidade celular em relação ao controle das células (100% de viabilidade), nas diferentes concentrações. Para o ensaio de liberação de β -hexosaminidase, este foi expresso em termos de porcentagem de inibição da liberação, em comparação com um controle de liberação espontânea e outro de máxima liberação.

Para a realização da análise dos dados desta etapa foi utilizado o programa R Core Team, 2017) versão 3.4.1 através da biblioteca GAMLSS (RIGBY; STASINOPOULOS, 2007). A classe de Modelos Aditivos Generalizados para Posição, Escala e Forma (GAMLSS em inglês) é adequada, sobretudo, para modelagem da variável resposta quando ela não segue uma distribuição da família exponencial e nos casos em que o regressando exibe heterogeneidade, ou seja, quando a escala ou a forma da distribuição da variável resposta mudam com as variáveis explanatórias (FLORÊNCIO, 2010).

Seja $y^T = (y_1, \dots, y_n)$ um vetor de tamanho n da variável resposta com função densidade $f(y_i|\theta^i)$, onde $\theta^i = (\theta_{1i}, \theta_{2i}, \theta_{3i}, \theta_{4i}) = (\mu_i, \sigma_i, \nu_i, \tau_i)$, e seja $k = 1, 2, 3, 4$ e seja $g_k(.)$ uma função de ligação monótona que relaciona os parâmetros com as variáveis independentes a partir das equações:

$$g_1(\boldsymbol{\mu}) = \boldsymbol{\eta}_1 = \mathbf{X}_1\boldsymbol{\beta}_1 + \sum_{j=1}^{J_1} \mathbf{Z}_{j1}\boldsymbol{\gamma}_{j1} \quad (3)$$

$$g_2(\boldsymbol{\sigma}) = \boldsymbol{\eta}_2 = \mathbf{X}_2\boldsymbol{\beta}_2 + \sum_{j=1}^{J_2} \mathbf{Z}_{j2}\boldsymbol{\gamma}_{j2} \quad (4)$$

$$g_3(\boldsymbol{\nu}) = \boldsymbol{\eta}_3 = \mathbf{X}_3\boldsymbol{\beta}_3 + \sum_{j=1}^{J_3} \mathbf{Z}_{j3}\boldsymbol{\gamma}_{j3} \quad (5)$$

$$g_4(\boldsymbol{\tau}) = \boldsymbol{\eta}_4 = \mathbf{X}_4\boldsymbol{\beta}_4 + \sum_{j=1}^{J_4} \mathbf{Z}_{j4}\boldsymbol{\gamma}_{j4}. \quad (6)$$

Onde μ , σ , ν e τ são vetores de comprimento n , $\beta_k = (\beta_{1k}, \beta_{2k}, \dots, \beta_{jk})$ é um vetor de comprimento j^k e X_k é a matriz de delineamento de ordem $n \times j^k$, Z_{jk} é a matriz conhecida de delineamento de ordem $n \times q_{jk}$ e γ_{jk} é uma variável aleatória de dimensão q_{jk} que é assumida com distribuição $\gamma_{jk} \sim N_{q_{jk}}(0, G_{jk}^{-1})$, onde G_{jk}^{-1} é a inversa generalizada de dimensão $q_{jk} \times q_{jk}$. Os parâmetros μ e σ usualmente são caracterizados como parâmetros de locação e escala respectivamente enquanto que os demais parâmetros, se existem, são caracterizados como parâmetros de forma: assimetria e curtose. Embora eles também possam aplicados de uma maneira mais generalista para qualquer parâmetro da população (STASINOPOULOS; RIGBY, 2007).

Para a seleção da distribuição da variável dependente foi utilizado o critério de informação de Alaike Generalizado, definido por $GAIC = -2l(\hat{\theta}) + bdf$, onde $l(\hat{\theta})$ é a função de verossimilhança, b é um parâmetro de penalização e df denota os graus de liberdade do modelo. Para $b = 2$ temos o critério original de Akaike, AIC (1974) enquanto que para $b = \log(n)$ o critério de Informação Bayesiana, SBC (1978). Quanto menor o valor do critério, melhor é o ajuste. Para este trabalho foi escolhido o SBC. No apêndice de Stasinopoulos (2008) são apresentadas todas as distribuições abrangidas na classe GAMLSS.

Para a viabilidade celular dos queratinócitos (HaCaT), a tabela 1 mostra a aplicação dos critérios AIC e SBC para a seleção da distribuição mais adequada de probabilidade, ilustrando somente cinco distribuições.

Tabela 1 – Seleção de modelos para a análise de viabilidade celular dos queratinócitos (HaCaT). Ribeirão Preto, 2017.

Distribuições	AIC	Distribuições	SBC
SEP2	1389,07	SEP2	1401,42
SEP1	1390,19	SEP1	1402,54
BCPEo	1390,49	BCPEo	1402,84
PE	1397,01	PE	1406,27
SEP3	1397,65	SEP3	1410,00

Nota: Alaike Generalizado; critério de Informação Bayesiana

Por ambos os critérios podemos observar que a distribuição Exponencial Potência Assimétrica (Skew Exponential Power type 2 distribution - SEP2) apresentou o melhor resultado, sendo, portanto, a distribuição escolhida (Tabela 1).

No gráfico 1 temos a sobreposição da densidade da SEP2 sobre a distribuição real dos dados.

Gráfico 1 – Sobreposição da densidade SEP2 sobre a distribuição das células HaCat.

Fonte: O próprio autor.

Nota-se uma curva assimétrica e com uma cauda pesada à direita (Gráfico 1). A aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk sobre os resíduos do modelo evidencia a adequação do ajuste ($W = 0,99472$, $p\text{-valor} = 0,8810$).

A distribuição SEP2 (μ , σ , ν , τ), dada em Stasinopoulos, Rigby e Akantziliotou (2008), é definida pela seguinte expressão:

$$f_Y(y|\mu, \sigma, \nu, \tau) = \frac{2}{\sigma} f_{Z_1}(z) \Phi(\omega) \quad (7)$$

Onde $-\infty < y < \infty$, $-\infty < \mu < \infty$, $-\infty < \nu < \infty$, $(\sigma > 0)$ e $(\tau > 0)$. E tem-se que $z = (y - \mu)/\sigma$, $\omega = \text{sign}(z)|z|^{\tau/2}\nu\sqrt{2/\tau}$ e f_{Z_1} é uma função densidade de probabilidade $Z_1 \sim \text{PE2}(0, \tau^{1/\tau}, \tau)$ e $\Phi(\omega)$ é a função de distribuição acumulada de uma distribuição Normal Padrão no ponto ω . A função de ligação entre os parâmetros e as variáveis independentes são dados respectivamente por $g_1(\mu) = \mu$ e $g_2(\sigma) = \log(\sigma)$, $g_3(\nu) = \nu$ e $g_4(\tau) = \log(\tau)$.

O parâmetro ν determina a assimetria da distribuição, com $(\nu > 0)$ indicando assimetria positiva e $(\nu < 0)$ assimetria negativa enquanto que o parâmetro τ indica a curtose, com $(\tau > 2)$ indicando cauda platicúrtica (distribuição mais "achatada" do que a distribuição normal) enquanto que $(\tau < 2)$ indica cauda leptocúrtica (distribuição menos "achatada" do que a distribuição normal).

Para a viabilidade celular dos fibroblastos (CCD), na tabela 2 temos a aplicação dos critérios AIC e SBC para a seleção da distribuição mais adequada de probabilidade, também ilustrando somente cinco distribuições.

Tabela 2 - Seleção de modelos para a análise de viabilidade celular dos fibroblastos (CCD). Ribeirão Preto, 2017.

Distribuições	AIC	Distribuições	SBC
WEI3	1302,21	WEI3	1308,38
BCCGo	1303,03	LO	1310,68
SN2	1303,45	BCCGo	1312,29
GG	1303,81	SN2	1312,71
LO	1304,51	GG	1313,07
BCPEo	1304,95	PE	1314,52

Nota: Alaike Generalizado; critério de Informação Bayesiana

Por ambos os critérios podemos observar que a distribuição Weibull (WEI3) apresentou o melhor resultado sendo, portanto, a distribuição escolhida (Tabela 2).

No gráfico 2 temos a sobreposição da densidade Weibull sobre a distribuição real dos dados. A aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk sobre os resíduos do modelo evidencia a adequação do ajuste ($W = 0,99251$, $p\text{-valor} = 0,6523$).

Gráfico 2 – Sobreposição da densidade Weibull sobre a distribuição das células CCD.

Fonte: O próprio autor.

A distribuição Weibull (WEI3), dada em Stasinopoulos, Rigby e Akantziliotou (2008), denotada por WEI3 (μ , σ) apresenta a seguinte função densidade de probabilidade

$$f_Y(y|\mu, \sigma) = \frac{\sigma}{\beta} \left(\frac{y}{\beta} \right)^{\sigma-1} \exp \left\{ - \left(\frac{y}{\beta} \right)^{\sigma} \right\} \quad (8)$$

Onde y é uma variável que assume valores estritamente positivos ($y > 0$), μ é a média da distribuição ($\mu > 0$), σ é o parâmetro de dispersão ($\sigma > 0$) e $\beta = \mu / \Gamma(\frac{1}{\sigma} + 1)$. A função de ligação entre os parâmetros e as variáveis independentes é a função log, ou seja, $g_1(\mu) = \log(\mu)$ e $g_2(\sigma) = \log(\sigma)$.

Para analisar a porcentagem de liberação de β -hexosaminidase pelos mastócitos (RBL-2H3), após serem tratados com NLS-CT e CT em diferentes concentrações, foi utilizada a distribuição Beta. No gráfico 3 temos a distribuição dos dados.

Gráfico 3 – Sobreposição da densidade Beta sobre a distribuição de porcentagem de liberação de β -hexosaminidase pelos mastócitos.

Fonte: O próprio autor.

A aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk sobre os resíduos do modelo evidencia a adequação do ajuste ($W = 0,992$, $p\text{-valor} = 0,0537$).

Para a análise entre as distintas doses de CT sobre a viabilidade celular dos mastócitos foi aplicado o teste não paramétrico para análises

3.3. Etapa 3: Estudos *in vivo*

Para atestar a segurança das formulações, foram realizados teste de toxicidade sistêmica. Por tratar-se de roedores, a via oral foi aventada quanto a uma possível porta de entrada da formulação e exames complementares foram considerados importantes.

As recomendações são observações em 24, 48 e 72 horas, após a administração do produto (ANVISA, 2013). No entanto, optou-se por avaliar os animais durante 21 dias, diariamente, complementando, assim, os dados para os estudos de doses repetidas.

Ainda, segundo a ANVISA (2013), é importante e recomendável a avaliação da tolerância local pela própria via terapêutica pretendida, que neste caso foi a pele dos camundongos.

3.3.1. Toxicidade da formulação

Para este teste de toxicidade optou-se por aplicar a Formulação com 30 mg/100g NLS-CT (CT/gel), topicamente na região dorsal de cinco (n=5) camundongos machos (7 a 8 semanas com 20 - 25 gramas), linhagem BALB, diariamente, por 21 dias. Como controle, três (n=3) camundongos foram criados nas mesmas condições sanitárias, sem receber a aplicação tópica e em caixa separada. Os passos metodológicos utilizados neste estudo estão ilustrados na figura 1.

Figura 1 - Esquema do estudo de toxicidade.

Fonte: O próprio autor.

Foram avaliados peso, consumo alimentar, vivacidade e mobilidade dos animais, além de reação cutânea local (APÊNDICE 2). A área de aplicação da formulação está representada na figura 2.

Figura 2- Ilustração em D0 do local de tricotomia para posterior aplicação da formulação.

Fonte: O próprio autor.

A tricotoma foi realizada em todos os animais antes da primeira aplicação para garantir que a formulação atingisse a pele e não ficasse totalmente retida nos pelos no grupo experimental e, no grupo controle, para assegurar que este procedimento não seria motivo de confusão numa possível reação cutânea e interferisse na avaliação.

3.3.1.1. Parâmetros sanguíneos

No D21 foram coletas amostras de sangue para avaliação de toxicidade renal (ureia, creatinina) e hepática (transaminase glutamino-pirúvica - TGP, fosfatase alcalina – FA e proteínas totais), por punção cardíaca, após anestesia com cetamina (50mg/mL - 100 mg/kg de peso) e xilazina (20mg/mL - 10 mg/kg de peso), intraperitoneal, conforme ilustrado na Figura 1.

Foi realizada bioquímica seca na Clínica Veterinária Univet, em Ribeirão Preto, devido ao pequeno volume sanguíneo dos camundongos. O sangue, após a coleta, foi inserido em *Eppendorfs* de 1,5 mL cada, sem a adição de nenhuma substância, acondicionado em temperatura ambiente e encaminhado para análise no mesmo dia.

3.3.1.2. Análises histológicas

Após a realização do deslocamento cervical e certificação da morte dos camundongos, foram coletas amostras de tecido cutâneo (área tratada com formulação ou sem tratamento), fígado, rins, pulmão e coração, para avaliação histológica.

As biópsias foram tratadas conforme Andrade et al. (2011), seguindo uma sequência de fixação, lavagem, desidratação, diafanização, inclusão de parafina, corte, desparafinização, hidratação, coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e, para a pele, onde era importante a avaliação de colágeno, optou-se por corar também com *Picrosirius red*. A distância entre os cortes foi de 25 µm e as fotomicrografias foram realizadas no microscópio Leica DM 4100B (Alemanha)

Nas lâminas coradas em HE, foram feitas análises qualitativas. Após coloração com *Picrosirius red*, foram capturadas imagens através de luz polarizada, com o objetivo de analisar quantitativamente o colágeno. O recurso utilizado para tal finalidade foi o *Plugin “Cell Counter”* do *software* ImageJ 1.45 (Figura 3).

Figura 3 - Processo de quantificação de colágeno pelo ImageJ.

Fonte: O próprio autor.

3.3.1.3. Análise estatística

Nos estudos de toxicidade da formulação os dados relativos ao peso foram expressos pela média, desvio-padrão, variância, mínimo e máximo. Na tabela 3 temos a aplicação dos

critérios AIC para a seleção da distribuição mais adequada de probabilidade para a variável peso no neste estudo de toxicidade da formulação.

Tabela 3 – Seleção de modelos para a análise do peso dos camundongos no estudo de toxicidade da formulação. Ribeirão Preto, 2017.

Distribuição	AIC
LO	126,54
WEI3	127,07
GA	127,98
SN2	127,99
BCCGo	128,00

Fonte: O próprio autor.

Podemos observar que a distribuição Logística (LO) apresentou o melhor resultado sendo, portanto, a distribuição escolhida.

No gráfico 4 temos a sobreposição da densidade LO (μ, σ) sobre a distribuição dos dados. A aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk sobre os resíduos do modelo evidencia a adequação do ajuste ($W = 0,97926$, $p\text{-valor} = 0,7778$).

Gráfico 4 – Sobreposição da densidade Logística (LO) sobre a distribuição do peso dos camundongos no estudo de toxicidade da formulação.

Fonte: O próprio autor

A distribuição LO (μ, σ), dada em Stasinopoulos, Rigby e Akantziliotou (2008), é definida pela seguinte expressão:

$$f(y|\mu, \sigma) = \frac{1}{\sigma} e^{-\frac{y-\mu}{\sigma}} [1 + e^{-\frac{y-\mu}{\sigma}}]^{-2} \quad (9)$$

Onde $-\infty < y < \infty$, $-\infty < \mu < \infty$, e $\sigma > 0$. A função de ligação entre os parâmetros e as variáveis independentes é dada respectivamente por $g_1(\mu) = \mu$ e $g_2(\sigma) = \log(\sigma)$.

Para o consumo alimentar e ingesta hídrica, os dados foram apresentados em função da média.

Quanto aos parâmetros sanguíneos, os dados foram apresentados em termos de da média, desvio-padrão, mínimo, máximo, variância e mediana, por grupo analisado. Dada a independência dos grupos, tamanho amostral e comportamento das variáveis, optou-se pelo teste não paramétrico de Mann-Withney. Como havia um estudo na literatura que apresentava uma média dos marcadores sanguíneos aqui observados, optou-se por realizar o teste de Wilcoxon para observar se as médias eram iguais entre as observadas no grupo tratamento e a literatura (H_0). Para TGP $48,60 \pm 7,58$, creatinina $0,12 \pm 0,03$, ureia $41,98 \pm 10,77$ e proteínas totais $4,76 \pm 0,39$ (SPINELLI et al., 2012) e para fosfatase alcalina 210,43 (ALMEIDA et al., 2008).

Para a porcentagem de colágeno, em cada lâmina corada com *Picrosirius red* foram fixados três cortes e feitas duas (2) fotos de cada um, totalizando seis (6) fotos de cada lâmina para posterior tratamento estatístico. Os dados foram apresentados considerando a média, mediana, desvio-padrão, mínimo e máximo (Tabela 4).

Tabela 4 – Seleção de modelos para a análise da % de colágeno na pele dos camundongos no estudo de toxicidade da formulação. Ribeirão Preto, 2017.

Distribuições	AIC
BE	-150,29
LOGITNO	-149,82
BEINF1	-148,29
BEOI	-148,29
BEZI	-148,29
BEINF0	-148,29
GB1	-146,66
BEINF	-146,29

Fonte: O próprio autor.

Para a análise dos dados do porcentual de colágeno foi utilizada a distribuição Beta. No gráfico 5 temos a sobreposição da densidade Beta sobre a distribuição dos dados.

Gráfico 5 - Sobreposição da Densidade Beta (BE) sobre a distribuição da porcentagem de colágeno na pele dos camundongos no estudo de toxicidade da formulação.

Fonte: O próprio autor.

A aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk sobre os resíduos do modelo evidencia a adequação do ajuste ($W = 0,9981$, $p\text{-valor} = 0,8363$). Foi realizada uma análise destes dados pelos modelos mistos e o diagnóstico deste modelo está apresentado no gráfico 6.

Gráfico 6 – Diagnóstico do Modelo Misto para a variável colágeno no estudo de toxicidade da formulação.

Fonte: O próprio autor.

A análise dos resíduos mostrou que o modelo está adequado, os pontos estão aleatoriamente dispersos ao longo do 0 (Gráfico 6B) e os pontos estão alinhados de forma linear ao longo da reta quando os quartis da amostra são analisados em função de quartis teóricos (Gráfico 6D).

3.3.2. Estudo de indução de radiodermite

Para a escolha do modelo animal, camundongos BALB, levou-se em consideração o problema em investigação: a radiodermite. Conforme observou Haston (2012) em seu estudo com diferentes linhagens de camundongos, os da linhagem BALB são mais sensíveis à radiação ionizante (RI).

Para tanto, camundongos machos (7 a 8 semanas com 20 - 25 gramas) da linhagem BALB foram irradiados com as doses de 6, 10, 15, 20 Gy (n=25, cinco em cada dose), 25 Gy (n=3, três animais) e 30 Gy (n=2, dois animais), com fração única, após anestesia com cetamina (50mg/mL – 80 mg/kg de peso) e xilazina (20mg/mL – 10 mg/kg de peso) intraperitoneal e tricotomia da pata posterior esquerda (Figura 4).

Reitera-se que cada grupo foi independente e somente após o término de 21 dias de análise outro grupo foi iniciado. A única exceção ocorreu no momento do teste das doses 25 Gy e 30 Gy, pois dois animais que receberam 20 Gy apresentaram radiodermite G1 no D16 e outro no D14. O intuito era de estabelecer uma dose que provocasse radiodermite sem comprometer a integridade sistêmica

Figura 4. Fotografia do camundongo um (1) no D0, após anestesia e tricotomia para iniciar a radiação da pata posterior esquerda.

Fonte: O próprio autor.

Para o procedimento de irradiação foi utilizado equipamento de Ortovoltagem, fabricante Siemens Medical, modelo Stabilipan, energia 80 kVp, e corrente de 20 mA, com campo aberto com diafragma de 10 x 10cm, e campo colimado com placa de chumbo de 1,5 x 1,5 cm, a uma distância fonte superfície de 35 cm (Figura 4).

Na figura 5 podemos observar o posicionamento dos animais. O equipamento de raios-X de baixa e média energia ilustrado é utilizado para tratar lesões superficiais em seres humanos. Para garantir uma maior dose na pele dos camundongos, foi o escolhido para o desenvolvimento deste projeto.

Figura 5 - Posicionamento dos camundongos para a administração da RI.

Fonte: O próprio autor.

Nesta etapa também foram avaliados peso, consumo alimentar, vivacidade e mobilidade dos animais, além do tempo de desenvolvimento de radiodermite e graduação da mesma, conforme instrumento apresentado no Apêndice 3.

Os procedimentos metodológicos adotados neste estudo estão representados na figura 6.

Figura 6 - Esquema do estudo piloto de indução de radiodermite.

Fonte: O próprio autor.

Após 21 dias de avaliação, todos os animais foram submetidos à anestesia com cetamina (50mg/mL – 80 mg/kg de peso) e xilazina (20mg/mL – 10 mg/kg de peso) intraperitoneal, para posterior deslocamento cervical. A morte foi constatada através de reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal, frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR).

3.3.2.1. Análise estatística

No estudo de indução de radiodermite os dados relativos ao peso dos animais foram apresentados de forma descritiva com medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio-padrão e variância); o consumo de ração e de água através da média.

Na tabela 5 temos a aplicação dos critérios AIC e SBC para a seleção da distribuição mais adequada de probabilidade para a variável peso. Por ambos os critérios podemos observar que a distribuição Inversa Gamma (IGAMMA) apresentou o melhor resultado sendo, portanto, a distribuição escolhida.

Tabela 5 – Seleção de modelos para a análise do peso dos camundongos no estudo de indução de radiodermite. Ribeirão Preto, 2017.

Distribuição	AIC
IGAMMA	515,70
IG	515,70
LOGNO	515,71
GA	515,94
SN2	517,33

Fonte: O próprio autor.

No gráfico 7 temos a sobreposição da densidade da distribuição Inversa Gamma (IGAMMA) sobre a distribuição dos dados.

Gráfico 7 – Sobreposição da densidade distribuição Inversa Gamma (IGAMMA) sobre a distribuição dos pesos dos camundongos no estudo de indução de radiodermite.

Fonte: O próprio autor.

A aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk sobre os resíduos do modelo evidencia a adequação do ajuste ($W = 0,97926$, $p\text{-valor} = 0,7778$).

A distribuição IGAMMA (μ, σ), dada em Stasinopoulos, Rigby e Akantziliotou (2008), é definida pela seguinte expressão:

$$f(y|\mu, \sigma) = \frac{[\mu(\alpha + 1)]^\alpha}{\Gamma(\alpha)} y^{-(\alpha+1)} \exp \left[-\frac{\mu(\alpha + 1)}{y} \right] \quad (10)$$

Onde $\alpha = 1/\sigma$ com $y > 0$, $\mu > 0$ e $\sigma > 0$. A função de ligação entre os parâmetros e as variáveis independentes é dada respectivamente por $g_1(\mu) = \log(\mu)$ e $g_2(\sigma) = \log(\sigma)$.

Foi realizada uma análise destes dados pelos modelos mistos e o diagnóstico deste modelo está apresentado no gráfico 8.

Gráfico 8 - Diagnóstico do Modelo Misto para a variável peso (g) no estudo de indução de radiodermite.

Fonte: O próprio autor.

Quanto à radiodermite, os resultados desta etapa foram expressos sob a forma de probabilidade de desenvolvimento, graficamente.

3.3.3. Estudo dose-resposta

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito das três Formulações (5; 17,5 e 30 mg) na prevenção e tratamento de radiodermite induzida nos camundongos. Para alcançar tal objetivo também foram utilizados camundongos machos (7 a 8 semanas com 20 - 25 gramas), também da linhagem BALB. Os animais foram irradiados com 30 Gy, em dose única, dose esta que apresentou maior probabilidade de desenvolvimento de radiodermite, conforme observado no estudo anterior de indução.

Foi utilizado um programa de aleatorização (*Random Free*) dos animais (ANEXO 1) nos tempos necessários para as análises do estudo (D7, D14, D21 e D28). Seguiu-se a mesma sequência para todos os grupos, só a título de comparação e operacionalização.

Inicialmente foram previstas avaliações também no D2 e com tempo total de 21 dias. Após o estudo de indução observou-se que não havia nenhuma alteração macroscópica e nem comportamental dos animais no D2 e, no D28, a epilação e eritema ainda estavam presentes. Optou-se, portanto, por estender o prazo de avaliação em uma semana e retirar as análises do D2. Foram escolhidos intervalos de sete dias por que são comumente utilizados em avaliações do processo inflamatório (WAMBIER et al., 2016).

Quaisquer efeitos mecânicos da administração foram considerados e tal enfoque foi alvo de discussão, devido às diferenças inerentes entre as espécies. Este fato permitiu algumas inferências quanto à distinção entre os efeitos mecânicos e as ações físico-químicas, toxicológicas ou farmacodinâmicas da formulação.

Antes da radiação, todos os animais foram submetidos à anestesia com cetamina (50mg/mL – 80 mg/kg de peso) e xilazina (20mg/mL – 10 mg/kg de peso) intraperitoneal e a tricotomia na pata posterior esquerda que seria irradiada, do mesmo modo que foi feito no estudo de indução de radiodermite.

Para assegurar que a dose fosse aplicada no local esperado, os animais foram fixados com fitas adesivas numa base acrílica, sob uma placa de chumbo moldável, que permitia que somente uma área de 1,5 x 1,5 cm da pata posterior esquerda ficasse exposta. O tempo de irradiação foi de 47,22 minutos. Foi utilizado o mesmo equipamento de Ortovoltagem, fabricante Siemens Medical, modelo Stabilipan, energia 80 kVp, e corrente de 20 mA, com campo aberto com diafragma de 10 x 10cm, e campo colimado com placa de chumbo de 1,5 x 1,5 cm, a uma distância fonte superfície de 35 cm (Figura 4), sendo a taxa de dose de 39,82 cGy/min.

Nos grupos experimentais os animais receberam aplicação tópica de gel à base de NLS-CT de 5 mg (E1), 17,5 mg (E2) ou 30 mg (E3); no grupo controle da formulação (CF), gel à base de NLS, imediatamente após a radiação. Seguiram com uma aplicação diária, por até 28 dias. No grupo controle da radiação (CR), nenhum camundongo recebeu tratamento tópico local. Cada grupo foi mantido em caixas separadas para garantir que nenhum animal de grupos diferentes entrasse em contato com o produto de forma acidental.

Nesta etapa também foram avaliados peso, consumo alimentar, vivacidade e mobilidade dos animais. As áreas irradiadas foram avaliadas quanto à descamação seca, descamação úmida, edema, hiperemia, sangramento e necrose, através da escala tipo Likert da *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) (APÊNCIDE 4) e quanto à hiperpigmentação. As fotografias foram tiradas com a mesma máquina e os animais numerados segundo grupo de tratamento, nas datas pré-estabelecidas no cronograma de avaliações (Figura 7).

Os passos metodológicos adotados neste estudo estão representados de forma resumida na figura 7 nos dias D0-D28.

Figura 7 - Esquema do estudo dose-resposta

Fonte: O próprio autor.

As avaliações por foto foram realizadas no D0, para todos os animais e no momento do sacrifício, nos tempos preestabelecidos pelo programa de aleatorização (ANEXO A). Este procedimento foi adotado para evitar sedações desnecessárias e sofrimento dos animais.

Todos foram anestesiados com cetamina (50mg/mL – 80 mg/kg de peso) e xilazina (20mg/mL – 10 mg/kg de peso) intraperitoneal para posterior deslocamento cervical, de acordo com a aleatorização estabelecida. Após a confirmação da morte do animal, através de reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal, frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR), biópsias cutâneas foram coletadas.

O tecido foi submetido a dois diferentes procedimentos. Primeiramente a pele da área tratada foi dividida em quatro quadrantes, sendo o quadrante superior direito transportado em *Eppendorfs* de 2 mL, em gelo seco, e mantidos em *freezer* -70°C até o momento das análises de citocinas; os outros quadrantes foram mantidos em formol para a fixação, parafinização, corte e coloração.

3.3.3.1. Análises histológicas

As biópsias cutâneas foram tratadas conforme Andrade et al. (2011), seguindo a mesma sequência e coloração em HE e Picrosirius red utilizadas no estudo de toxicidade.

Foram quantificadas imagens capturadas padronizando-se a objetiva, a intensidade da luz do microscópio e a altura do condensador (ANDRADE et al., 2011). O recurso utilizado para tal finalidade será o *Plugin “Cell Counter”* do *software* ImageJ 1.45 para avaliação simultânea do infiltrado inflamatório, fibroblastos e vasos sanguíneos, após secções coradas com HE.

Para a avaliação quantitativa das imagens da colagênese, foram capturadas imagens após secções coradas com Picrosirius red (coloração vermelha para colágeno), de acordo com a Figura 3. Foram feitos três (3) cortes de cada bloco e capturadas duas (2) fotos de cada corte, totalizando seis (6) fotos por animal. A distância entre cada corte foi de 25 µm.

3.3.3.2. Análise de citocinas

Para o padrão de expressão da resposta inflamatória das formulações de NLS-CT, as amostras da pele de todos os animais, incluindo grupo controle da radiação, da formulação e experimentais foram homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador de alto cisalhamento da marca IKA (IKAT 10 Basic UltraTurrax) em solução Tampão Fosfato Salina (PBS) contendo 0,4M de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina bovina sérica (BSA), 0,1mM de fenil-metil-sulfonil fluoride, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI ml⁻¹ aprotinina (Sigma).

Após a homogeneização, estas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi utilizado para quantificar citocinas pró inflamatórias IL-1 β , IL-6, o FNT- α , a anti-inflamatória IL-10 e o KC, pelo *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Foram adicionados 250 μ L de cada sobrenadante num poço de uma placa de 96 poços, adicionados 50 μ L de cada anticorpo de interesse (IL-1 β , IL-6, FNT- α , IL-10 e KC), incubados a 4°C por toda à noite.

No dia seguinte, as placas foram lavadas e incubadas por 2 horas com uma solução a 1% de albumina bovina, no intuito de evitar ligações inespecíficas. Após esse bloqueio e lavagem das placas, as curvas-padrão em várias diluições, ou as amostras (em triplicata) foram adicionadas nas placas as quais foram incubadas a 4°C por 24 h. As placas foram lavadas três vezes com tampão e os anticorpos policlonais biotinilados diluídos 1/2.000 foram adicionados (100 μ L/poço). Após incubação em temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 50 mL de avidina-HRP diluídas 1:5000, foram adicionados. Trinta minutos após, 50 ml do reagente colorido dihidrocloro 1,2-fenilenodiamina (OPD) (OrtofelilenoDiamina, Sigma-Aldrich) (solução 0,4 mg OPD – 0,4 mL H₂O₂ – 1 mL tampão) foram adicionados e as placas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente, por 15-20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ (1 M , 50 μ L poço) e as absorbâncias determinadas em 490 nm. Os resultados foram obtidos comparando a densidade óptica com as densidades das curvas padrões (CUNHA et al., 2000).

3.3.3.3. Análise estatística

Quanto ao peso, estes dados foram apresentados de forma descritiva com medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio-padrão e variância); o consumo de ração e de água através da média.

Na tabela 6 ilustramos a aplicação dos critérios AIC para a seleção da distribuição mais adequada de probabilidade para a variável peso.

Tabela 6 – Seleção do modelo para o peso dos camundongos no estudo dose-resposta. Ribeirão Preto, 2017.

Distribuição	AIC
WEI3	933,33
SN2	936,17
GG	936,47
BCCGo	936,96
SEP4	939,40

Fonte: O próprio autor.

Podemos observar que a distribuição Weibull (WEI3) apresentou o melhor resultado sendo, portanto, a distribuição escolhida para a variável peso.

No gráfico 9 temos a sobreposição da densidade Weibull sobre a distribuição dos dados. A aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk sobre os resíduos do modelo evidencia a adequação do ajuste ($W = 0,9837$, $p\text{-valor} = 0,1626$).

Gráfico 9 – Sobreposição da densidade Weibull sobre a distribuição dos pesos dos camundongos no estudo dose-resposta.

Fonte: O próprio autor.

Foi realizada uma análise destes dados pelos modelos mistos e o diagnóstico deste modelo está apresentado no gráfico 10.

Gráfico 10 - Diagnóstico do Modelo Misto para a variável peso (g) no estudo dose-reposta.

Fonte: O próprio autor.

A análise dos resíduos mostrou que o modelo está adequado, os pontos estão aleatoriamente dispersos ao longo do 0 (Gráfico 10B) e os pontos estão alinhados de forma linear ao longo da reta quando os quartis da amostra são analisados em função de quartis teóricos (Gráfico 10D).

A variável resposta do estudo, o grau de Radiodermite, foi avaliada através de um escore ordinal com valores inteiros de 0 a 4, onde 0 indica ausência de lesão e 4 é o grau mais elevado.

Para a avaliação de dados com medidas repetidas, foi utilizada a classe de Equações de Estimação Generalizadas (EEG), desenvolvida por Liang e Zeger (1986). Essa classe é uma extensão da classe de Modelos Lineares Generalizados (NELDER; WEDDERBURN, 1972) que consiste em modelar, separadamente, os parâmetros da regressão e da correlação intra-sujeitos. Uma extensão desta classe para permitir a modelagem de respostas com distribuição Multinomial (respostas nominais e ordinais) foi proposta por Touloumis, Agresti e Kateri (2013).

Seguindo-se a definição de Touloumis, Agresti e Kateri (2013), seja Y_{it} um vetor de resposta para o sujeito i ($i = 1, \dots, N$) no tempo t ($t = 1, \dots, T$) que toma valores em $(1, 2, \dots, J)$, $J > 2$ indica o número de categorias da variável resposta. Seja o vetor de respostas dado pela equação:

$$Y_i = (Y_{i11}, \dots, Y_{i1(J-1)}, Y_{i21}, \dots, Y_{i2(J-1)}, \dots, Y_{iT1}, \dots, Y_{iT(J-1)})^T \quad (11)$$

Onde $Y_{it} = 1$ se a resposta para o sujeito i no tempo t cai na categoria j e $Y_{it} = 0$ caso contrário. Seja x_{it} o vetor de covariáveis associadas com Y_{it} e seja $x_i = (x_{i1}^T, \dots, x_{iT}^T)^T$ a matriz de covariáveis para o sujeito i . Defina $\pi_{itj} = E(Y_{itj}|x_i) = P(Y_{itj} = 1|x_i) = P(Y_{it} = j|x_i)$ como a probabilidade de resposta da categoria j do sujeito i no tempo t , e seja $\pi_i = (\pi_{i1}^T, \dots, \pi_{iT}^T)^T$ o vetor de médias de Y_i , onde $\pi_{it} = (\pi_{it1}^T, \dots, \pi_{it(J-1)}^T)^T$. Segue das restrições que $Y_{itj} = 1 - \sum_{j=1}^{J-1} Y_{itj}$ e $\pi_{itJ} = 1 - \sum_{j=1}^{J-1} \pi_{itj}$.

Também é necessário realizar a escolha de uma função de ligação entre a variável resposta e as variáveis independentes do modelo. Como a natureza da variável resposta é uma variável resposta ordinal, as opções de função de ligação possíveis são: logito, probito e cauchit. A função de ligação logito, empregada neste estudo, é dada por:

$$\text{logito}[P(Y_{itj} \leq j|x_i)] = \beta_{0j} + \beta_*^T x_{it} \quad (12)$$

Onde $\beta_{0j}: j = 1, \dots, J-1$ são os interceptos das categorias específicas e β é o vetor de regressão das variáveis independentes.

Por fim, também é necessário especificar a estrutura de correlação entre os tempos e os sujeitos. Touloumis, Agrest e Kateri (2013) definiu o parâmetro α como o vetor de parâmetros que contém a estrutura das razões de Odds marginalizadas. O vetor é dado por:

$$\alpha = (\theta_{1121}, \dots, \theta_{1(J-1)2(J-1)}, \dots, \theta_{(T-1)1T1}, \dots, \theta_{(T-1)(J-1)T(J-1)}) \quad (13)$$

Onde $\theta_{tjt'j'}$ é a razão de odds local para o par (t, t') com $t < t'$. O número total de pares de tempos é dado por $L = T*(T-1)/2$. A razão de odds local, sob a estrutura mais geral denominada como RC (BECKER; CLOGG, 1989), satisfaz a equação:

$$\log(\theta_{tjt'j'}) = \phi^{tt'}(\mu_{tj}^{tt'} - \mu_{t(j+1)}^{tt'})(\mu_{t'j'}^{tt'} - \mu_{t'(j'+1)}^{tt'}) \quad (14)$$

Onde $\mu_j^{(t,t')}: j = 1, \dots, J-1$ são os parâmetros de escores para a categoria de resposta J no par de tempo (t, t') e $\phi^{tt'}$ que mede a associação média das tabelas de contingência marginalizadas., Toulomis (2013, 2015) também apresenta as estruturas Uniforme (constante no tempo e categorias), Permutável no Tempo (constante nas categorias) e Permutável nas categorias (constante no tempo).

A razão de Odds local são calculados em cada ponto (j, j') das tabelas de contingência marginalizadas para cada par de tempo (t, t') com $t < t'$. A Matriz completa é dada por:

$$\begin{bmatrix} 0 & \theta_{12} & \dots & \theta_{1T} \\ \theta_{21} & 0 & \dots & \theta_{2T} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \theta_{T1} & \theta_{T2} & \dots & 0 \end{bmatrix}$$

Onde cada bloco $\theta_{tt'}$ denota uma matriz $(J-1) \times (J-1)$ e o elemento (j, j') da matriz $\theta_{tt'}$ representa a estimativa de $\theta_{tjt'j'}$.

Ainda, a variável dependente Grau de Radiodermite é um escore ordinal que assume valores de 0 a 4, onde quanto maior o valor pior a lesão. Para esta variável foi assumido que ela segue, em cada tempo, uma distribuição Multinomial.

Seja Y_{it} uma resposta multinomial para o sujeito i ($i = 1, \dots, N$) no tempo t ($t = 1, \dots, T$) que toma valores em $(1, 2, \dots, J)$, $J > 2$. Seja o vetor de respostas dado por:

$$Y_i = (Y_{i11}, \dots, Y_{i1(J-1)}, Y_{i21}, \dots, Y_{i2(J-1)}, \dots, Y_{iT1}, \dots, Y_{iT(J-1)})^T \quad (11)$$

Onde $Y_{it} = 1$ se a resposta para o sujeito i no tempo t cai na categoria j e $Y_{it} = 0$ caso contrário. Seja x_{it} o vetor de covariáveis associadas com Y_{it} e seja $x_i = (x_{i1}^T, \dots, x_{iT}^T)^T$ a matriz de covariáveis para o sujeito i . Defina $\pi_{itj} = E(Y_{itj}|x_i) = P(Y_{itj} = 1|x_i) = P(Y_{it} = j|x_i)$ como a probabilidade de resposta da categoria j do sujeito i no tempo t , e seja $\pi_i = (\pi_{i1}^T, \dots, \pi_{iT}^T)^T$ o vetor de médias de Y_i , onde $\pi_{it} = (\pi_{it1}^T, \dots, \pi_{it(J-1)}^T)^T$. Segue das restrições que $Y_{itJ} = 1 - \sum_{j=1}^{J-1} Y_{itj}$ e $\pi_{itJ} = 1 - \sum_{j=1}^{J-1} \pi_{itj}$.

As medidas foram realizadas em 60 camundongos, divididos em cinco (5) grupos (CR, CF, E1, E2 e E3), com 12 camundongos em cada um deles. A avaliação da radiodermite foi

realizada de forma diária. O experimento foi conduzido ao longo de 28 dias. A cada 7 dias, 3 camundongos de cada grupo foram sacrificados para a coleta de outras variáveis não analisadas neste teste. Ou seja, nos dias 1 a 7 participaram 12 camundongos, nos dias 8 a 14 foram 9 camundongos, dias 15 a 21 são 6 camundongos e nos últimos 7 dias (21 a 28) 3 camundongos em cada grupo.

Para a realização da análise dos dados acerca do colágeno foi utilizado o programa R (R Core Team, 2017) versão 3.4.1 através da biblioteca GAMLSS (STASINOPOULOS; RIGBY, 2007). A classe de Modelos Aditivos Generalizados para Posição, Escala e Forma (GAMLSS em inglês) é adequada, para modelagem da variável resposta quando ela não segue uma distribuição da família exponencial e nos casos em que o regressando exibe heterogeneidade, ou seja, quando a escala ou a forma da distribuição da variável resposta mudam com as variáveis explanatórias (FLORÊNCIO, 2010). Esta análise já foi mencionada no estudo de toxicidade.

Para analisar a relação entre os dados das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, KC e FNT- α e as variáveis independentes Grupo (CP, CR, CF, E1, E2 e E3) e Dia (D7, D14, D21 e D28) foi utilizado o método denominado por Equações de Estimação Generalizadas (EEG). Este método é considerado uma extensão dos Modelos Lineares Generalizados (MLG), no sentido de que aproveita a estrutura dos mesmos e acrescenta uma estrutura de correlação entre as medidas repetidas.

As EEG foram desenvolvidas para produzir estimativas mais eficientes e não viciadas para os parâmetros do modelo de regressão quando se lida com dados correlacionados, pois considera a estrutura de correlação entre as observações (AGRAGONIK, 2009).

Essa matriz de correlação para modelar a correlação intra-sujeito é denominada como “Matriz Trabalho” (PAULA, 2010) e foi especificada por Liang e Zeger (1986) com o intuito de modelar a correlação das medidas intra-sujeitos e é incorporada no termo da variância das estimativas dos parâmetros. Como as observações foram coletadas ao longo do tempo optou-se por utilizar a estrutura de correlação Auto-regressiva de Ordem 1 (AR1).

A partir dos modelos ajustados nessa etapa foram calculados, através do método Delta (OEHLERT, 1992), as estimativas dos valores médios e desvios padrões separados por Grupo e Tempo para cada uma das variáveis estudadas (IL-1 β , IL-6, IL-10, KC e FNT- α).

A distribuição Gamma foi assumida para a variável dependente. Para verificar a adequação da mesma foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. No caso de inadequação da mesma optou-se pela aplicação da transformação de box-cox (BOX, 1964). Para a análise de regressão foi utilizado o programa R (R Core Team, 2017) versão 3.4.1 através da função geese

da biblioteca geepack. Em todas as análises foi utilizado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0.05$).

Podemos observar as distribuições de cada uma das citocinas analisadas. Os dados obtidos para a IL-1 β estão ilustrados no gráfico 11.

Fonte: O próprio autor.

A distribuição dos dados não foi homogênea, conforme observado no gráfico 11 e, de acordo com os resultados obtidos na análise da função matemática, estes dados representam uma função Gamma no teste Kolmogorov-smirnov (p-valor = 0,4798).

Quanto ao FNT- α , podemos notar a distribuição desta citocina ao longo dos dias de avaliação no gráfico 12.

Gráfico 12 - Distribuição da variável FNT - α ao longo do estudo.

Fonte: O próprio autor.

Esta distribuição também não foi homogênea, conforme observado no gráfico 12 e, de acordo com os resultados obtidos, estes dados também representam uma função Gamma ($p = 0,5329$), confirmada pelo teste Kolmogorov-smirnov.

Em relação à IL-6, podemos notar a distribuição desta variável ao longo do estudo no gráfico 13.

Gráfico 13 - Distribuição da variável IL-6 ao longo do estudo.

Fonte: O próprio autor.

Uma distribuição não homogênea, conforme observado no gráfico 13, representando uma função Gamma Generalizada ($p\text{-valor} = 0,9158$), confirmada pelo teste Kolmogorov-smirnov.

A distribuição da IL-10 ao longo do estudo está ilustrada no gráfico 14.

Gráfico 14 - Distribuição da variável IL-10 ao longo do estudo.

Novamente uma distribuição não homogênea (Gráfico 14), representando uma função Gamma Generalizada ($p = 0,2461$), confirmada pelo teste Kolmogorov-smirnov.

Já a distribuição dos dados do KC está ilustrada no gráfico 15.

Gráfico 15 - Distribuição da variável KC ao longo do estudo.

Outra distribuição não homogênea (Gráfico 15), também representando uma função Gamma ($p = 0,6955$), confirmada pelo teste Kolmogorov-smirnov.

Quanto à porcentagem de colágeno, a distribuição desta variável nos diferentes grupos de tratamento no estudo dose-resposta pode ser observada no gráfico 16.

Gráfico 16 – Distribuição da porcentagem de colágeno ao longo do estudo.

Fonte: O próprio autor.

Trata-se de uma distribuição não-homogênea (Gráfico 16), representando uma distribuição Beta (BE), confirmada pelo teste Kolmogorov-smirnov.

3.4. Aspectos éticos

Este projeto foi encaminhado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – EERP-USP, protocolo nº 15.1.430.22.2, aprovado em reunião ordinária dia 31/07/2015 (ANEXO 2), por estar de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, bem como as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados de acordo com as etapas estabelecidas no método.

4.1. Etapa 1: Estudos de estabilidade

Nesta etapa compreendem as avaliações das características organolépticas das formulações desenvolvidas como cor, odor e sensação ao tato e as físico-químicas.

4.1.1. Características organolépticas

As Formulações 1, 2 e 3 contendo, respectivamente, 5 mg, 17,5 mg e 30 mg de curcuminoides nas NLS-CT [em 100 mg de gel de Natrosol®] inicialmente se apresentaram de coloração amarelada brilhante, homogêneas, com boa espalhabilidade sobre a pele, secagem rápida, sem deixar uma película visível e com odor característico do gel de hidroxietilcelulose.

As características organolépticas foram avaliadas no T0, T3 e T6 e permaneceram inalteradas ao longo destes seis meses de análise, cabendo uma ressalva para a Formulação 3 (30 mg), que na terceira avaliação (T6) apresentava-se menos brilhante (levemente opaca).

4.1.2. Características físico-químicas

As características físico-químicas avaliadas nas Formulações 1, 2 e 3 contendo, respectivamente, 5 mg, 17,5 mg e 30 mg de curcuminoides nas NLS-CT [em 100 mg de gel de Natrosol®] foram pH, comportamento reológico e teor de ativos e os resultados serão apresentados nesta ordem.

4.1.2.1. pH

O comportamento do pH das Formulações 1, 2 e 3 contendo, respectivamente, 5 mg, 17,5 mg e 30 mg de curcuminoides nas NLS-CT [em 100 mg de gel de Natrosol®], armazenadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\text{ UR}$ está representado no gráfico 17 em termos de média de cada triplicata realizada no T0, T3 e T6.

Gráfico 17 - Variações médias de pH das formulações nos tempos pré-estabelecidos.

Fonte: O próprio autor.

Após seis meses de avaliação (T6) houve uma elevação do pH em todas as formulações analisadas, sendo que as formulações 2 e 3 apresentaram pH acima de 7 no T6. A média de pH no T0, considerando todas as aferições, foi de 6,30, no T3 foi de 6,36 e no T6 de 7,07. Pode ser observada uma tendência à elevação do pH, mais acentuada na Formulação 3, que apresenta maior teor lipídico e de curcuminoides encapsulados (30 mg), após os três meses de estoque.

4.1.2.2. Reologia

As Formulações 1, 2 e 3 contendo, respectivamente, 5 mg, 17,5 mg e 30 mg de curcuminoides nas NLS-CT [em 100 mg de gel de Natrosol®] foram analisadas quanto ao comportamento reológico no T0, T3 e T6, com tempo de cisalhamento de 0 a 60 s^{-1} e de 0 a 300 s^{-1} (curva ascendente) e de $60\text{ a }0\text{ s}^{-1}$ e de $300\text{ a }0\text{ s}^{-1}$ (curva descendente), por tempo total de 120 e 600 segundos a 37°C , estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Valores referentes à viscosidade aparente, índice de fluxo e tixotropia, para as formulações estudadas no T0, T3 e T6, à 25 °C $\pm$ 3 °C / 75% $\pm$ 5 UR, nos distintos tempos de análise. Ribeirão Preto, 2016.

Reologia		60 s			300 s	
Tempo	Viscosidade [Pa*]	Índice de fluxo	Tixotropia [Pa/s]	Viscosidade [Pa]	Índice de fluxo	Tixotropia [Pa/s]
T0						
5 mg	128,256	0,165	302,763	14,718	0,577	-295.887,963
17,5 mg	123,354	0,193	493,116	38,517	0,445	-12.781,253
30 mg	130,223	0,165	347,297	36,275	1,656	2.830,874
T3						
5 mg	114,789	0,204	-323,722	43,742	0,338	-10.980,717
17,5 mg	84,008	0,234	-25,609	36,034	0,361	-13.061,475
30 mg	100,946	0,221	232,749	43,804	0,328	218,213
T6						
5 mg	107,257	0,238	539,219	26,478	0,454	-24.534,627
17,5 mg	96,990	0,256	82,575	26,223	0,450	-20.442,245
30 mg	112,974	0,219	210,054	22,000	0,490	-30.926,592

Nota: * Pascal.

Nota-se que a Formulação 2 (17,5 mg) foi a que apresentou menor viscosidade aparente e maior índice de fluxo nos diferentes tempos analisados, quando foi submetida a estresse de 60 segundos (Tabela 7).

Quando submetidos a um estresse de 300 segundos, a Formulação 3 (30 mg) sofreu a maior alteração quanto à viscosidade aparente no T3 e T6 e maior oscilação quanto à tixotropia, variando muito nos diferentes tempos avaliados (Tabela 7).

O comportamento reológico destas formulações está ilustrado nos gráficos 18 e 19 e são resultado de três análises em cada tempo. No gráfico 18 as diferentes formulações apresentaram um comportamento reológico pseudoplástico, iniciando na origem e começando a fluir logo que iniciada uma tensão de cisalhamento.

Gráfico 18. Reogramas das formulações nos tempos 0, 3 e 6 meses, de 0 a 60 s, a 37°C.

Fonte: O próprio autor.

A formulação 1 (5 mg) e a 3 (30 mg) apresentaram maior tensão de cisalhamento no T0 (Gráfico 18A), sendo que uma força maior foi empregada na mais concentrada. A formulação 3 apresentou oscilação, com um gráfico menos regular do que as demais, também no T0 (Gráfico 18A).

Gráfico 19. Reogramas das formulações nos tempos 0, 3 e 6, de 0 a 300 s, a 37°C.

Fonte: O próprio autor.

Os reogramas das diferentes formulações apresentaram um comportamento reológico pseudoplástico. Todas elas formulações apresentaram maior tensão de cisalhamento no T0 (Gráfico 19A). A formulação 3 também apresentou uma maior tensão inicial de cisalhamento (~300 Tau[Pas]).

4.1.2.3. Teor de ativo

O teor de ativo (curcumina e curcuminoides) foi avaliado no T0, T3 e T6. As Formulações 1, 2 e 3 contendo, respectivamente, 5 mg, 17,5 mg e 30 mg de curcuminoides nas NLS-CT [em 100 mg de gel de Natrosol®], armazenadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\text{ UR}$ e está representado na tabela 8.

Tabela 8 - Concentração de curcumina e curcuminoides totais nas formulações, ao longo de seis meses de análise. Ribeirão Preto, 2016.

Princípio ativo	Tempo (meses)					
	T0*		T3†		T6‡	
Curcumina	[ng/mL]	%	[ng/mL]	%	[ng/mL]	%
Formulação 1 (5 mg)	1.532,2	100,0	478,0	31,2	389,5	25,4
Formulação 2 (17,5 mg)	5.398,7	100,0	4.783,8	88,6	2.495,5	46,2
Formulação 3 (30 mg)	7.181,3	100,0	9.996,8	139,2	6.672,3	92,9
Curcuminoides						
Formulação 1 (5 mg)	2.035,7	100,0	663,5	32,6	666,5	32,7
Formulação 2 (17,5 mg)	7.031,7	100,0	6.478,8	92,1	5.295,5	75,3
Formulação 3 (30 mg)	9.586,0	100,0	13.681,4	142,7	15.114,5	157,7

Nota: * Tempo 0; † Tempo 3 (três meses); ‡ Tempo 6 (seis meses).

Observa-se uma maior perda de curcumina e curcuminoides totais na formulação 1, logo após três meses de análise. A formulação 2 apresentou uma perda de 11,4% de curcumina e de 7,9% de curcuminoides totais após três meses. Já a formulação 3, apresentou uma concentração maior destes componentes, sendo um acréscimo de 39,2 % de curcumina no T3 e de 42,7% e 57,7% de curcuminoides e no T3 e T6, respectivamente (Tabela 8).

No entanto, após seis meses de análise houve uma perda considerável, tanto de curcumina, quanto de curcuminoides totais na Formulação 1 e uma aparente concentração na Formulação 3 (Tabela 8).

4.2. Etapa 2: Estudos *in vitro*

Nesta etapa serão apresentados os resultados da viabilidade celular dos queratinócitos e fibroblastos após tratamento com NLS e o equivalente, em massa de curcuminoides encapsulados ou não em nanopartículas (NLS-CT e CT). Além deste teste, serão apresentados os dados relativos a um tratamento com as mesmas concentrações, porém os queratinócitos e fibroblastos foram submetidos a 2Gy de RI, 24 h após o início destes, que objetivou verificar se haveria alguma na viabilidade celular, após a indução deste dano.

Ainda, serão apresentados os resultados referentes aos testes de atividade alergênica das NLS-CT e dos CT em mastócitos, além de um de viabilidade celular dos mastócitos tratados com CT, como complemento das análises.

4.2.1. Ensaio de viabilidade celular com queratinócitos e fibroblastos

Os queratinócitos (HaCat) foram expostos a oito concentrações de NLS e o equivalente, em massa de curcuminoides encapsulados ou não, NLS-CT e CT, sendo elas 0,078 µg/mL, 0,156 µg/mL, 0,313 µg/mL, 0,625 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,50 µg/mL, 5,00 µg/mL e 10,00 µg/mL, por um período de 120 horas.

Em outros experimentos independentes, as HaCat foram submetidas a 2 Gy de RI 24h após o início do tratamento com as mesmas concentrações anteriormente administradas. O tempo total de exposição aos tratamentos foi o mesmo, 120 h. Foi interesse analisar se a haveria mudança na porcentagem de viabilidade celular após estas células serem submetidas à danos decorrentes da RI.

A variação desta porcentagem de viabilidade celular está apresentada no gráfico 20, conjuntamente.

Gráfico 20. Boxplots das células HaCat após os diferentes tratamentos (NLS, NLS-CT e CT), com e sem serem submetidas a 2 Gy de RI.

Fonte: O próprio autor.

Observa-se maior variação dos dados quando se analisa os tratamentos com NLS e NLS-CT nas doses acima de 0,156 $\mu\text{g/mL}$, com ou sem RI; não há a presença de dados discrepantes (*outliers*). Na dose de 0,078 $\mu\text{g/mL}$, em todos os tratamentos, a viabilidade celular foi inferior a 50%, sendo que no grupo tratado com CT, 75% apresentaram menos de 25% de viabilidade celular após RI. No geral, os tratamentos com CT apresentaram menor variabilidade nas doses testadas, sem ou após 2 Gy de RI (Gráfico 20).

No mesmo período de tratamento, as NLS e as NLS-CT foram menos citotóxicas para as HaCat, porém este comportamento é similar sem ou após a exposição à RI (Gráfico 20)

O gráfico 21 mostra a viabilidade celular das HaCat sem e após serem submetidas a 2 Gy de RI.

Gráfico 21 – Viabilidade celular de queratinócitos (HaCat) após os diferentes tratamentos.

Fonte: O próprio autor.

A menor viabilidade celular para HaCat foi observada nas concentrações 5, 000 µg/mL e 10, 000 µg/mL de CT, sendo de 8,19% e 7,94%, respectivamente (Gráfico 21A). Foi observado um crescimento acima do controle (100%) nas doses de 0,313 µg/mL a 2,5 µg/mL para as células tratadas com NLS e nas doses de 0,156 µg/mL a 1,25 µg/mL para as tratadas com NLS-CT. Observou-se uma viabilidade celular inferior a 80% em todas células tratadas com CT, nas tratadas com NLS-CT nas doses 10,000 µg/mL, 5,000 µg/mL e 0,078 µg/mL, e somente nas doses 10 µg/mL e 0,078 µg/mL com NLS. Portanto, os limites superiores e inferiores parecem estar associados a maior citotoxicidade.

Quando submetidas à 2 Gy de RI estas células apresentaram um comportamento semelhante (Gráfico 21B). A menor viabilidade celular foi observada nas células tratadas com CT e em dose mais alta (10,000 µg/mL). Todas as células tratadas com CT apresentaram

viabilidade inferior a 80%, nas tratadas com NLS-CT, esta viabilidade foi inferior a 80% nas doses 0,078 µg/mL, 0,156 µg/mL, 5, 000 µg/mL e 10,000 µg/mL; já para as NLS somente nos extremos, 0,078 µg/mL e 10,000 µg/mL, comportamento semelhante ao anteriormente analisado.

Após ajuste do modelo *Skew Exponential Power type 2 distribution* (SEP2) e análise dos resíduos pelo teste de normalidade Shapiro Wilk foi realizada uma análise de regressão entre a variável dependente (viabilidade das HaCat) e as independentes (dose, grupo e RI), quanto à média e dispersão dos valores obtidos. Estes resultados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Análise de regressão para a linhagem HaCat, antes e após a RI, considerando média e dispersão dos valores obtidos. Modelo ajustado *Skew Exponential Power type 2 distribution* (SEP2). Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	Erro padrão	t valor	Pr(> t)
Média				
Intercepto	22,2510	4,1015	5,4250	0,0000
Dose – 0,156	23,2962	6,5327	3,5661	0,0005
Dose – 0,313	33,4217	5,5195	6,0552	0,0000
Dose – 0,625	32,8471	4,3733	7,5109	0,0000
Dose – 1,250	19,8504	5,0373	3,9407	0,0001
Dose – 2,500	5,4938	4,3069	1,2756	0,2043
Dose – 5,000	-2,0060	5,7897	-0,3465	0,7295
Dose – 10, 000	-26,1939	5,4869	-4,7739	0,0000
Radiação (Com)	-4,8860	3,2393	-1,5083	0,1338
Grupo – NLS	19,5955	2,0289	9,6583	0,0000
Grupo - NLS-CT	13,9540	2,9719	4,6953	0,0000
Dispersão				
Intercepto	2,9648	0,0467	63,4587	0,0000
Grupo – NLS	1,1125	0,0534	20,8252	0,0000
Grupo - NLS-CT	0,9861	0,0593	16,6314	0,0000

Podemos inferir que houve diferença em relação à média das avaliações entre a menor dose (0,078 µg/mL) e as demais de tratamento, sendo as porcentagens médias de viabilidade celular maiores do que na menor dose, cabendo exceção para 2,500 µg/mL e 5,000 µg/mL (p-valor = 0,2043 e p-valor = 0,729, respectivamente). Entre os grupos de tratamento esta diferença entre as médias também foi significativa, sendo as viabilidades celulares médias maiores nos grupos tratados com NLS-CT e NLS do que nos tratados com CT (Tabela 21). Todavia, não houve diferença (p = 0,1338) na viabilidade das células submetidas a 2 Gy de RI, em relação à média das células não irradiadas (Tabela 9).

Podemos observar que houve efeito da dispersão entre os valores obtidos nos tratamentos com NLS e as NLS-CT, em relação aos CT, sendo maior a variabilidade daqueles quando comparados a este (Tabela 9).

Dado ao desenho da distribuição *Skew Exponential Power type 2 distribution* (SEP2) (Gráfico 1), o efeito da assimetria (p-valor = 0,0033) e da cauda (p-valor < 0,0001) foram analisados e ambos são significantes.

Quanto aos fibroblastos (CCD) as células também foram expostas a oito concentrações de NLS e o equivalente, em massa de curcuminoides encapsulados ou não, NLS-CT e CT, sendo elas 0,078 µg/mL, 0,156 µg/mL, 0,313 µg/mL, 0,625 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,50 µg/mL, 5,00 µg/mL e 10,00 µg/mL, por um período de 120 horas para posteriormente, em outros experimentos independentes, serem submetidas a RI (2 Gy), 24h após o início destes tratamentos.

Foi interesse analisar se a viabilidade celular sofreria alterações em relação aos tratamentos, com e sem exposição a RI. Estes dados estão apresentados no gráfico 22, conjuntamente.

Gráfico 22 - Boxplots das células CCD após os diferentes tratamentos, com e sem 2 Gy de RI.

Fonte: O próprio autor.

Observa-se uma menor variabilidade na viabilidade dos fibroblastos (CCD) quando submetidos aos diferentes tratamentos e doses (Gráfico 22), em comparação com as HaCat (Gráfico 20). A maior variabilidade foi observada no grupo tratado com CT na dose 2,500 µg/mL, sem RI. Ainda, nota-se maior viabilidade celular nas doses 0,078 µg/mL, 0,156 µg/mL,

0,313 $\mu\text{g/mL}$ e 10,000 $\mu\text{g/mL}$ em todos os tratamentos, após exposição à RI. Não houve presença de valores discrepantes (*outliers*) (Gráfico 22).

O gráfico 23 mostra a viabilidade dos fibroblastos (CCD) após os distintos tratamentos.

Gráfico 23 – Viabilidade celular de fibroblastos (CCD) após diferentes tratamentos.

Fonte: O próprio autor.

O tratamento com CT é mais citotóxico aos CCD do que o com NLS-CT e NLS na maioria das doses empregadas (0,078 $\mu\text{g/mL}$, 1,250 $\mu\text{g/mL}$, 2,500 $\mu\text{g/mL}$, 5,000 $\mu\text{g/mL}$ e 10,000 $\mu\text{g/mL}$) sem exposição à RI (Gráfico 28A). Nas maiores doses, parece que as NLS conferiram um efeito protetor às células tratadas com curcuminoides (Gráfico 23A), aumentando a viabilidade celular. As exceções estão nas doses 0,156 $\mu\text{g/mL}$ e 0,313 $\mu\text{g/mL}$, onde se observou maior viabilidade celular nas células tratadas com CT. Viabilidade acima de 80% foi observada em sete das oito doses empregadas de NLS, em uma nas NLS-CT e em

nenhuma para CT. Todavia, viabilidade acima de 70% pode ser observada em quatro doses com NLS-CT e CT.

A RI (2 Gy), mudou um pouco a viabilidade celular dos CCD, sendo maior nas doses 0,078 µg/mL e 0,156 µg/mL (Gráfico 23B), o que não havia sido observado nos testes anteriores. A viabilidade celular acima de 80% pode ser observada em cinco das oito doses empregadas de NLS, em uma para as NLS-CT e em duas para os CT. Acima de 70% de viabilidade celular foi observada em todas as doses para as NLS, em quatro para as NLS-CT e CT.

Após ajuste do modelo Weibull e análise dos resíduos pelo teste de normalidade Shapiro Wilk foi realizada uma análise de regressão entre a variável dependente (viabilidade de CCD) e as independentes (dose, grupo e RI), quanto à média e dispersão dos valores obtidos. Estes resultados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Análise de regressão para a linhagem CCD, antes e após a RI, considerando média e dispersão dos valores obtidos. Modelo ajustado *Weibull distribution Third parameterization* (WEI3). Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	Erro padrão	t valor	Pr(> t)
Média				
(Intercepto)	4,6919	0,0480	97,8182	0,0000
Dose – 0,156	-0,0939	0,0629	-1,4931	0,1378
Dose – 0,313	-0,1265	0,0629	-2,0121	0,0462
Dose – 0,625	-0,0962	0,0629	-1,5296	0,1285
Dose – 1,250	-0,2084	0,0629	-3,3141	0,0012
Dose – 2,500	-0,1130	0,0629	-1,7981	0,0744
Dose – 5,000	-0,1608	0,0629	-2,5575	0,0117
Dose – 10, 000	-0,1779	0,0629	-2,8292	0,0054
Grupo - NLS-CT	-0,1154	0,0345	-3,3466	0,0011
Radiação (Com)				0,1338
Grupo – CT	-0,3354	0,0452	-7,4216	0,0000
Dispersão				
(Intercepto)	1,7998	0,0969	18,5657	0,0000
Grupo - NLS-CT	-0,0413	0,1373	-0,3009	0,7639
Grupo – CT	-0,4752	0,1400	-3,3950	0,0009

Podemos inferir que houve diferença em relação à média da viabilidade celular dos CCD tratados com a menor dose (0,078 µg/mL) em relação às demais, sendo estas menores do que às médias obtidas no tratamento com a menor dose. A exceção está nas doses 0,156 µg/mL, 0,625 µg/mL e 2,5 µg/mL. Todavia, não houve diferença significativa entre a média da viabilidade celular dos fibroblastos sem ou após serem submetidas a 2 Gy de RI (Tabela 10).

Contudo, ao se analisar o efeito da dispersão entre os grupos, este foi significativo para a viabilidade celular após tratamento com NLS em relação ao CT, mostrando uma menor variabilidade no grupo tratado com CT (Tabela 10).

4.2.2. Ensaio direto – liberação de β -hexosaminidase

Mastócitos da linhagem RBL-2H3 foram tratados com diferentes concentrações de curcuminoides encapsulados em NLS ou não (NLS-CT e CT), a saber: 0,30 $\mu\text{g/mL}$, 0,60 $\mu\text{g/mL}$, 1,25 $\mu\text{g/mL}$, 2,50 $\mu\text{g/mL}$, 5,00 $\mu\text{g/mL}$, 10,00 $\mu\text{g/mL}$, 20,00 $\mu\text{g/mL}$ e 50,00 $\mu\text{g/mL}$. A variabilidade dos dados referentes à % de liberação de β -hexosaminidase consta a seguir (Gráfico 24).

Gráfico 24 - Boxplots da porcentagem de liberação de β -hexosaminidase pelos mastócitos por grupo de tratamento e doses.

Fonte: O próprio autor.

Observa-se maior variabilidade na porcentagem de liberação de β -hexosaminidase em cinco doses das oito analisadas no tratamento dos mastócitos com CT. Ainda, nas doses acima de 5,00 $\mu\text{g/mL}$, 100% dos mastócitos apresentaram um aparente perfil de inibição da liberação de β -hexosaminidase quando tratados com CT em comparação com NLS-CT. Não se observou a presença de dados discrepantes (*outliers*) (Gráfico 24).

Os resultados obtidos no teste de inibição da liberação de β -hexosaminidase em mastócitos, após estes tratamentos, estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11 – Dados descritivos do teste de inibição da liberação de β -hexosaminidase. Ribeirão Preto, 2017.

Parâmetros	Concentrações [$\mu\text{g/mL}$]								
	Esp.*	0,30	0,60	1,25	2,50	5,00	10,00	20,00	50,00
CT									
Média	8,58	22,30	22,01	21,51	20,65	12,86	7,10	5,34	9,07
DP [†]	0,36	0,72	1,96	0,29	1,12	3,44	0,47	2,30	1,97
Mínimo	8,07	21,52	20,07	21,19	19,23	10,43	6,79	3,58	7,79
Máximo	8,85	22,92	24,00	21,76	21,75	15,29	7,65	7,94	11,34
% I [‡]		8,28	9,47	11,53	15,05	47,12	70,79	78,05	62,70
NLS-CT									
Média	8,11	22,78	22,08	21,04	21,28	19,19	18,48	16,84	17,01
DP	1,05	3,14	1,01	1,24	1,30	1,85	2,31	0,55	1,10
Mínimo	6,06	19,16	21,04	19,50	20,12	17,20	16,01	16,40	15,88
Máximo	8,85	26,75	23,12	22,21	23,14	21,61	21,49	17,63	18,46
% I		7,04	9,89	14,14	13,16	21,70	24,62	31,29	30,58

Nota: * Liberação espontânea; [†] Desvio-padrão; [‡] % de inibição de liberação de β -hexosaminidase em relação ao controle máximo.

As maiores porcentagens de inibição de liberação de β -hexosaminidase podem ser observadas nas doses acima de 5,00 $\mu\text{g/mL}$ de CT. Quando se compara esta inibição com CT em relação às NLS-CT, esta é da ordem de 25,42% para a dose de 5,00 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 11).

O comportamento das NLS-CT e dos CT na liberação de β hexosaminidase pelos mastócitos está representado no gráfico 25.

Gráfico 25 - Liberação de β hexosaminidase por mastócitos.

Fonte: O próprio autor.

Outro fato que chama a atenção neste gráfico 25 é que em nenhuma dose ocorreu um estímulo para a liberação da β -hexosaminidase. O IC₅₀ dos curcuminoides foi 4,9 µg/mL.

Os dados foram avaliados quanto ao efeito de interação, em função da média e da dispersão e estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12 - Análise de regressão da % de liberação da β -hexosaminidase, considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, segundo grupo e dose de tratamento. Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	Erro-padrão	t valor	Pr(> t)
Média				
Intercepto	-1,4768	0,0987	-14,9666	0,0000
Grupo NLS-CT	0,3544	0,0708	5,0054	0,0000
Dose 0,60	0,0240	0,1253	0,1915	0,8492
Dose 1,25	-0,0159	0,1260	-0,1261	0,9004
Dose 2,50	-0,0780	0,1271	-0,6134	0,5434
Dose 5,00	-0,3908	0,1397	-2,7973	0,0081
Dose 10,00	-0,7050	0,1423	-4,9563	0,0000
Dose 20,00	-0,8866	0,1486	-5,9680	0,0000
Dose 50,00	-0,6353	0,1401	-4,5355	0,0001
Dispersão				
Intercepto	-2,3229	0,1122	-20,7089	0,0000

As médias das porcentagens de liberação da β -hexosaminidase foram diferentes quando comparados os tratados com NLS-CT em relação aos CT (Tabela 24). Quando são consideradas as médias da porcentagem de liberação da β -hexosaminidase em relação à menor (0,30

$\mu\text{g/mL}$), todas foram significantes e menores, cabendo exceção para a de $0,60 \mu\text{g/mL}$, $1,25 \mu\text{g/mL}$ e $2,50 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 12). Ainda, o efeito da dispersão destas aferições também foi significativo entre os grupos, confirmando uma menor variabilidade dos dados no grupo tratado com NLS-CT ($p\text{-valor} < 0,0001$) (Tabela 12).

Foi interesse comparar cada dose entre si e estes resultados estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13 – Comparação entre a % de liberação da β -hexosaminidase pelos mastócitos em relação às diferentes doses de CT. Ribeirão Preto, 2017.

Contraste	OR*	SE	df	z.ratio	p-valor
0,60/0,30	1,0243	0,1283	Inf	0,1915	1,0000
1,25/0,30	0,9842	0,1240	Inf	-0,1261	1,0000
1,25/0,60	0,9609	0,1206	Inf	-0,3177	1,0000
2,50/0,30	0,9250	0,1176	Inf	-0,6134	0,9987
2,50/0,60	0,9031	0,1144	Inf	-0,8051	0,9929
2,50/1,25	0,9398	0,1197	Inf	-0,4875	0,9997
5,00/0,30	0,6765	0,0945	Inf	-2,7973	0,0956
5,00/0,60	0,6605	0,0920	Inf	-2,9777	0,0583
5,00/1,25	0,6873	0,0962	Inf	-2,6795	0,1288
5,00/2,50	0,7314	0,1031	Inf	-2,2203	0,3393
10,00/0,30	0,4941	0,0703	Inf	-4,9563	0,0000
10,00/0,60	0,4824	0,0684	Inf	-5,1426	0,0000
10,00/1,25	0,5020	0,0715	Inf	-4,8392	0,0000
10,00/2,50	0,5341	0,0766	Inf	-4,3738	0,0003
10,00/5,00	0,7304	0,1131	Inf	-2,0290	0,4621
20,00/0,30	0,4121	0,0612	Inf	-5,9680	0,0000
20,00/0,60	0,4023	0,0596	Inf	-6,1497	0,0000
20,00/1,25	0,4187	0,0623	Inf	-5,8556	0,0000
20,00/2,50	0,4455	0,0666	Inf	-5,4046	0,0000
20,00/5,00	0,6091	0,0979	Inf	-3,0843	0,0427
20,00/10,00	0,8340	0,1348	Inf	-1,1234	0,9519
50,00/0,30	0,5298	0,0742	Inf	-4,5355	0,0002
50,00/0,60	0,5172	0,0722	Inf	-4,7226	0,0001
50,00/1,25	0,5382	0,0755	Inf	-4,4166	0,0003
50,00/2,50	0,5727	0,0809	Inf	-3,9465	0,0020
50,00/5,00	0,7831	0,1197	Inf	-1,6001	0,7505
50,00/10,00	1,0722	0,1656	Inf	0,4513	0,9998
50,00/20,00	1,2856	0,2058	Inf	1,5695	0,7687

Nota: * Odds-ratio

Houve diferença na viabilidade celular entre as doses $10,00 \mu\text{g/mL}$, $20,00 \mu\text{g/mL}$ e $50 \mu\text{g/mL}$ e as $0,30 \mu\text{g/mL}$, $0,60 \mu\text{g/mL}$, $1,25 \mu\text{g/mL}$ e $2,50 \mu\text{g/mL}$ e, para a dose $20,00 \mu\text{g/mL}$, uma diferença também em relação à de $5,00 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 13).

Para assegurar a interpretação correta quanto ao potencial de inibição apresentado pelos CT a partir da dose de 5,00 µg/mL, foi necessário realizar o teste de viabilidade celular dos mastócitos a estes compostos, separadamente. As células RBL-2H3 foram tratadas com diferentes concentrações (0,30 µg/mL; 0,60 µg/mL; 1,25 µg/mL; 2,50 µg/mL; 5,00 µg/mL; 10,00 µg/mL; 20,00 µg/mL, 50,00 µg/mL e 100,00 µg/mL) de curcuminoides não encapsulados (CT), inicialmente por 24 h.

Os dados descritivos relativos a este teste estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14 – Dados descritivos do teste de viabilidade celular dos mastócitos após tratamento com CT por 24 h. Ribeirão Preto, 2017.

Dose (µg/mL)	Mínimo	Mediana	Média	Máximo	Desvio-padrão
0,30	100,02	102,91	102,09	103,34	1,80
0,60	96,88	97,86	98,23	99,95	1,57
1,25	96,79	98,48	98,25	99,47	1,36
2,50	96,02	100,35	99,23	101,33	2,82
5,00	87,69	91,37	90,87	93,56	2,96
10,00	37,09	41,16	41,36	45,82	4,37
20,00	32,94	33,05	33,73	35,19	1,27
50,00	18,47	19,80	19,53	20,32	0,95
100,00	0,18	0,24	0,32	0,54	0,19

Neste experimento foram utilizadas algumas concentrações superiores às utilizadas nos experimentos com fibroblastos e queratinócitos. Nota-se que a partir da concentração de 10,00 µg/mL há uma menor média de viabilidade celular (41,36%), fato que poderia causar confusão na interpretação dos resultados do ensaio direto de liberação de β-hexosaminidase (Tabela 14).

O gráfico 26 ilustra a viabilidade celular dos mastócitos após serem submetidos a diferentes doses de CT por 24 h.

Gráfico 26 - Viabilidade celular de mastócitos tratados com CT por 24h.

Fonte: O próprio autor.

Quando tratados com 5,00 µg/mL de CT os mastócitos ainda apresentavam 93,56% de viabilidade celular máxima. Acima desta dose, a viabilidade celular média ficou comprometida gradativamente, sendo de 41,36%, 33,73%, 19,53% e 0,32% para as doses 10,00 µg/mL, 20,00 µg/mL, 50,00 µg/mL e 100,00 µg/mL, respectivamente (Tabela 25).

Os dados relativos à viabilidade celular, comparando as diferentes doses de CT aos quais os mastócitos foram expostos, estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15 - Comparações Múltiplas Dunn com correção de Bonferroni para as diferentes doses de CT utilizadas nos mastócitos. Ribeirão Preto, 2017.

Ranque	%	Dp	Min	Max	Q25	Q50	Q75	Dose	Grupo
2,00	0,3216	0,1894	0,184	0,538	0,214	0,243	0,390	100,00	e
5,00	19,5273	0,9519	18,470	20,316	19,133	19,796	20,056	50,00	de
8,00	33,7278	1,2714	32,936	35,194	32,995	33,053	34,124	20,00	cde
11,00	41,3551	4,3686	37,090	45,820	39,123	41,155	43,488	10,00	cd
14,00	90,8735	2,9625	87,695	93,558	89,531	91,368	92,463	5,00	bc
19,33	98,2454	1,3555	96,789	99,470	97,633	98,478	98,974	1,25	ab
19,67	98,2290	1,5699	96,877	99,951	97,368	97,859	98,905	0,60	ab
21,67	99,2340	2,8232	96,023	101,326	98,188	100,354	100,840	2,50	a
25,33	102,0885	1,8047	100,020	103,339	101,463	102,907	103,123	0,30	a

Fonte: O próprio autor.

Houve diferença entre as doses 0,30 µg/mL e 2,50 µg/mL em relação à 5,00 µg/mL, 10,00 µg/mL, 20,00 µg/mL, 50,00 µg/mL e 100,00 µg/mL; 0,60 µg/mL e 1,25 µg/mL em relação a 10,00 µg/mL, 20,00 µg/mL, 50,00 µg/mL e 100,00 µg/mL; entre 5,00 µg/mL em

relação a 20,00 µg/mL, 50,00 µg/mL e 100,00 µg/mL; entre 10,00 µg/mL, 50,00 µg/mL e 100,00 µg/mL (Tabela 15).

4.3. Etapa 3: Estudos *in vivo*

Inicialmente serão apresentados os resultados relativos ao estudo de toxicidade da Formulação contendo 30 mg de curcuminoides nas NLS-CT [30 mg CT:100 mg de gel de Natrosol®] em camundongos. Esta foi a formulação com maior concentração de curcuminoides. Na sequência também serão apresentados os resultados do estudo de indução de radiodermite e de dose-resposta, também em camundongos.

4.3.1. Estudo de toxicidade

Com o objetivo de avaliar se a Formulação contendo NLS-CT não causaria alterações clinicamente importantes nos camundongos, um dos parâmetros mensurados foi o peso dos animais ao longo do experimento de 21 dias. Os tempos estabelecidos foram D0, D7, D14 e D21 no grupo experimental e, a título de comparação, as mesmas aferições foram realizadas no grupo controle. A variabilidade dos pesos nos diferentes grupos e tempos avaliados está representa no gráfico 27.

Logo no D0 observa-se uma diferença em relação ao grau de dispersão e assimetria da variável em relação aos dois grupos. Esta diferença permaneceu ao longo do D7, D14, ficando

mais evidente no D21, onde quase não se observou dispersão no Grupo Controle, apenas uma medida discrepante (*outlier*). Ainda, pode-se notar que houve aumento na média e mediana dos pesos dos animais em ambos os grupos (Gráfico 27).

As medidas resumo em relação ao peso estão apresentadas na tabela 16.

Tabela 16 – Medidas relativas ao peso (g) dos camundongos dos grupos experimental (n=5) e controle no estudo de toxicidade (n=3). Ribeirão Preto, 2017.

Avaliações	D0		D7		D14		D21	
Grupos	Exp.*	Cont.†	Exp.*	Cont.†	Exp.*	Cont.†	Exp.*	Cont.†
Média	26,20	24,00	26,20	26,00	27,20	27,33	28,40	28,00
DP‡	0,84	2,00	0,84	2,00	1,10	1,15	0,89	2,00
Mínimo	25,00	22,00	25,00	24,00	26,00	26,00	28,00	26,00
Máximo	27,00	26,00	27,00	28,00	28,00	28,00	30,00	30,00
Variância	0,70	4,00	0,70	4,00	1,20	1,33	0,80	4,00

Nota: * Grupo experimental; † Grupo controle; ‡ Desvio-padrão

Os camundongos não apresentaram perda ponderal ao longo dos 21 dias de estudo, em nenhum dos grupos. O maior ganho foi no grupo controle, onde também foram obtidas as maiores médias e variabilidades (Tabela 16). Em ambos os grupos, os animais estavam ativos e sem sinais de sofrimento.

Os dados foram avaliados quanto ao efeito de interação, em função da média e da dispersão, e estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17 - Análise de efeitos mistos do peso, considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, segundo grupo e dia. Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	Erro-padrão	t valor	Pr(> t)
Média				
Intercepto	23,9940	0,2196	109,2761	0,0000
Grupo Experimental	2,1874	0,2895	7,5568	0,0000
Dia 7	2,0000	0,3105	6,4410	0,0000
Dia 14	3,5965	0,3637	9,8894	0,0000
Dia 21	4,0000	0,3105	12,8820	0,0000
Grupo Experimental - Dia 7	-2,0000	0,4093	-4,8859	0,0002
Grupo Experimental - Dia 14	-2,5617	0,4638	-5,5231	0,0001
Grupo Experimental - Dia 21	-1,7835	0,4389	-4,0637	0,0010
Dispersão				
Intercepto	-1,3833	0,1484	-9,3244	0,0000

Observa-se que houve diferença em relação à média dos pesos entre os grupos, sendo esta maior no experimental. Também foi significativa esta diferença entre as médias nos

diferentes dias de análise, sendo todas as médias superiores do que a inicial (D0). Nota-se que houve efeito de interação entre grupo e dia, sendo que este efeito sobre a média foi menor para o grupo experimental no D7, D14 e D21, em relação ao grupo controle no D0. Ainda, pode ser observado que o efeito da dispersão foi significativo entre os grupos, onde o grupo experimental apresentou menor variabilidade que o controle (Tabela 17).

Na tabela 18 estão apresentados os dados relativos à média de consumo de ração e de água dos animais nos grupos experimental e controle, ao longo das três semanas.

Tabela 18 – Média do consumo diário de água (mL) e de ração (g) nos grupos experimental (n=5) e controle (n=3) no estudo de toxicidade. Ribeirão Preto, 2017.

Avaliação	Semana 1		Semana 2		Semana 3	
Grupo	Exp.*	Cont.†	Exp.*	Cont.†	Exp.*	Cont.†
Ração (g)	5,89	5,22	4,80	5,20	5,49	5,61
Água (mL)	4,57	6,12	4,57	4,65	4,29	4,48

Nota: * Grupo experimental; † Grupo controle.

Observa-se maior consumo tanto de água quanto de ração no grupo controle, exceto na primeira semana, quando os animais do grupo experimental ingeriram mais ração (Tabela 18). Na segunda semana o consumo de ração no grupo experimental decresceu cerca de 18,51% em relação ao início do estudo, porém na terceira, houve um acréscimo de 8,33%, em relação à segunda. Todavia, o grupo finalizou o estudo com um consumo de ração 11,71% menor, em relação a começo.

Em relação à ingesta hídrica, esta permaneceu igual ao longo das duas semanas iniciais e teve um decréscimo de 6,13% na terceira no grupo experimental (Tabela 10). No controle houve um decréscimo de 24,02% na segunda semana e de 26,80% na terceira, ambas em relação à primeira. Entretanto, estas alterações não se expressaram em perda ponderal nos grupos estudados (Tabela 18).

Após 21 dias de aplicação tópica da formulação ou simples acompanhamento foram coletadas amostras de sangue destes camundongos. Os parâmetros utilizados para avaliar a função renal e hepática estão apresentados na tabela 19.

Tabela 19 - Marcadores sanguíneos para avaliar toxicidade renal e hepática da formulação de NLS-CT (n=8). Ribeirão Preto, 2017.

Estatística descritiva		Parâmetros				
Grupos	Medidas	PT* (g/dL)	TGP† UI/L	FA ‡ UI/L	Ureia mg/dL	Cr § mg/dL
Tratamento (n=5)	Média	6,84	70,54	204,20	55,10	0,59
	Mediana	6,20	24,40	166,00	50,50	0,57
	Variância	5,19	8.973,95	12.809,20	419,21	0,003
	DP ‖	2,28	94,73	113,18	20,47	0,06
	Mínimo	5,00	20,00	111,00	34,60	0,54
	Máximo	10,80	239,00	394,00	87,20	0,68
Controle (n=3)	Média	4,33	46,10	195,33	48,90	0,58
	Mediana	4,40	41,00	202,00	48,70	0,60
	Variância	0,09	141,61	562,33	1,03	0,05
	DP‖	0,31	11,90	23,71	1,02	0,23
	Mínimo	4,00	37,60	169,00	48,00	0,34
	Máximo	4,60	59,70	215,00	50,00	0,79
Estatística inferencial						
p-valor	Mann-Whitney¶	0,025	0,456	0,655	0,655	0,881
	Wilcoxon**	0,345	0,686	0,345	0,686	0,043

Nota: * Proteínas totais; † Transaminase glutâmico-pirúvica; ‡ Fosfatase alcalina; § Creatinina; ‖ Desvio-padrão; ¶ teste não paramétrico utilizado para avaliar a diferença entre os grupos; ** teste utilizado para comparar os valores obtidos nesta pesquisa e os parâmetros observados na literatura.

Para todos os parâmetros analisados, a média, a variância e o desvio-padrão foram maiores no grupo experimental do que no controle, exceto para a creatinina, que foi mais homogênea no grupo experimental, apresentando menor variância. Infere-se, com os dados obtidos, que o grupo experimental era menos homogêneo que o controle. A única diferença foi em relação às proteínas totais (p-valor = 0,025) pelo Mann-Whitney (Tabela 19).

Por se tratar de um grupo de animais para os quais, segundo o Biotério do qual foram adquiridos, os resultados laboratoriais a serem utilizados como padrão de análise ou controle ainda não estavam disponíveis, optou-se por utilizar valores obtidos em um artigo, com camundongos da mesma linhagem e idade, porém criados em condições sanitárias diferentes. Aplicou-se o teste de Wilcoxon entre os valores conhecidos da literatura e os obtidos no grupo experimental, com o mesmo nível de significância de 5%. O único parâmetro que foi diferente foi a creatinina (p-valor = 0,043) (Tabela 19).

O gráfico 28 ilustra os parâmetros analisados, por grupo de tratamento, para uma melhor visualização individual dos animais.

Gráfico 28 - Parâmetros renais e hepáticos dos camundongos, após 21 dias de experimento.

Fonte: O próprio autor.

Observa-se, agora com o auxílio do Gráfico 28, os camundongos que apresentaram valores mais elevados em cada grupo. No grupo experimental o camundongo 2 teve maior valor para as proteínas totais e fosfatase alcalina, o 1 para ureia e o 5 para TGP; já no grupo controle, o camundongo 2 para creatinina.

As fotografias da região dorsal estão apresentadas na figura 8.

Figura 8. Imagens dos 5 camundongos nos dias 0, 7, 14 e 21 para observação do local de aplicação da formulação.

Fonte: O próprio autor.

Quanto às avaliações da possível toxicidade no local da aplicação, não foram observados sinais de eritema, edema, prurido ou descamação (Figura 8) e os animais não apresentaram sinal de sofrimento.

Na sequência serão apresentadas as fotomicrografias dos órgãos-alvo que foram analisados quanto a possíveis efeitos da Formulação contendo NLS-CT [30mg CT:100 mg de gel]. Para estas análises, os órgãos foram corados com HE, coloração esta que permite a observação da arquitetura tecidual e a presença de infiltrado inflamatório.

Serão mostrados cortes de todos os camundongos do grupo experimental e, como base de comparação, um corte de um animal do grupo controle. Optou-se por um aumento de 20X, que permite uma visualização mais panorâmica dos mesmos. O primeiro órgão a ser apresentado é o coração (Figura 9).

Figura 9 - Fotomicrografias de cortes do coração dos animais dos grupos controle (CC) e experimental (E1 a E5), após 21 dias de tratamento tópico com Gel contendo NLS – CT (30 mg). Ribeirão Preto, 2017.

Fonte: O próprio autor.

Não foram observadas alterações significativas nos cortes histológicos dos animais do grupo experimental, em relação ao controle. Nota-se um padrão típico das fibras musculares cardíacas emergindo de diferentes campos no plano de visualização (Figura 9).

Os cortes hepáticos corados em HE (20X) estão apresentadas na figura 10.

Figura 10 - Fotomicrografias de cortes do fígado dos animais dos grupos controle (C) e experimental (E1 a E5), após 21 dias de tratamento tópico com Gel contendo NLS – CT (30 mg). Ribeirão Preto, 2017.

Fonte: O próprio autor.

Foram observados espaços entre os hepatócitos em ambos os grupos, porém sem a presença de infiltrado inflamatório nos cortes. O parênquima com aparência esponjosa característica, não mostra presença de dilatações ou obstruções anormais. Também não se observa depósito anormal de lipídeos. Pode ser notada a presença de hepatócitos, células de Küpffer, sinusoides hepáticos e estruturas vasculares.

Os cortes de tecido pulmonar corados em HE (20X) estão apresentadas na figura 11.

Figura 11 - Fotomicrografias de cortes de pulmão dos animais dos grupos controle (C) e experimental (E1 a E5), após 21 dias de tratamento tópico com Gel contendo NLS – CT (30 mg). Ribeirão Preto, 2017.

Fonte: O próprio autor.

Podemos observar os ductos alveolares, o saco alveolar, os alvéolos e a presença de nós musculares. O epitélio do revestimento de bronquíolos apresenta poucas células epiteliais cuboides e os feixes musculares são preservados. A presença de infiltrado inflamatório atípico não foi observada e a arquitetura do tecido está preservada (Figura 11).

Os cortes de tecido renal corados em HE (20X) estão apresentadas na figura 12.

Figura 12 - Fotomicrografias de cortes do rim dos animais dos grupos controle (C) e experimental (E1 a E5), após 21 dias de tratamento tópico com Gel contendo NLS – CT (30 mg). Ribeirão Preto, 2017.

Fonte: O próprio autor.

O epitélio cúbico simples geralmente forma pequenos tubos, como os túbulos renais mostrados na figura 12. A maioria desses túbulos foi cortada transversalmente, os tubos transversais se parecem com anéis. A parede desses túbulos é formada por uma única camada de células em forma de cuboide. Uma rede tortuosa de túbulos renais contorcidos e compactados vistos em secções transversais, visão oblíqua e longitudinal. Quase nenhum tecido conjuntivo é observado (Figura 12).

Na sequência serão apresentados os cortes da pele dos animais. Optou-se, por tratar-se do local de aplicação do produto, por apresentá-los em dois aumentos, enfatizando as alterações observadas. As análises dos cortes da pele corados em HE (20X e 40X) estão apresentadas na figura 13.

Figura 13 - Fotomicrografias da pele dos animais dos grupos controle (C) e experimental (E1 a E5), após 21 dias de tratamento tópico com Gel contendo NLS – CT (30 mg). Ribeirão Preto, 2017.

Fonte: O próprio autor.

Podemos observar que o corte da pele do animal do grupo controle (C) apresenta uma epiderme fina, estrato basal com uma única camada de células cuboide. Há presença de escamas de queratina, porém reduzidas; a camada papilar da derme é organizada, quase não há papilas dérmicas e projeções interpapilares; a camada reticular da derme é rica em glândulas sebáceas e folículos pilosos (Figura 13). No epitélio, os núcleos das células são claramente vistos, e as regiões acidófilas (rosa) ao redor de cada um deles representa o citoplasma das células epiteliais e não há quase nenhum espaço entre as células.

No tecido conjuntivo podem ser observados núcleos muito distantes uns dos outros, o citoplasma é fino e quase invisível. As grandes regiões presentes entre as células são espaços preenchidos por MEC, onde existem fibras de colágeno (rosa). Os espaços aparentemente vazios são artefatos decorrentes da técnica, onde houve retração do tecido (Figura 13).

O que diferencia o grupo controle (C) dos experimentais (E1, E2, E3, E4 e E5) é a espessura da epiderme, que nos grupos experimentais apresentou-se mais celular e, aparentemente, com mais de uma camada; escamas de queratina mais abundantes e a derme mais fortemente corada, aparentando ter mais colágeno, com uma MEC mais organizada (Figura 13).

Quanto ao colágeno, apesar da observação da MEC pela coloração com HE, optou-se por fazer novos cortes e corá-los com Picrosirius Red para realizar uma análise quantitativa. Os dados desta análise estão apresentados na tabela 20.

Tabela 20 – Medidas resumo do colágeno nos dois grupos (n= 36*). Ribeirão Preto, 2017.

Grupo	Animal	Média	Mediana	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Controle						
	1	8,422	8,036	2,077	5,838	10,977
Experimental						
	1	10,465	10,459	1,176	8,754	12,140
	2	11,770	11,712	0,760	10,566	12,717
	3	11,141	10,953	1,402	9,893	13,363
	4	11,036	11,246	2,430	7,770	13,960
	5	12,030	12,247	2,934	7,403	14,991

Nota: * 36 equivale a 6 fotos por animal, sendo 6 do controle e 30 do experimental.

Na tabela 20 os dados comungam os mesmos resultados das análises histológicas (Figura 13), onde a MEC da derme está mais corada (rosa), indicando a presença de colágeno. O grupo controle teve uma média menor de colágeno quando a pele foi submetida a coloração Picrosirius Red e processamento no ImageJ (8,422) do que o experimental (11,288 de média geral), representando um aumento percentual de 34,03% na média geral de colágeno na MEC. O grupo experimental apresentou, os maiores valores mínimos e máximos nas aferições realizadas (Tabela 20).

Os dados da análise ajustada do Modelo misto, considerando a média e dispersão, estão apresentados na tabela 21.

Tabela 21 – Ajuste do modelo misto para a variável colágeno. Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	Erro-padrão	t valor	Pr(> t)
Média				
(Intercepto)	-2,0617	0,0340	-60,7192	0,0000
Dispersão				
(Intercepto)	-2,7721	0,1367	-20,2781	0,0000

Observa-se que houve diferença tanto em relação à média quanto à dispersão do colágeno ($p\text{-valor} < 0,0001$) (Tabela 21).

No quadro 1 estão apresentados os principais achados do estudo de toxicidade da formulação.

Quadro 1 – Resumo dos principais resultados do estudo de toxicidade.

Estudo de Toxicidade	Grupo Experimental	Grupo Controle
Peso	<ul style="list-style-type: none"> • Maiores médias no D2, D7 e D21 em relação do D0 • Diferença significativa nestes dias (p-valor < 0,05) 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior média no D14 (p-valor < 0,05)
Consumo alimentar	<ul style="list-style-type: none"> • Menor consumo médio na segunda e terceira semanas em relação ao início 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior consumo médio na terceira semanas em relação ao início
Ingesta hídrica	<ul style="list-style-type: none"> • Menor ingesta na terceira semana, em relação ao início 	<ul style="list-style-type: none"> • Menor ingesta na segunda e terceira semanas, em relação ao início
Comportamento	<ul style="list-style-type: none"> • Sem alterações comportamentais sugestivas de dor ou desconforto 	<ul style="list-style-type: none"> • Sem alterações comportamentais sugestivas de dor ou desconforto
Toxicidade cutânea	<ul style="list-style-type: none"> • Pele sem eritema, edema, descamação e o prurido. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pele sem eritema, edema, descamação e o prurido.
Toxicidade renal	<ul style="list-style-type: none"> • Maiores médias de ureia 	<ul style="list-style-type: none"> • Maiores médias de creatinina
Toxicidade hepática	<ul style="list-style-type: none"> • Maiores médias de FA, TGP e proteínas totais (PT) • Diferença significativa para PT (p-valor = 0,025) 	<ul style="list-style-type: none"> • Menores médias de FA, TGP e proteínas totais (PT)
Histologia, exceto da pele	<ul style="list-style-type: none"> • Sem alterações atribuíveis ao produto, ausência de infiltrados inflamatórios. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sem alterações.
Histologia da pele	<ul style="list-style-type: none"> • Epiderme viável, derme mais corada, sem infiltrados inflamatórios. 	<ul style="list-style-type: none"> • Epiderme viável, derme menos corada, sem infiltrados inflamatórios.
% de colágeno	<ul style="list-style-type: none"> • Maior porcentagem de colágeno (média = 11,288 %) • Diferença significativa entre % médias (p-valor < 0,05) 	<ul style="list-style-type: none"> • Menor porcentagem de colágeno (média = 8,422%)

Fonte: O próprio autor.

4.3.2. Estudo de indução de radiodermite

Durante o estudo de indução de radiodermite, os camundongos foram pesados em tempos pré-estabelecidos (D0, D2, D7, D14 e D21). Observe a variabilidade do peso dos animais ao longo do estudo e nos diferentes grupos (Gráfico 29).

Gráfico 29 – Boxplots da variável peso, segundo dose de RI e dia de avaliação no estudo de indução de radiodermite.

Fonte: O próprio autor.

Nota-se uma grande variabilidade dos dados em relação aos dias de análise e entre os grupos; presença de dados discrepantes (*ouliers*) no grupo que recebeu 15 Gy de RI já no D0, nos grupos de 15 e 20 Gy no D2 e de 15 Gy no D14 e nos de 6 e 15 Gy no D21. Inicialmente, apesar de terem a mesma idade, os camundongos já apresentavam variabilidade de peso; outro fato considerável é que em todos os grupos as médias e medianas aumentaram no final do experimento (D21), em relação ao início (Gráfico 29).

A tabela 22 mostra o comportamento do peso dos animais nos grupos que receberam diferentes doses de RI para a indução de radiodermite.

Tabela 22 – Medidas relativas ao peso avaliadas nos diferentes grupos de indução de radiodermite (n=25). Ribeirão preto, 2017.

Parâmetros	D0	D2	D7	D14	D21
6 Gy (n=5)					
Média	25,20	24,80	26,80	27,20	28,00
DP*	1,79	1,10	1,10	1,79	1,41
Mínimo	24,00	24,00	26,00	26,00	26,00
Máximo	28,00	26,00	28,00	30,00	30,00
Variância	3,20	1,20	1,20	3,20	2,00
10 Gy (n=5)					
Média	24,80	25,20	25,20	25,20	26,60
DP*	1,79	1,10	1,10	1,10	1,82
Mínimo	22,00	24,00	24,00	24,00	25,00
Máximo	26,00	26,00	26,00	26,00	29,00
Variância	3,20	1,20	1,20	1,20	3,30
15 Gy (n=5)					
Média	24,40	23,60	25,20	26,40	26,40
DP*	0,89	0,89	1,10	0,89	0,89
Mínimo	24,00	22,00	24,00	26,00	26,00
Máximo	26,00	24,00	26,00	28,00	28,00
Variância	0,80	0,80	1,20	0,80	0,80
20 Gy (n=5)					
Média	22,80	21,60	23,20	23,20	24,80
DP*	1,10	0,89	1,10	1,10	1,10
Mínimo	22,00	20,00	22,00	22,00	24,00
Máximo	24,00	22,00	24,00	24,00	26,00
Variância	1,20	0,80	1,20	1,20	1,20
25 Gy (n=3)[†]					
Média	23,33	22,67	23,33	24,00	25,33
DP*	1,15	1,15	1,15	0,00	1,15
Mínimo	22,00	22,00	22,00	24,00	24,00
Máximo	24,00	24,00	24,00	24,00	26,00
Variância	1,33	1,33	1,33	0,00	1,33
30 Gy (n=2)[‡]					
Média	22,00	23,00	24,00	24,00	26,00
DP*	0,00	1,41	0,00	0,00	0,00
Mínimo	22,00	22,00	24,00	24,00	26,00
Máximo	22,00	24,00	24,00	24,00	26,00
Variância	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00

Nota: * Desvio-padrão; [†] Foram analisados três animais para esta dose; [‡] Foram analisados dois animais para esta dose.

A menor média foi observada no grupo que recebeu 30 Gy, seguido pelo de 20 Gy no D0. Só não houve perda ponderal média no D2 nos grupos que receberam 10 e 30 Gy. Em todas as análises posteriores, pode ser observado ganho ou estabilidade no peso (Tabela 22).

A tabela 23 apresenta os dados relativos à análise de regressão do peso.

Tabela 23 – Análise de regressão do peso considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, nos diferentes grupos e dias no estudo de indução de radiodermite. Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	Erro-padrão	t valor	Pr(> t)
Média				
(Intercepto)	3,2239	0,0116	278,5229	0,0000
Grupo10 G	-0,0164	0,0164	-1,0043	0,3186
Grupo15 G	-0,0310	0,0164	-1,8911	0,0626
Grupo20 G	-0,0993	0,0164	-6,0672	0,0000
Grupo25 G	-0,0763	0,0189	-4,0347	0,0001
Grupo30 G	-0,1336	0,0217	-6,1687	0,0000
DiaDia 2	-0,0146	0,0164	-0,8921	0,3753
DiaDia 7	0,0631	0,0164	3,8530	0,0002
DiaDia 14	0,0767	0,0164	4,6881	0,0000
DiaDia 21	0,1063	0,0164	6,4909	0,0000
Grupo10 G:DiaDia 2	0,0325	0,0231	1,4038	0,1646
Grupo15 G:DiaDia 2	-0,0189	0,0231	-0,8158	0,4173
Grupo20 G:DiaDia 2	-0,0389	0,0231	-1,6809	0,0971
Grupo25 G:DiaDia 2	-0,0147	0,0267	-0,5488	0,5848
Grupo30 G:DiaDia 2	0,0575	0,0306	1,8771	0,0645
Grupo10 G:DiaDia 7	-0,0452	0,0231	-1,9515	0,0549
Grupo15 G:DiaDia 7	-0,0311	0,0231	-1,3445	0,1830
Grupo20 G:DiaDia 7	-0,0456	0,0231	-1,9701	0,0526
Grupo25 G:DiaDia 7	-0,0631	0,0267	-2,3603	0,0209
Grupo30 G:DiaDia 7	0,0239	0,0306	0,7818	0,4369
Grupo10 G:DiaDia 14	-0,0588	0,0231	-2,5420	0,0132
Grupo15 G:DiaDia 14	0,0023	0,0231	0,1012	0,9197
Grupo20 G:DiaDia 14	-0,0593	0,0231	-2,5616	0,0125
Grupo25 G:DiaDia 14	-0,0470	0,0267	-1,7599	0,0826
Grupo30 G:DiaDia 14	0,0103	0,0306	0,3354	0,7383
Grupo10 G:DiaDia 21	-0,0358	0,0231	-1,5477	0,1260
Grupo15 G:DiaDia 21	-0,0272	0,0231	-1,1735	0,2444
Grupo20 G:DiaDia 21	-0,0220	0,0231	-0,9484	0,3461
Grupo25 G:DiaDia 21	-0,0238	0,0267	-0,8899	0,3765
Grupo30 G:DiaDia 21	0,0608	0,0306	1,9855	0,0509
Dispersão				
(Intercepto)	-3,6542	0,0632	-57,7846	0,0000

Nota-se que houve diferença significativa entre as médias dos pesos dos grupos que receberam 20, 25 e 30 Gy em relação ao de 6 Gy, sendo que em naqueles a média foi menor do que neste. Teve diferença também em relação aos dias de medição, sendo todos diferentes do D0 de forma significativa, onde pode ser observada uma menor média no D2 em relação ao D0 e, nos demais, um aumento da média de peso (Tabela 23). Ainda, pode ser notado efeito de interação entre os grupos e dias, sendo este significativo para o grupo de 25 Gy no D7, 10 e 20 Gy no D14, sendo a média de peso destes menor do que a obtida no grupo de 6 Gy no D0 (Tabela 23).

Quanto ao consumo de água e de ração, os resultados estão apresentados na tabela 24.

Tabela 24 – Média do consumo de ração (g) e água (mL), por animal e por dose de RI (n=25). Ribeirão Preto, 2017.

Grupos	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Consumo de Ração (g)			
6 Gy (n=5)	4,80	6,91	6,29
10 Gy (n=5)	7,03	5,89	6,60
15 Gy (n=5)	7,03	8,00	5,54
20 Gy (n=5)	7,62	5,49	5,71
25 Gy (n=3)	5,03	5,54	5,14
30 Gy (n=2)	5,03	5,54	5,14
Consumo de Água (mL)			
6 Gy (n=5)	5,00	4,71	4,57
10 Gy (n=5)	8,86	5,14	5,29
15 Gy (n=5)	6,00	5,57	4,86
20 Gy (n=5)	4,86	5,00	4,86
25 Gy (n=3)	5,00	5,57	5,71
30 Gy (n=2)	5,00	5,57	5,71

Ao analisarmos o consumo de ração podemos perceber que este sofreu variações ao longo do estudo. Os grupos de 6, 15, 25 e 30 Gy apresentaram um aumento do consumo na segunda semana, reduzindo novamente na terceira, completando o estudo com um consumo menor do que o inicial, com exceção do grupo que recebeu 6 Gy. O maior acréscimo percentual ocorreu no grupo de 6 Gy (43, 96%), entre a primeira e segunda semana e o menor foi no de 20 Gy (-27,95%), também na segunda semana (Tabela 24).

Em relação à ingestão hídrica, os grupos de 6, 10 e 15 Gy apresentaram um consumo reduzido em comparação à primeira semana, cabendo destaque para o de 10 Gy com decréscimo de 41,99%. O maior acréscimo percentual na ingestão hídrica ocorreu nos grupos de 25 e 30 Gy, durante a terceira semana (14,20%) (Tabela 24).

Quanto à indução de radiodermite, estas foram de forma gradativa. A partir de 20 Gy eles começaram a apresentar alterações na integridade da pele (60%), em algum momento durante a observação; dois deles no D14 e um no D16, sendo a epilação a reação mais observada e o eritema leve em um animal (Gráfico 30).

Gráfico 30 - Efeito das doses de RI no desenvolvimento de radiodermite Grau 1, ao longo de 21 dias de observação.

Fonte: O próprio autor.

Nas doses de 25 e 30 Gy todos os camundongos apresentaram epilação, sendo a reação mais precoce no D14, uma no D17 e três no D19. No grupo de 30 Gy, além da epilação, observou-se eritema leve, tendendo a moderado.

Em todos os grupos a dor foi avaliada de forma subjetiva, diariamente, por meio de uma tabela que apresentava sinais de dor, adaptada do *National Institute of Health*. O resultado desta avaliação está apresentado no gráfico 31.

Gráfico 31 - Efeito das doses de RI nos sinais de dor nos camundongos, por grupo de avaliação durante os 21 dias de observação.

Fonte: O próprio autor.

Somente um camundongo no Grupo de 20 Gy apresentou alteração na mobilidade física, com retração da pata posterior esquerda e pelagem eriçada a partir do dia 16, o que foi interpretado, segundo o instrumento de análise, como sinais de dor. Foi atribuído ao posicionamento durante a RI.

O quadro 2 traz os principais achados no estudo de indução de radiodermite.

Quadro 2 – Resumo dos resultados do estudo de indução de radiodermite

Estudo de Indução de Radiodermite	
Peso	<ul style="list-style-type: none"> Muita variabilidade entre os grupos mesmo no início, sendo a menor média no de 30 Gy, porém todos ganharam peso ao final do estudo. Diferença significativa entre as médias nos grupos que receberam 20, 25 e 30 Gy de RI, em relação ao grupo de 6 Gy, sendo menores
Consumo alimentar	<ul style="list-style-type: none"> Aumentaram o consumo na 2ª semana (6, 15, 25 e 30 Gy), porém reduziram na 3ª Somente o de 6 Gy aumentou o consumo em relação ao início.
Ingesta hídrica	<ul style="list-style-type: none"> Os grupos de 6, 10 e 15 Gy apresentaram menor ingesta média ao final do estudo
Comportamento	<ul style="list-style-type: none"> Um camundongo apresentou alteração da marcha, que foi atribuída ao posicionamento durante a radiação
Radiodermite	<ul style="list-style-type: none"> Nos grupos que receberam 25 e 30 Gy todos os camundongos apresentaram epilação No de 30 Gy eles ainda apresentaram eritema leve, tendendo a moderado

Fonte: O próprio autor.

4.3.3. Estudo dose-resposta

Devido às reações observadas no estudo de indução de radiodermite, com alteração da postura dos animais, pelo eriçado e início de radiodermite com tendência a aumento do Grau, optou-se por aplicar 30 Gy no estudo de dose-resposta. O intuito era promover radiodermite sem que fosse provocado comprometimento de funções importantes para os animais.

Estes foram submetidos às mesmas avaliações em relação ao consumo de ração e de água, peso, fotografia da área irradiada no momento do sacrifício, segundo sequência aleatorizada. Observe a variabilidade do peso dos animais (Gráfico 32)

Gráfico 32 – Boxplots da variável peso (g), segundo grupo de tratamento e dia de avaliação no estudo dose-resposta.

Fonte: O próprio autor.

O mesmo fato observado nos estudos anteriores quanto ao peso pode ser notado, onde havia uma grande variabilidade dos pesos inicialmente nos grupos. O grupo experimental 3 (E3) já iniciou o experimento com valores discrepantes (*outliers*), tanto superior quanto inferior, permanecendo assim na segunda avaliação, no D7. Já o experimental 2 (E2) apresentou discrepância (*outlier*) na quarta aferição (D 21). No D28 podemos observar uma menor variabilidade nos pesos dos animais dos grupos controle da radiação (CR) e nos experimentais 1 e 2 (E1 e E2), permanecendo ainda uma maior variabilidade no experimental 3 (E3) (Gráfico 32).

As medidas resumo relativas ao peso estão apresentadas na tabela 25. As médias do D0 e do D7 são relativas a 12 animais; as do D14 de nove; as do D21 de seis e do D28 de três.

Tabela 25 – Medidas relativas ao peso (g) dos camundongos nos diferentes grupos experimentais, por tempos estabelecidos. Ribeirão Preto, 2017.

Grupos/Tempos	Média	Mínimo	Máximo	Variância	DP*
Dia 0					
CR†	24,67	22,00	26,00	2,42	1,56
CF‡	26,00	24,00	28,00	2,18	1,48
E1§	21,67	20,00	24,00	2,79	1,67
E2	25,00	22,00	28,00	2,55	1,60
E3¶	22,17	20,00	24,00	1,79	1,34
Dia 7					
CR†	24,67	22,00	28,00	3,15	1,78
CF‡	25,33	22,00	28,00	3,15	1,78
E1§	22,50	20,00	24,00	1,55	1,24
E2	25,00	22,00	28,00	2,55	1,60

continua...

Grupos/Tempos	Média	Mínimo	Máximo	Variância	DP*
E3 [¶]	21,83	18,00	26,00	3,97	1,99
Dia 14					
CR [†]	24,89	22,00	28,00	3,11	1,76
CF [‡]	25,56	24,00	28,00	2,78	1,67
E1 [§]	22,67	22,00	24,00	1,00	1,00
E2	24,89	24,00	28,00	2,11	1,45
E3 [¶]	22,22	16,00	26,00	11,44	3,38
Dia 21					
CR [†]	24,67	22,00	26,00	2,67	1,63
CF [‡]	26,33	24,00	28,00	2,27	1,51
E1 [§]	23,00	22,00	26,00	2,80	1,67
E2	25,67	24,00	28,00	2,27	1,51
E3 [¶]	25,20	22,00	28,00	5,20	2,28
Dia 28					
CR [†]	26,00	26,00	26,00	0,00	0,00
CF [‡]	27,33	26,00	28,00	1,33	1,15
E1 [§]	24,00	24,00	24,00	0,00	0,00
E2	26,00	26,00	26,00	0,00	0,00
E3 [¶]	25,00	21,00	27,00	9,33	3,06

conclusão.

Nota: * Desvio-padrão; † Controle da radiação; ‡ Controle da formulação; § Experimental 1; || Experimental 2; ¶ Experimental 3

Todos os grupos apresentaram ganho ponderal no Dia 28, se comparado ao início do experimento, sendo no Experimental 3 o mais expressivo (12,78%), seguido pelo Experimental 1 (10,77%). Ainda, o grupo Experimental 3 observou-se maior variabilidade de peso a partir do Dia 7 (Tabela 25).

Foi observada perda ponderal no grupo Controle da formulação no Dia 7 (-2,56%) e Dia 14 (- 1,71%); no Experimental 2 no Dia 14 (- 0,44%) e no Experimental 3 no Dia 7 (- 1,50%), todos em relação ao início do estudo (Tabela 25).

Os dados da análise ajustada do Modelo misto, considerando a média e dispersão, estão apresentados na tabela 26.

Tabela 26 – Análise de modelo misto do peso dos animais no estudo dose-reposta. Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	Erro-padrão	t valor	Pr(> t)
Média				
Intercepto	3,1957	0,0053	599,2990	0,0000
CF*	0,0410	0,0060	6,8446	0,0000
E1‡	-0,0983	0,0060	-16,3897	0,0000
E2§	0,0136	0,0060	2,2745	0,0244
E3	-0,0875	0,0061	-14,3196	0,0000
Dia 7	-0,0031	0,0050	-0,6102	0,5427
Dia 14	0,0231	0,0055	4,2339	0,0000
Dia 21	0,0605	0,0063	9,5324	0,0000
Dia 28	0,0828	0,0080	10,3112	0,0000
Dispersão				
Intercepto	3,6055	0,0568	63,4583	0,0000

Nota: * Controle da formulação; ‡ Experimental 1; § Experimental 2; || Experimental 3

Houve diferença entre a média dos pesos dos animais entre os diferentes grupos e tempos, exceto para o D7 em relação ao D0 (p-valor = 0,5427). As médias foram menores nos grupos E1 e E3 e maiores no CF e no E2 em relação ao CR; já em relação aos dias, somente no D7 as médias foram menores que no D0. Quanto à dispersão, também houve diferença (Tabela 26).

A tabela 27 apresenta o consumo de água (mL) e ração (g) pelos camundongos nos respectivos grupos.

Tabela 27 – Média de consumo de água (mL) e de ração (g), por grupo e tempo de avaliação. Ribeirão Preto, 2017.

Grupos	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Água (mL)				
CR*	3,99	4,92	5,00	6,19
CF†	4,46	4,52	5,71	7,14
E1‡	4,29	4,52	6,07	6,90
E2§	4,70	6,27	5,24	7,86
E3	3,81	4,60	6,07	7,38
Ração (g)				
CR*	4,26	4,60	4,95	4,67
CF†	6,07	6,76	4,43	4,38
E1‡	4,52	4,10	4,67	4,76
E2§	3,83	5,24	7,62	6,29
E3	5,36	4,95	6,05	6,19

Nota: * Controle da radiação; † Controle da formulação; ‡ Experimental 1; § Experimental 2; || Experimental 3.

As diferenças, inicialmente, são relativas ao número de camundongos ao longo das semanas. Na primeira semana cada grupo tinha 12 animais, na segunda nove (9), na terceira seis (6) e na quarta, três (3). A exceção ocorreu no grupo E2, que na semana 2 teve um (1) animal a menos, por óbito (Tabela 27).

Todos os grupos apresentaram um aumento na ingesta hídrica, sendo este mais expressivo na semana 4 no E3 (93,75%), em relação ao início do experimento (Tabela 27).

Quanto ao consumo alimentar, os grupos CR e E2 tiveram um aumento ao longo de todo o experimento, se comparado ao início; o aumento mais expressivo ocorreu na semana 3 para o CR (16,20%) e E2 (98,76%). Somente o grupo CF terminou o experimento com consumo inferior ao inicial (-27,84%), fato que vinha acontecendo desde a semana anterior (-27,06%). Os grupos E1 e E3 apresentaram redução da ingesta alimentar na semana 2 (-9,47% e -7,56%, respectivamente) (Tabela 27).

Quanto à radiodermite, a tabela 28 apresenta as porcentagens de desenvolvimento em cada grupo, nos tempos pré-estabelecidos, a despeito de ter sido acompanhado diariamente durante 28 dias.

Tabela 28 – Porcentagem de radiodermite por Grau nos diferentes grupos. Ribeirão Preto, 2017.

Radiodermite	CR*	CF†	E1‡	E2§	E3
D7					
Grau 0	100,00%	100,00%	91,67%	100,00%	100,00%
Grau 1			8,33%		
D14					
Grau 0	100,00%	100,00%	100,00%	88,89%	37,50%
Grau 1				11,11%	62,50%
D21					
Grau 1			50,00%	33,33%	80,00%
Grau 2	50,00%	100,00%	50,00%	66,67%	20,00%
Grau 3	50,00%				
D28					
Grau 1	100,00%		100,00%		100,00%
Grau 2		66,67%		66,67%	
Grau 3		33,33%		33,33%	

Nota: * Controle da radiação; † Controle da formulação; ‡ Experimental 1; § Experimental 2; || Experimental 3.

Nesta avaliação foi interesse saber o início da radiodermite, por grupo. No CR esta se iniciou no D17; no CF no D15; no E1 teve um início mais precoce, no quinto dia após a RI, sendo que dois novos episódios só ocorreram no D15; no E2 no D14 e no E3 no D10. O E3, a

despeito de ter apresentado Grau 1 em maior porcentagem já no D14, foi o que também apresentou menor porcentagem de camundongos com Grau 2 ao longo do estudo (Tabela 28).

No grupo CR, no D21, 50,00 % dos camundongos apresentavam radiodermite de Grau 2 ou 3, sendo este último de início mais precoce entre os demais. Os únicos grupos que não apresentaram radiodermite Grau 3 foram o E1 e E3. Também foi observada redução de Grau nos grupos CR, E1 e E3 (Tabela 28).

No grupo E3 teve o óbito de um camundongo no D7, fato que pode estar relacionado à radiosensibilidade do animal ou ao posicionamento durante a radiação.

Em relação às citocinas quantificadas na pele de cada animal nos dias específicos de análise, os resultados serão apresentados separadamente.

Quanto à IL-1 β a variação dos resultados obtidos nos diferentes momentos de análise, de acordo com os grupos, esta ilustrada no gráfico 33.

Gráfico 33 – Boxplot da IL-1 β por dia e grupo. Ribeirão Preto, 2017.

Fonte: O próprio autor.

No D7, os grupos variaram entre si quanto à expressão de IL-1 β . O grupo mais homogêneo foi o CR, seguido pelo E2, os menores valores estão compreendidos no CR e os maiores no E3, porém o que apresentou maior variabilidade foi o E1. Já em relação ao D14, o mais variável foi o E3 e o menos o CF. No D21, o de menor variabilidade foi o E3 e o de maior foi o E1. No D28, os grupos foram mais homogêneos entre si, sendo que o de menor variabilidade foi o E1 e o de maior o E3; neste dia as medianas foram mais próximas (Gráfico 33).

Os dados descritivos nos tempos pré-determinados, de acordo com os diferentes grupos analisados, estão apresentados na tabela 29.

Tabela 29 – Medidas resumo da IL-1 β ao longo do estudo. Ribeirão Preto, 2017.

Dia	Grupo	Mínimo	Mediana	Média	Máximo	Dp*
D7	CR†	48,26	59,43	56,14	60,72	6,85
D7	CF‡	43,33	56,07	98,07	194,79	84,01
D7	E§1	123,18	172,47	189,12	271,71	75,65
D7	E2	74,44	110,39	100,80	117,55	23,10
D7	E3¶	174,03	176,68	211,41	283,51	62,46
D14	CR†	56,00	104,63	115,96	187,26	66,36
D14	CF‡	135,58	148,67	167,91	219,48	45,14
D14	E§1	112,86	207,84	192,17	255,81	72,75
D14	E2	75,55	141,84	157,33	254,59	90,52
D14	E3¶	377,76	474,33	517,74	701,12	166,00
D21	CR†	61,29	85,97	94,13	135,11	37,58
D21	CF‡	59,55	69,13	137,10	282,61	126,11
D21	E1§	112,67	248,24	605,47	1.455,50	739,26
D21	E2	100,14	525,42	533,95	976,29	438,14
D21	E3¶	45,34	64,27	64,27	83,19	26,77
D28	CR†	11,27	63,67	55,54	91,66	40,81
D28	CF‡	5,90	5,91	54,35	151,23	83,90
D28	E1§	8,40	11,06	29,96	70,44	35,07
D28	E2	4,30	9,11	38,65	102,55	55,39
D28	E3¶	0,51	14,52	79,73	224,15	125,27

Nota: * Desvio-padrão; † Controle da radiação; ‡ Controle da formulação; § Experimental 1; || Experimental 2; ¶ Experimental 3

Os menores e maiores valores de IL-1 β foram observados no grupo E3, no D28 e no D14, respectivamente. Já as menores e maiores médias foram no E1, no D28 e D21, respectivamente (Tabela 29).

Os resultados relativos à análise de regressão da IL-1 β em função da média e da dispersão estão apresentados na tabela 30.

Tabela 30 – Análise de regressão da IL-1 β , considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, segundo dia e grupo de tratamento. Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	san.se	wald	p-valor
Média				
Intercepto	4,0279	0,0575	4902,5911	0,0000
CF*	0,5578	0,3793	2,1620	0,1415
E1†	1,2145	0,1810	45,0464	0,0000
E2‡	0,5852	0,1478	15,6796	0,0001
E3§	1,3259	0,1171	128,3074	0,0000
Dia14	0,7254	0,2758	6,9169	0,0085
Dia21	0,5168	0,1968	6,8960	0,0086
Dia28	-0,0108	0,3511	0,0010	0,9754
CF*:Dia14	-0,1876	0,4164	0,2030	0,6523
E1†:Dia14	-0,7094	0,2156	10,8306	0,0010
E2‡:Dia14	-0,2802	0,1478	3,5937	0,0580
E3§:Dia14	0,1703	0,4303	0,1566	0,6923
CF*:Dia21	-0,1817	0,6977	0,0679	0,7945
E1†:Dia21	0,6468	0,6484	0,9951	0,3185
E2‡:Dia21	1,1504	0,5070	5,1491	0,0233
E3§:Dia21	-1,7089	0,2785	37,6464	0,0000
CF*:Dia28	-0,5794	0,6380	0,8249	0,3638
E1†:Dia28	-1,8315	0,3937	21,6407	0,0000
E2‡:Dia28	-0,9476	0,4761	3,9620	0,0465
E3§:Dia28	-0,9644	0,5207	3,4306	0,0640
Dispersão				
Intercepto	0,0099	0,0041	5,9426	0,0148
CF*	0,4793	0,1980	5,8612	0,0155
E1†	0,0967	0,0469	4,2514	0,0392
E2‡	0,0251	0,0164	2,3432	0,1258
E3§	0,0483	0,0255	3,5910	0,0581
D14	0,2084	0,0888	5,5086	0,0189
D21	0,0963	0,0433	4,9392	0,0263
D28	0,3500	0,1493	5,4972	0,0190
CF*:Dia14	-0,6494	0,2138	9,2237	0,0024
E1†:Dia14	-0,2195	0,0784	7,8457	0,0051
E2‡:Dia14	-0,0227	0,0164	1,9110	0,1669
E3§:Dia14	-0,1980	0,0751	6,9506	0,0084
CF*:Dia21	-0,0215	0,3016	0,0051	0,9432
E1†:Dia21	0,7908	0,4489	3,1041	0,0781
E2‡:Dia21	0,3175	0,2184	2,1130	0,1461
E3§:Dia21	-0,0675	0,0500	1,8213	0,1772
CF*:Dia28	0,7497	0,6339	1,3990	0,2369
E1†:Dia28	0,4567	0,3404	1,8002	0,1797
E2‡:Dia28	0,9839	0,4965	3,9279	0,0475
E3§:Dia28	1,2377	0,6194	3,9926	0,0457

Nota: * Controle da formulação; † Experimental 1; ‡ Experimental 2; § Experimental 3

As médias de IL-1 β dos grupos E1, E2 e E3 foram maiores do que as do CR de forma significantes; entre os dias de avaliação, estas foram maiores nos D14 e D21 do que no D7. Houve efeito de interação entre os grupos e dias para o E1 no D14, E2 e E3 no D21 e para o E1 e E2 no D28, sendo a média superior somente para o E2 no D21 em relação ao CR no D7 (Tabela 30).

Quando avaliamos o efeito da dispersão para a IL-1 β nota-se que houve maior variabilidade no CF (p-valor = 0,0155) e no E3 (p-valor = 0,0392) em relação ao CR (Tabela 43). Este efeito foi significativo em relação aos dias avaliados, sendo maiores as variabilidades obtidas no D14, D21 e D28, em relação ao D7. Quanto ao efeito de interação, este foi significativo para CF, E1 e E3 no D14 e para o E2 e E3 no D28. Nota-se que os dados foram mais variáveis no D14 para estes grupos em relação ao CR no D7, porém este fato foi diferente no D28, quando foram mais homogêneos (Tabela 30). Foi avaliado o efeito de correlação entre os dias e grupos, mas este não foi significativo (p=0,3152).

Quanto ao FNT – α a variação dos resultados obtidos nas análises nos diferentes momentos está ilustrada no gráfico 34.

Gráfico 34 – Boxplot do FNT - α por dia e grupo. Ribeirão Preto, 2017.

O FNT- α também variou nos dias e grupos estudados. Os grupos que menos apresentaram variabilidade foram o CR no D7 e D14, o E3 no D21 e E2 no D28. A maior variação foi observada no E1 no D7 e D14, o E2 no D21 e o CR no D28 (Gráfico 34).

Os dados do FNT – α , nos tempos pré-determinados, de acordo com os diferentes grupos analisados estão apresentados na tabela 31.

Tabela 31 – Medidas resumo do FNT – α ao longo do estudo. Ribeirão Preto, 2017.

Dia	Grupo	Mínimo	Mediana	Média	Máximo	Dp*
D7	CR†	51,46	66,63	66,30	80,80	14,68
D7	CF‡	35,40	46,51	123,60	288,90	143,26
D7	E1§	89,36	216,60	259,65	472,99	195,40
D7	E2	80,86	136,81	122,25	149,06	36,36
D7	E3¶	133,38	216,69	257,44	422,25	148,69
D14	CR†	80,37	87,53	88,92	98,86	9,32
D14	CF‡	115,43	158,63	173,55	246,57	66,83
D14	E1§	41,87	106,20	126,39	231,10	96,22
D14	E2	29,87	89,05	84,80	135,48	52,93
D14	E3¶	82,42	98,58	127,15	200,44	63,98
D21	CR†	39,21	45,39	50,96	68,29	15,32
D21	CF‡	57,21	69,39	69,35	81,44	12,12
D21	E1§	110,12	117,33	124,13	144,95	18,39
D21	E2	94,03	105,51	120,96	163,35	37,15
D21	E3¶	64,69	70,41	70,41	76,12	8,08
D28	CR†	21,63	55,35	89,94	192,85	90,70
D28	CF‡	4,62	10,81	26,55	64,21	32,76
D28	E1§	7,32	8,31	33,02	83,42	43,66
D28	E2	3,22	4,90	16,25	40,62	21,13
D28	E3¶	6,26	8,61	37,86	98,73	52,72

Nota: * Desvio-padrão; † Controle da radiação; ‡ Controle da formulação; § Experimental 1; || Experimental 2; ¶ Experimental 3

O menor valor do FNT- α foi observado no grupo E2 no D28 e o maior E1 no D7. O menor Desvio-padrão das quantificações foi no grupo E3, no D21 (Tabela 31).

Os resultados da análise de regressão do FNT- α em função da média e da dispersão estão apresentados na tabela 32.

Tabela 32 - Análise de regressão do FNT- α , considerando a média e da dispersão dos valores obtidos, segundo dia e grupo de tratamento. Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	san.se	wald	p-valor
Média				
Intercepto	4,1941	0,1044	1615,3654	0,0000
CF*	0,6229	0,5502	1,2818	0,2576
E1†	1,3652	0,2988	20,8754	0,0000
E2‡	0,6119	0,1618	14,2985	0,0002
E3§	1,3567	0,2158	39,5349	0,0000
Dia14	0,2936	0,1155	6,4659	0,0110
Dia21	-0,2630	0,1760	2,2343	0,1350
Dia28	0,3050	0,4867	0,3928	0,5308
CF*:Dia14	0,0458	0,5698	0,0064	0,9360
E1†:Dia14	-1,0136	0,4302	5,5509	0,0185
E2‡:Dia14	-0,6594	0,2944	5,0152	0,0251
E3§:Dia14	-0,9991	0,2875	12,0756	0,0005
CF*:Dia21	-0,3149	0,5588	0,3177	0,5730
E1†:Dia21	-0,4750	0,3073	2,3885	0,1222
E2‡:Dia21	0,2525	0,1620	2,4289	0,1191
E3§:Dia21	-0,9758	0,2360	17,0977	0,0000
CF*:Dia28	-1,8432	0,5795	10,1160	0,0015
E1†:Dia28	-2,3674	0,3504	45,6463	0,0000
E2‡:Dia28	-2,3232	0,2268	104,9458	0,0000
E3§:Dia28	-2,2218	0,3048	53,1239	0,0000
Dispersão				
Intercepto	0,0327	0,0133	5,9942	0,0144
CF*	0,8629	0,3710	5,4099	0,0200
E1†	0,3449	0,1567	4,8456	0,0277
E2‡	0,0263	0,0372	0,5004	0,4793
E3§	0,1897	0,0927	4,1879	0,0407
Dia14	-0,0253	0,0137	3,4335	0,0639
Dia21	0,0276	0,0277	0,9875	0,3204
Dia28	0,6453	0,2711	5,6673	0,0173
CF*:Dia14	-0,7714	0,3731	4,2735	0,0387
E1†:Dia14	0,0341	0,2194	0,0242	0,8764
E2‡:Dia14	0,2261	0,1102	4,2133	0,0401
E3§:Dia14	-0,0282	0,1137	0,0616	0,8040
CF*:Dia21	-0,9028	0,3718	5,8949	0,0152
E1†:Dia21	-0,3905	0,1578	6,1276	0,0133
E2‡:Dia21	-0,0236	0,0373	0,4021	0,5260
E3§:Dia21	-0,2409	0,0954	6,3784	0,0116
CF*:Dia28	-0,5254	0,4293	1,4975	0,2210
E1†:Dia28	0,1427	0,2651	0,2898	0,5903
E2‡:Dia28	0,4229	0,1431	8,7394	0,0031
E3§:Dia28	0,4247	0,2800	2,3008	0,1293

Nota: * Controle da formulação; † Experimental 1; ‡ Experimental 2; § Experimental 3

Em relação à média, nota-se que estas foram maiores nos grupos E1, E2 e E3 do que a do CR; quanto aos dias, foram maiores somente no D14 em relação ao D7, de forma significativa. Quanto ao efeito de interação, houve menor variabilidade dos dados nos grupos E1, E2 e E3 no D14, E3 no D21 e CF, E1, E2 e E3 no D28, todos comparados ao CR no D7 (Tabela 32).

Houve efeito da dispersão nos grupos CF, E1 e E3, grupos estes que apresentaram maior variabilidade que o CR; em relação aos dias, somente no D28 houve maior variabilidade dos dados, em relação ao D7. Quando analisado o efeito de interação entre os grupos e dias, somente para o CF e E2 no D14, para o CF, E1 e E3 no D21 e para o E2 no D28. Todavia, houve maior variabilidade dos dados tanto no D14 quanto no D28 para o E2, enquanto os outros foram mais homogêneos em relação ao CR no D7 (Tabela 32).

A variação dos resultados obtidos nas análises da IL-6 nos diferentes momentos, está ilustrada no gráfico 35.

Gráfico 35 – Boxplot da IL-6 por dia e grupo. Ribeirão Preto, 2017.

Fonte: O próprio autor.

Esta variável apresentou menor variabilidade ao longo do estudo nas três primeiras semanas, no entanto, na quarta apresentou uma maior variabilidade em todos os grupos. Esta foi mais pronunciada no grupo E3 (Gráfico 35).

Os dados descritivos da IL-6 estão apresentados na tabela 33.

Tabela 33 - Medidas resumo da IL-6 ao longo do estudo. Ribeirão Preto, 2017.

Dia	Grupo	Mínimo	Mediana	Média	Máximo	Dp*
D7	CR†	22,30	26,50	26,11	29,54	3,64
D7	CF‡	15,73	20,65	41,53	88,21	40,50
D7	E§1	19,30	33,26	35,49	53,91	17,41
D7	E2	29,62	42,81	38,55	43,21	7,74
D7	E3¶	61,96	69,02	93,03	148,11	47,83
D14	CR†	28,20	29,74	29,30	29,95	0,95
D14	CF‡	47,87	62,25	58,79	66,25	9,66
D14	E§1	18,30	37,66	45,55	80,69	31,94
D14	E2	13,99	20,23	26,68	45,82	16,87
D14	E3¶	22,77	35,58	40,86	64,24	21,23
D21	CR†	13,63	20,16	19,92	25,97	6,17
D21	CF‡	20,09	20,09	22,78	28,15	4,65
D21	E1§	33,20	52,39	50,31	65,33	16,17
D21	E2	32,25	42,63	48,66	71,08	20,10
D21	E3¶	24,21	24,24	24,24	24,26	0,04
D28	CR†	9,72	49,87	151,81	395,85	212,29
D28	CF‡	30,32	125,55	237,25	555,88	280,02
D28	E1§	34,08	324,72	320,31	602,14	284,06
D28	E2	19,63	70,86	247,36	651,59	351,01
D28	E3¶	25,71	112,40	315,99	809,85	429,89

Nota: * Desvio-padrão; † Controle da radiação; ‡ Controle da formulação; § Experimental 1; || Experimental 2; ¶ Experimental 3

O menor valor de IL-6 foi obtido no CR no D28, o maior no E3 no D28. A menor média foi observada no CR no D21 e a maior no E1 no D28 (Tabela 33).

Os resultados da análise de regressão da interação da IL-6, tanto em relação à média quanto a dispersão estão apresentados na tabela 34.

Tabela 34 - Análise de regressão da IL-6, considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, segundo dia e grupo de tratamento. Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	Erro-padrão	t valor	Pr(> t)
Média				
Intercepto	3,3490	0,0308	108,6176	0,0000
CF*	1,1997	0,0432	27,7504	0,0000
E1†	0,5891	0,0432	13,6258	0,0000
E2‡	0,3710	0,0434	8,5443	0,0000
E3§	1,6032	0,0433	37,0556	0,0000
Dia14	0,2580	0,0434	5,9463	0,0000
Dia21	-0,3120	0,0436	-7,1567	0,0000
Dia28	2,3965	0,0434	55,2285	0,0000
CF*:D14	-0,4644	0,0609	-7,6289	0,0000

continua...

Medida	Estimado	Erro-padrão	t valor	Pr(> t)
Média				
E1†:Dia14	-0,2991	0,0613	-4,8816	0,0001
E2‡: Dia14	-0,6497	0,0613	-10,5994	0,0000
E3§:Dia14	-1,3793	0,0609	-22,6342	0,0000
CF*:Dia21	-1,0554	0,0609	-17,3264	0,0000
E1†:Dia21	0,3631	0,0613	5,9238	0,0000
E2‡:Dia21	0,6262	0,0613	10,2151	0,0000
E3§:Dia21	-1,2694	0,0648	-19,5997	0,0000
CF*:Dia28	-1,7057	0,0609	-28,0156	0,0000
E1†:Dia28	-0,7905	0,0609	-12,9823	0,0000
E2‡:Dia28	-1,2519	0,0613	-20,4184	0,0000
E3§:Dia28	-2,2641	0,0613	-36,9499	0,0000
Dispersão				
3,3490	-2,9193	0,3968	-7,3567	0,0000
Escala				
3,3490	133,4544	101,0919	1,3201	0,1988

conclusão.

Nota: * Controle da formulação; † Experimental 1; ‡ Experimental 2; § Experimental 3

Para a IL-6 houve diferença tanto em relação aos grupos, quanto aos dias e para o efeito de interação entre os grupo e dias. Considerando os grupos CF, E1, E2 e E3, as médias destes foram maiores que as do CR; entre os dias, elas foram menores somente no D21 em relação ao D7; já em relação à interação, somente foram maiores no D21 para os grupos E2 e E3, em comparação ao CR no D7. Houve diferença entre as médias obtidas nos diferentes grupos e momentos em todas as interações avaliadas (Tabela 34). Também houve diferença entre as dispersões.

Agora os dados relativos à IL- 10 serão abordados. A variação dos resultados obtidos nos diferentes momentos está apontada no gráfico 36.

Gráfico 36 – Boxplot da IL-10 por dia e grupo. Ribeirão Preto, 2017.

Fonte: O próprio autor.

Ao contrário da IL-6 que apresentou menor variabilidade entre os grupos nas primeiras semanas, a IL-10 apresentou maior variabilidade nas três primeiras. A menor variabilidade ocorreu no grupo CR no D14 e a maior no E1 no D14 (Gráfico 36).

Os dados da análise descritiva relativos à IL-10 estão apresentados na tabela 35.

Tabela 35 - Medidas resumo da IL-10 ao longo do estudo. Ribeirão Preto, 2017.

Dia	Grupo	Mínimo	Mediana	Média	Máximo	Dp*
D7	CR†	29,02	79,27	63,20	81,32	29,62
D7	CF‡	31,67	60,51	118,59	263,58	126,40
D7	E§1	33,10	95,43	88,07	135,69	51,69
D7	E	73,63	96,01	100,92	133,10	30,03
D7	E¶	142,83	158,30	226,52	378,45	131,80
D14	CR†	73,23	75,43	82,78	99,69	14,68
D14	CF‡	130,42	151,45	152,25	174,89	22,24
D14	E§1	28,55	84,73	128,28	271,57	127,23
D14	E	36,41	73,33	75,78	117,61	40,66
D14	E¶	51,53	77,95	102,65	178,46	66,97
D21	CR†	34,70	39,31	48,22	70,64	19,56
D21	CF‡	42,98	68,65	64,46	81,74	19,72
D21	E§1	87,88	106,86	124,00	177,27	47,10
D21	E	82,35	90,87	128,77	213,08	73,14
D21	E¶	44,62	62,29	62,29	79,96	24,99
D28	CR†	5,52	46,06	55,72	115,57	55,66
D28	CF‡	0,38	44,99	44,99	89,60	63,09
D28	E§1	2,85	29,61	29,61	56,37	37,84
D28	E	1,99	22,38	22,38	42,77	28,83
D28	E¶	1,04	29,00	29,00	56,96	39,54

Nota: * Desvio-padrão; † Controle da radiação; ‡ Controle da formulação; § Experimental 1; || Experimental 2; ¶ Experimental 3

O menor valor da IL-10 foi observado no CF no D28 e o maior no E3 no D7. A menor média foi no E2 no D28 e a maior no E3 no D7 (Tabela 35).

O efeito de interação entre os dias de avaliação e os grupos, a partir da média e das dispersões das medidas, está apresentado na tabela 36.

Tabela 36 - Análise de regressão da IL-10, considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, segundo dia e grupo de tratamento. Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	san.se	wald	p-valor
Média				
Intercepto	4,1464	0,2209	352,1783	0,0000
CF*	0,6293	0,4187	2,2586	0,1329
E1†	0,3318	0,4748	0,4884	0,4846
E2‡	0,4679	0,3538	1,7486	0,1860
E3§	1,2765	0,2322	30,2169	0,0000
Dia14	0,2699	0,2362	1,3048	0,2533
Dia21	-0,2707	0,2922	0,8581	0,3543
Dia28	-0,0725	0,5111	0,0201	0,8873
CF*:Dia14	-0,0200	0,4319	0,0021	0,9632
E1†:Dia14	0,1062	0,6134	0,0300	0,8625
E2‡:Dia14	-0,5563	0,4000	1,9337	0,1644
E3§:Dia14	-1,0614	0,3256	10,6286	0,0011
CF*:Dia21	-0,3390	0,4419	0,5883	0,4431
E1†:Dia21	0,6128	0,4752	1,6631	0,1972
E2‡:Dia21	0,5144	0,3642	1,9946	0,1579
E3§:Dia21	-0,9035	0,2984	9,1705	0,0025
CF*:Dia28	-1,0974	0,4594	5,7064	0,0169
E1†:Dia28	-1,2846	0,6611	3,7760	0,0520
E2‡:Dia28	-1,5743	0,5876	7,1777	0,0074
E3§:Dia28	-2,0646	0,5684	13,1935	0,0003
Dispersão				
Intercepto	0,1465	0,0608	5,8007	0,0160
CF*	0,6109	0,3293	3,4421	0,0636
E1†	0,0832	0,0942	0,7797	0,3772
E2‡	-0,0874	0,0481	3,2955	0,0695
E3§	0,0792	0,1256	0,3979	0,5282
Dia14	-0,1255	0,0614	4,1765	0,0410
Dia21	-0,0368	0,0750	0,2403	0,6240
Dia28	0,4539	0,2336	3,7744	0,0520
CF*:Dia14	-0,6177	0,3296	3,5118	0,0609
E1†:Dia14	0,5516	0,2737	4,0606	0,0439
E2‡:Dia14	0,2583	0,0889	8,4415	0,0037
E3§:Dia14	0,1836	0,1652	1,2350	0,2664
CF*:Dia21	-0,6582	0,3335	3,8947	0,0484
E1†:Dia21	-0,0967	0,0946	1,0450	0,3067
E2‡:Dia21	0,1928	0,0682	7,9815	0,0047
E3§:Dia21	-0,1130	0,1357	0,6939	0,4048
CF*:Dia28	0,3067	0,5093	0,3627	0,5470

continua...

Medida	Estimado	san.se	wald	p-valor
Média				
E1†:Dia28	0,8034	0,2195	13,4013	0,0003
E2‡:Dia28	0,6093	0,1157	27,7400	0,0000
E3§:Dia28	0,4217	0,2093	4,0611	0,0439

conclusão.

Nota: * Controle da formulação; † Experimental 1; ‡ Experimental 2; § Experimental 3

Quando analisamos a média da IL-10 nos diferentes grupos de tratamento e dias podemos notar que esta foi maior que a do CR somente no grupo E3. Houve efeito de interação baseado na média para os grupos E3 no D14 e D21 e para o CF, E2 e E3 no D28, sendo estas médias menores do que a observada no CR no D7 (Tabela 36).

Quanto ao efeito da dispersão notou-se que no D14 os valores apresentaram menor variabilidade que no D7, de forma significativa. Também se observou efeito de interação, sendo este significativo nos grupos E1 e E2 no D14, CF e E2 e no E1, E2 e E3 no D28 em relação ao CR no D7. Somente no grupo CF no D21 estes dados apresentaram-se com maior variabilidade que no CR no D7 (Tabela 36).

Finalizando o painel de citocinas avaliado, apresentaremos o KC (IL-8). A variação dos resultados nos diferentes momentos está ilustrada no gráfico 37.

Gráfico 37 – Boxplot para o KC por dia e grupo.

Fonte: O próprio autor.

O KC também foi muito variável entre os dias e grupos. A menor variabilidade foi observada no grupo E3 no D21 e a maior no CR no D28. Não foram observados dados discrepantes (*outliers*).

Os resultados descritivos do KC estão apresentados na tabela 37.

Tabela 37 - Medidas resumo do KC ao longo do estudo. Ribeirão Preto, 2017.

Dia	Grupo	Mínimo	Mediana	Média	Máximo	Dp*
D7	CR†	156,67	161,06	165,38	178,41	11,49
D7	CF‡	73,02	133,14	254,87	558,46	264,63
D7	E§1	247,98	319,03	451,20	786,59	292,62
D7	E2	224,82	287,59	283,61	338,42	56,91
D7	E3¶	356,90	461,09	598,17	976,52	331,78
D14	CR†	146,68	156,55	201,82	302,24	87,10
D14	CF‡	245,32	392,71	361,83	447,46	104,55
D14	E§1	168,92	287,04	346,88	584,67	214,23
D14	E2	124,74	206,27	274,23	491,66	192,67
D14	E3¶	364,52	498,93	481,11	579,90	108,79
D21	CR†	85,66	157,62	146,34	195,75	55,90
D21	CF‡	90,92	157,61	190,24	322,20	119,04
D21	E§1	214,65	338,32	624,85	1321,59	606,55
D21	E2	109,04	568,46	493,54	803,12	353,05
D21	E3¶	122,43	134,58	134,58	146,73	17,18
D28	CR†	117,98	279,18	590,27	1373,66	683,20
D28	CF‡	180,24	220,79	327,41	581,20	220,72
D28	E§1	174,92	390,56	430,77	726,83	278,15
D28	E2	85,97	216,87	197,71	290,30	103,51
D28	E3¶	261,63	399,27	367,00	440,11	93,51

Nota: * Desvio-padrão; † Controle da radiação; ‡ Controle da formulação; § Experimental 1; || Experimental 2; ¶ Experimental 3

O menor valor de KC apresentado foi no CF no D7 e o maior no CR no D28. A menor média foi E3 no D21 e a maior no E1 no D21. O menor desvio-padrão foi observado nas medidas do CR no D7 (Tabela 37).

Os resultados da análise de regressão do KC, com base na média e na dispersão, estão apresentados na tabela 38.

Tabela 38 - Análise de regressão do KC, considerando a média e a dispersão dos valores obtidos, segundo dia e grupo de tratamento. Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	san.se	wald	p-valor
Média				
Intercepto	5,1082	0,0328	24307,6366	0,0000
CF*	0,4325	0,4583	0,8907	0,3453
E1†	1,0037	0,3308	9,2059	0,0024
E2‡	0,5394	0,1222	19,4777	0,0000
E3§	1,2856	0,2802	21,0534	0,0000
Dia14	0,1992	0,2061	0,9342	0,3338
Dia21	-0,1223	0,1830	0,4463	0,5041
Dia28	1,2724	0,5466	5,4184	0,0199
CF*:Dia14	0,1512	0,4780	0,1001	0,7517
E1†:Dia14	-0,4621	0,3518	1,7257	0,1890
E2‡:Dia14	-0,2328	0,1901	1,5000	0,2207
E3§:Dia14	-0,4169	0,3503	1,4169	0,2339
CF*:Dia21	-0,1702	0,6444	0,0698	0,7917
E1†:Dia21	0,4479	0,5532	0,6554	0,4182
E2‡:Dia21	0,6763	0,4699	2,0711	0,1501
E3§:Dia21	-1,3651	0,3542	14,8520	0,0001
CF*:Dia28	-1,0219	0,5192	3,8735	0,0491
E1†:Dia28	-1,3187	0,4593	8,2444	0,0041
E2‡:Dia28	-1,6331	0,4318	14,3034	0,0002
E3§:Dia28	-1,7609	0,5396	10,6500	0,0011
Dispersão				
Intercepto	0,0032	0,0013	6,0098	0,0142
CF*	0,7155	0,2897	6,0980	0,0135
E1†	0,2772	0,1140	5,9131	0,0150
E2‡	0,0236	0,0107	4,8763	0,0272
E3§	0,2019	0,0842	5,7543	0,0164
Dia14	0,1210	0,0505	5,7447	0,0165
Dia21	0,0941	0,0399	5,5693	0,0183
Dia28	0,8899	0,3631	6,0076	0,0142
CF*:Dia14	-0,7840	0,2945	7,0863	0,0078
E1†:Dia14	-0,1471	0,1346	1,1945	0,2744
E2‡:Dia14	0,1813	0,0949	3,6536	0,0559
E3§:Dia14	-0,2920	0,1054	7,6691	0,0056
CF*:Dia21	-0,5517	0,3070	3,2305	0,0723
E1†:Dia21	0,2537	0,3117	0,6627	0,4156
E2‡:Dia21	0,2203	0,1640	1,8047	0,1791
E3§:Dia21	-0,2911	0,0933	9,7231	0,0018
CF*:Dia28	-1,3056	0,3865	11,4090	0,0007
E1†:Dia28	-0,8923	0,3403	6,8756	0,0087
E2‡:Dia28	-0,7340	0,3739	3,8539	0,0496
E3§:Dia28	-1,0517	0,3705	8,0594	0,0045

Nota: * Controle da formulação; † Experimental 1; ‡ Experimental 2; § Experimental 3

Quando à média do KC, está foi maior nos grupos E1, E2 e E3 em relação ao CR e no D28, comparado ao D7. Observou-se efeito de interação, sendo que as médias dos grupos E3 no D21 e dos CF, E1, E2 e E3 no D28 foram menores do que a do CR no D7 (Tabela 38).

Quanto à dispersão dos resultados, as medidas de KC foram mais variáveis em todos os grupos em relação ao CR e em todos os dias, comparados ao D7. Também foi observado efeito de interação entre os grupos e dias, sendo que os dados apresentaram menor variabilidade no CF e no E3 no D14, no E3 no D21 e no CF, E1, E2 e E3 no D28 (Tabela 38).

Na sequência serão apresentados cortes histológicos da pele dos camundongos nos diferentes grupos e tempos de análise. Serão ilustradas imagens da pele íntegra (CP), do controle da radiação (CR), do controle da formulação (CF, gel de NLS sem CT) e dos grupos experimentais, sendo o E1 (gel contendo 5 mg de CT nas NLS), o E2 (gel contendo 17,5 mg de CT nas NLS) e E3 (gel contendo 30 mg de CT nas NLS).

Na Figura 14 estão apresentadas as fotografias das lâminas das peles coradas com HE, no aumento de 40X, referentes ao D7 após os camundongos serem submetidos a 30 Gy de RI e os tratamentos tópicos indicados ou a simples observação da pele. Serão dispostas imagens representativas de cada grupo do estudo dos-resposta, sempre em comparação com um controle da pele.

Figura 14 - Fotomicrografias de cortes histológicos da pele dos camundongos nos diferentes grupos no D7 pós-irradiação com 30 Gy, em comparação com um controle da pele normal.

Fonte: O próprio autor.

No grupo controle da pele (CP, lado superior esquerdo), a epiderme é fina, o estrato basal (EB) com uma camada única de células cuboides; escamas de queratina se despendendo do estrato córneo (EC) bem reduzido; camada papilar da derme (CP) menos densa; cristas

dérmicas e projeções interpapilares quase ausentes; camada reticular da derme (CR) rica em glândulas sebáceas (GS) e folículos pilosos (FP). Presença de mais fibras colágenas e fibroblastos (Figura 14).

No CR, grupo que recebeu uma dose única de 30 Gy de RI e no qual não foi aplicada nenhuma formulação via tópica, observa-se no D7, de uma maneira geral, uma epiderme também delgada, uma camada de queratina mais espessa e uma derme rica em anexos (glândulas sebáceas e folículos pilosos). As células estão viáveis, com núcleos bem delimitados, corados em roxo pela hematoxilina; um citoplasma, tanto para as células da epiderme quanto da derme, também bem definido, uma derme mais corada, evidenciando maior expressão de colágeno, um dos principais componentes da matriz extracelular (MEC), ambos corados em rosa pela eosina (Figura 14).

No CF, grupo que também recebeu uma dose única de 30 Gy de RI e no qual foi aplicada formulação tópica contendo NLS sem curcuminoides, nota-se que as células estão viáveis, com núcleos bem delimitados (roxos), a derme apresenta anexos (glândulas sebáceas e folículos pilosos) e a MEC está mais densa que no CR (Figura 14).

O grupo E1, grupo que também recebeu uma dose única de 30 Gy de RI e recebeu aplicação tópica de gel com 5mg de CT nas NLS, nota-se uma epiderme viável (núcleo roxo), com células bem delimitadas, uma derme rica em anexos (glândulas sebáceas e folículos pilosos), além de uma MEC mais densa e desorganizada que nos grupos CP, CR e CF, além de um número maior de fibroblastos e a presença escamas de queratina mais abundantes (Figura 14).

Já o grupo E2, após RI com 30 Gy e sete dias de aplicação tópica da formulação contendo 17, 5 mg de CT nas NLS, nota-se uma epiderme viável, com células bem visíveis e delimitadas, uma derme também rica em anexos e uma MEC mais densa que nos controles. Entretanto, há mais fibroblastos e células inflamatórias e vasos linfáticos (Figura 14).

Quanto grupo E3, grupo que recebeu a maior dose de CT (30 mg de CT nas NLS) após 30 Gy de RI, observa-se uma epiderme viável, com células aparentemente mais alongada (núcleos fortemente corados em roxo) e uma maior quantidade de queratina sendo formada. A MEC está mais densa e rica em fibras colágenas, a derme com grande quantidade de anexos (glândulas sebáceas e folículos pilosos), um maior número de fibroblastos e poucas células de infiltrado inflamatório (Figura 14).

Na sequência serão apresentadas as fotomicrografias do D14 de todos os grupos.

Figura 15 - Fotomicrografias de cortes histológicos da pele dos camundongos nos diferentes grupos no D14 pós-irradiação com 30 Gy, em comparação com um controle da pele normal.

Fonte: O próprio autor.

Nos grupos CR, CF, E1, E2 e E3 a epiderme está viável, com núcleos corados e bem delimitados, nota-se a presença de anexos e um aumento da produção de queratina e de desprendimento de placas da epiderme. No entanto, no CR a derme está menos corada, com a presença de uma maior quantidade de fibras colágenas e a presença de mais espaços. O grupo CF, difere do CR por apresentar uma MEC mais fortemente corada, indicando uma maior deposição de colágeno (Figura 15).

Nos grupos E1, E2 e E3 há uma aparente deposição mais desorganizada de colágeno na MEC, mais marcadamente no E2, porém não se observa infiltrado inflamatório típico (Figura 15).

Na figura 16 estão apresentadas as fotomicrografias do D21 de todos os grupos.

Figura 16 - Fotomicrografias de cortes histológicos da pele dos camundongos nos diferentes grupos no D21 pós-irradiação com 30 Gy, em comparação com um controle da pele normal.

Fonte: O próprio autor.

Os cortes mostram claramente o efeito da RI na pele. Por si só a RI promove um aumento da produção/deposição de colágeno na MEC da derme (CR), o que já o diferencia da pele íntegra neste modelo experimental (camundongos). A epiderme reativamente produz mais queratina e fica evidente a descamação mais acentuada das escamas desta proteína (CR). Quando se aplica uma formulação contendo NLS sem curcuminoides ainda se observa que a MEC fica mais corada, com feixes aparentemente mais grossos (Figura 16).

Ao se aplicar o produto contendo CT, em diferentes concentrações, nota-se que a epiderme está viável, porém com menor produção de queratina e menor descolamento de escamas desta proteína. Há a presença de anexos e a MEC da derme também está fortemente corada, no entanto, no grupo E2 temos a aparência de tecido fibrótico e no E3 nota-se a presença de vasos sanguíneos (neovascularização) e linfáticos (Figura 16).

Na figura 17 estão apresentadas as fotomicrografias do D28 de todos os grupos.

Figura 17 - Fotomicrografias de cortes histológicos da pele dos camundongos nos diferentes grupos no D28 pós-irradiação com 30 Gy, em comparação com um controle da pele normal.

Fonte: O próprio autor.

No D28 os efeitos da RI (CR) são bem evidentes; a epiderme ainda está viável, porém mais delgada e com muitas escamas de queratina se desprendendo. Não se observa a presença de anexos como nas imagens dos dias anteriores e a deposição de colágeno na MEC da derme está acentuada (figura 17).

Quando se analisa o grupo CF a epiderme está bem descamativa, há a presença de anexos mas o tecido parece muito tenso, se comparado à pele íntegra (Figura 16). Ainda, observa-se uma maior quantidade anexos. No E1 e E2 a MEC está mais fortemente corada que no E3, característico de fibrose (Figura 17). Chama a atenção que no grupo E3, de forma mais acentuada, o tecido parece estar mais próximo da imagem da pele íntegra, com uma tendência a remodelação e equilíbrio em relação à quantidade de colágeno depositada.

Além da análise histológica qualitativa da pele dos camundongos nos tempos e grupos estabelecidos, foi feita uma análise quantitativa da % de colágeno. A variabilidade destas porcentagens está ilustrada no gráfico 38.

Gráfico 38 – Boxplots da porcentagem de colágeno nos diferentes grupos do estudo, nos intervalos de tempo avaliados.

Fonte: O próprio autor

A porcentagem de colágeno apresentou-se muito variável entre os grupos e dias. A maior variabilidade ocorreu no D14, sendo o E3 o de maior variabilidade, seguida do D21, pelo CF. Os grupos experimentais, ao final de 28 dias, apresentaram maior variabilidade na expressão de colágeno do que os controles. Foram observados dados discrepantes (*outliers*) em todos os dias.

Na tabela 39 estão apresentadas as medidas resumo relativas ao colágeno, por grupo e por dia de avaliação.

Tabela 39 - Medidas resumo relativas à porcentagem de colágeno na pele dos camundongos nos diferentes grupos. Ribeirão Preto, 2017.

Dia	Grupo	Mínimo	Mediana	Média	Máximo	Dp*
D7	CR†	0,0755	0,1146	0,1097	0,1544	0,0250
	CF‡	0,0810	0,1055	0,1113	0,1484	0,0219
	E1§	0,0871	0,1433	0,1436	0,2236	0,0311
	E2	0,0601	0,1051	0,1046	0,1542	0,0236
	E3¶	0,0447	0,0934	0,0986	0,1828	0,0292
D14	CR†	0,0686	0,1565	0,1488	0,2317	0,0449
	CF‡	0,0772	0,1624	0,1611	0,2273	0,0416
	E1§	0,0924	0,1173	0,1389	0,2321	0,0459
	E2	0,0658	0,1054	0,1065	0,1866	0,0267
	E3¶	0,0464	0,1127	0,1118	0,1920	0,0489
D21	CR†	0,0702	0,0985	0,1068	0,1849	0,0309
	CF‡	0,0378	0,1088	0,0969	0,1642	0,0366
	E1§	0,0519	0,0924	0,0947	0,1543	0,0244
	E2	0,0222	0,0806	0,0788	0,1199	0,0313
	E3¶	0,0190	0,0460	0,0510	0,0964	0,0248

continua...

Dia	Grupo	Mínimo	Mediana	Média	Máximo	Dp*
D28	CR†	0,0450	0,0840	0,0855	0,1198	0,0175
	CF‡	0,0319	0,0741	0,0708	0,1158	0,0223
	E§1	0,0654	0,1001	0,0977	0,1230	0,0183
	E2	0,0613	0,1156	0,1177	0,1750	0,0344
	E3¶	0,0774	0,1290	0,1289	0,1707	0,0288

conclusão.

Nota: * Desvio-padrão; † Controle da radiação; ‡ Controle da formulação; § Experimental 1; || Experimental 2; ¶ Experimental 3

O menor valor no geral foi observado no grupo E3 no D21 e o maior no E1 no D14. Entretanto, quando avaliamos a média por grupo, o E1 foi o que apresentou a maior (média = 0,1187). Já em relação ao dia, a maior média observada foi no D14 (média = 0,1334) e a menor no D28 (média = 0,1001) (Tabela 39).

Os resultados da análise de regressão acerca da % de colágeno, considerando as médias e as dispersões estão apresentados na tabela 40.

Tabela 40 – Análise de regressão em relação à média e a dispersão da % de colágeno na pele dos camundongos. Ribeirão Preto, 2017.

Medida	Estimado	Erro Padrão	t valor	Pr(> t)*
Média				
Intercepto	-2,0919	0,0602	-34,7691	0,0000
CF†	0,0226	0,0846	0,2674	0,7893
E1‡	0,3031	0,0806	3,7596	0,0002
E2§	-0,0528	0,0858	-0,6152	0,5388
E3	-0,1307	0,0871	-1,5001	0,1345
Dia 14	0,3441	0,1004	3,4269	0,0007
Dia 21	-0,0196	0,1005	-0,1944	0,8459
Dia 28	-0,2632	0,0909	-2,8957	0,0040
CF†:Dia 14	0,0773	0,1400	0,5520	0,5813
E1‡:Dia 14	-0,3780	0,1403	-2,6945	0,0074
E2§:Dia 14	-0,2905	0,1481	-1,9614	0,0507
E3 :Dia 14	-0,2332	0,1493	-1,5622	0,1192
CF†:Dia 21	-0,1666	0,1441	-1,1566	0,2483
E1‡:Dia 21	-0,4247	0,1414	-3,0046	0,0029
E2§:Dia 21	-0,3179	0,1494	-2,1275	0,0341
E3 :Dia 21	-0,6779	0,1792	-3,7825	0,0002
CF†:Dia 28	-0,2477	0,1315	-1,8841	0,0604
E1‡:Dia 28	-0,1573	0,1234	-1,2749	0,2032
E2§:Dia 28	0,3769	0,1248	3,0213	0,0027
E3 :Dia28	0,5721	0,1245	4,5948	0,0000
Intercepto	-2,4357	0,0806	-30,2380	0,0000
Dia 14	0,4688	0,1161	4,0377	0,0001

continua...

Medida	Estimado	Erro Padrão	t valor	Pr(> t)*
Dispersão				
Dia 28	0,0239	0,1141	0,2093	0,8343

conclusão.

Nota: * valor do teste; † Controle da Formulação; ‡ Experimental 1; § Experimental 2; || Experimental 3.

Quanto à média da % de colágeno, esta foram maiores no grupo E1 em comparação ao grupo CR. Em relação aos grupos, as médias do D14 foram maiores que as do D7 e as do D28 menores. Foi observado efeito de interação mista entre os grupo e tempos, sendo estes no grupo E1 no D14, no E1, E2 e E3 no D21 e no E2 e E3 no D28, em relação ao CR no D7. No entanto, somente no D28 estas médias foram maiores que no D7 no CR (Tabela 40).

Conforme observado na tabela 40, houve diferença para a dispersão da % de colágeno no D14 e D21 em comparação ao D7. Nestes dias os valores apresentaram maior variabilidade que no D7.

No quadro 3 estão resumidos os achados do estudo dose-resposta.

Quadro 3 – Resumo dos resultados do estudo dose-resposta.

Estudo dose-resposta	CR	CF	E1	E2	E3
Peso	Maior estabilidade de peso	Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)	Teve menor média que o CR (p-valor<0,05)	Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)	Teve menor média que o CR (p-valor<0,05)
Consumo alimentar	Mais estável	Menor média na semana 3 e 4	Menor média na semana 2	Menor média na semana 1	Mais estável
Ingesta hídrica	Menor média na semana 1, 3 e 4	Menor média na semana 2	Maior média na semana 2	Maior média na semana 1, 2 e 4	Maior média na semana 3
Comportamento	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Teve um óbito no D7, atribuído ao posicionamento e à radiosensibilidade do animal
Radiodermite	Teve redução de Grau G1 no D17 Teve G3 Maior % de G3 Todos finalizaram com G1	Sem redução de Grau G1 no D15 Teve G3 A maioria finalizou com G2	Teve redução de Grau G1 no D15 Não teve G3 1 <i>outlier</i> com G1 (D5) Todos finalizaram com G1	Sem redução de Grau G1 no D14 Teve G3 A maioria finalizou com G2	Teve redução de Grau G1 no D10 Não teve G3 Menor % de G2 Todos finalizaram com G1
IL-1β			Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)	Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)	Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)
FNT-α			Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)	Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)	Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)
IL-6		Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)	Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)	Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)	Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)
IL-10					Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)
KC			Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)	Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)	Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)
Pele - histologia	Epiderme delgada, tendência à fibrose e presença de espaços na derme. Derme menos corada. Rarefação de anexos no D28.	Epiderme delgada, tendência à fibrose, presença de espaços na derme e de anexos no D28.	Epiderme delgada, tendência à fibrose, presença de espaços na derme e de anexos no D28	Epiderme delgada, tendência à fibrose, presença de espaços na derme e de anexos no D28	Epiderme delgada, menor depósito aparente de colágeno, presença de vasos sanguíneos e linfático na derme e de anexos no D28.
% Colágeno			Teve maior média que o CR (p-valor<0,05)		

Fonte: O próprio autor.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A discussão será apresentada na mesma sequência adotada para a apresentação do método e dos resultados, de acordo com as etapas desenvolvidas. Inicialmente serão discutidos os resultados obtidos no teste de estabilidade das três formulações (5 mg, 17,5 mg e 30 mg em 100g de gel).

5.1. Etapa 1: Estudos de estabilidade

Quanto às características organolépticas analisadas nas três formulações acondicionadas em embalagens brancas e opacas, com tampa de rosca e batoque, mantidas em temperatura ambiente de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ de UR, não foram observadas alterações significativas ao longo dos três primeiros meses. Somente uma delas (NLS-CT - 30mg) apresentou alterações visualmente observáveis no T6 (sexto mês), ficando mais opaca. Tratava-se da formulação com maior teor lipídico, em decorrência da maior concentração de NLS-CT. A literatura aponta que pode haver uma alteração na transição polimórfica dos lipídeos que encapsulam o princípio ativo (SERRA et al., 2009), alterando sua cristalinidade e este fato pode interferir na estabilidade do produto final (TAGLIARI et al., 2008).

Em relação ao pH, as alterações apresentadas pelas formulações no T6 (Gráfico 17) podem indicar que ocorreu alguma alteração físico-química. Alteração esta que pode estar mais relacionada à perda de estabilidade do princípio ativo do que da base (gel), pois esta possui maior estabilidade nesta faixa de pH e, segundo Corrêa et al. (2005), gel de hidroxietilcelulose possui estabilidade em ampla faixa de pH (PHARMASPECIAL, 2008; ANIDROL, 2014; VELOSO, 2012).

Outra questão importante a ressaltar é que a molécula de curcumina possui tautomerismo ceto-enol (PRIYADARSINI, 2009). De acordo com Toledo (2013), a forma cetônica predomina em soluções aquosas ácidas e neutras, onde apresenta a capacidade de doar hidrogênio. Em pH básico ($\text{pH} \geq 8$) há o predomínio da forma enólica, conferindo a esta molécula a propriedade antioxidante, como doadora de elétrons (WANG et al., 1997).

Analizando a alteração de pH observada ao longo dos seis meses podemos inferir que houve uma tendência de aumento do pH, fato que pode alterar as propriedades do produto final em uma das principais atividades atribuídas à curcumina que é o potencial antioxidante deste fenol. Portanto, o envase e a temperatura de acondicionamento são questões importantes para a manutenção das propriedades que devem ser mantidas.

Para Tonnensen e Karlsen (1985) a curcumina é instável em pH maior que 7,0, resultado corroborado por Rusig e Martins (1992), que verificaram que a faixa de pH entre 4 e 7 confere maior estabilidade à molécula e que, em pH superior a 7, a velocidade de degradação é mais significativa.

Porém, há controvérsias na literatura. Alguns estudos apontam que a forma enólica é mais estável (PRIYADARSINI, 2009) e que ao ser avaliada por difração de raios-X, foi possível identificar que a posição do átomo de hidrogênio da forma enólica, entre dois átomos de oxigênio, confere maior estabilidade à molécula (PARIMITA et al., 2007).

Quanto ao comportamento reológico, os reogramas das diferentes formulações demonstraram um comportamento reológico pseudoplástico (Gráficos 18 e 19). A formulação 1 (5 mg) e a 3 (30 mg) apresentaram maior tensão de cisalhamento no T0, sendo que uma força maior foi empregada na mais concentrada. A formulação 3, por conter mais NLS-CT, apresentou oscilação, com um gráfico menos regular do que as demais, também no T0.

Em geral, os géis hidrofílicos possuem comportamento reológico do tipo pseudoplástico, ou seja, deformam-se durante a aplicação, tornando-se mais fluídos e facilitando o espalhamento, recuperando a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra (MARTIN, 1993).

O que pode ser observado é que as formulações apresentaram menor viscosidade aparente no T6 (Tabela 7) e a literatura classifica a hidroxietilcelulose como agente doador de viscosidade em formulações semi-sólidas, com comportamento viscoelástico (MINER, 1993). Fato não foi corroborado por este estudo.

Em relação ao teor de ativo (curcuminoides) observa-se que as Formulações 2 e 3 (NLS-CT – 17,5 e 30 mg) se mantêm estáveis, pelo menos, até três meses, em temperatura de 25 °C $\pm$ 3 °C e 75% $\pm$ 5% de UR (Tabela 8). A maior perda de curcumina ocorreu na Formulação 1 (NLS-CT – 5 mg), 68,8 % no T3 e 74,6% no T6. Ainda, observou-se uma concentração de curcumina na Formulação 3 (NLS-CT – 30 mg), com um aumento de 39,20% no T3 e de 42,7% de curcuminoides também no T3, já no T6, houve um aumento de 57,7% de curcuminoides em relação ao T0 (Tabela 8).

Este fato pode ser explicado pela perda de água das formulações ao longo do tempo de armazenamento, onde uma mesma massa pode ter maior concentração de CT. Além disto, a temperatura de armazenamento pode ter alterado o estado da estrutura cristalina da cera de abelha, bem como pode ter ocorrido uma interação entre os componentes da formulação (AULTON, 2005).

É sabido que a concentração utilizada ou o tipo de umectante podem promover a perda de água da formulação, contribuindo para o ressecamento da preparação e, como resultado, observa-se a elevação da viscosidade (CORRÊA et al., 2005). Esta é uma das maiores causas de perda de estabilidade e redução do prazo de validade das preparações semi-sólidas (CORRÊA et al., 2005). No entanto, as formulações perderam viscosidade.

Em outros estudos com NLS, estas foram mantidas em temperatura menor e apresentaram maior estabilidade. Quanto aos curcuminoides, no estudo de Nayak et al. (2010) as NLS foram liofilizadas e armazenadas na ausência de luz e em temperatura ambiente para a realização de teste de estabilidade física e química, durante 6 meses. A porcentagem de curcuminoides remanescentes esteve entre 88 e 91%. Já Kakkar et al. (2011), mantiveram NLS em frascos a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ por 1 ano e realizaram coletas nos meses 0, 6 e 12 para avaliação. Após 1 ano não houve decréscimo de 3% da droga ligada.

Neste estudo não foi realizada liofilização ou outro método de secagem das NLS-CT, fato que pode ter comprometido a estabilidade das mesmas. Ainda, os produtos de degradação da curcumina não foram avaliados e poderiam ser uma explicação para esta alteração observada no T6.

5.2. Etapa 2: Estudos *in vitro*

Na sequência serão discutidos os dados relativos aos estudos em culturas celulares.

5.2.1. Viabilidade celular de queratinócitos e fibroblastos

Houve diferença entre as viabilidades celulares médias dos queratinócitos (HaCaT) quando estes foram submetidos aos diferentes tratamentos com NLS, NLS-CT e CT e em relação às doses. As exceções estão nas doses 2,500 $\mu\text{g/mL}$ e 5,000 $\mu\text{g/mL}$, quando comparadas à menor dose (0,078 $\mu\text{g/mL}$). A média da porcentagem de viabilidade celular foi maior nas doses acima de 0,0078 $\mu\text{g/mL}$, além de serem mais homogêneos os resultados obtidos nos grupos tratados com CT, em comparação às NLS e NLS-CT.

Estes são dois tipos celulares fundamentais na pele. Participam ativamente do processo de reparo tecidual, por isso foram escolhidas para estes testes pré-clínicos. Ambas eram de linhagens normais e, a maioria dos experimentos vistos na literatura é feito com células alteradas ou neoplásicas, onde a menor viabilidade celular é o objetivo. Lundvig et al. (2015) avaliaram os efeitos da curcumina no reparo de lesão. Para isto, avaliaram a viabilidade de

celular de queratinócitos (HaCaT) tratados com dose crescentes de curcumina e o papel citoprotetor da enzima heme-oxigenase. Concluíram que a curcumina induz apoptose de forma dose-dependente via caspases em células HaCaT e os efeitos celulares e a morte celular foram observados em doses acima de 20 mM. A apoptose induzida pela curcumina em células HaCaT é mediada por ROS.

Outra questão importante foi a opção por tratar as células com doses pequenas (ng/mL), tão abaixo das observadas na literatura. Intentava-se observar o comportamento dos curcuminoides, que ora têm propriedades antioxidantes, ora pró-oxidantes; comportamento estes atribuído a diferentes fenóis.

Conforme visto no gráfico 21A e 21B, os extremos de doses promovem menor viabilidade celular para os queratinócitos (HaCaT). É sabido que os curcuminoides apresentam baixa absorção, quando ingeridos por via oral e que este fato se expressa na baixa biodisponibilidade; além disto, são ativos em baixas concentrações em diferentes tecidos biológicos. Aqui a via de administração não foi tópica, somente interessa a variabilidade de efeitos oriunda destes polifenóis.

Quanto aos fibroblastos (CCD), também houve diferença entre as viabilidades celulares médias entre os diferentes tratamentos e doses. As exceções estão na dose de 0,156 µg/mL, 0,625 µg/mL e 2,500 µg/mL, quando comparadas à menor dose (0,078 µg/mL). A média da porcentagem de viabilidade celular foi menor nas doses acima de 0,0078 µg/mL, além de serem mais homogêneos os resultados obtidos nos grupos tratados com CT, em comparação às NLS.

No geral, as NLS foram menos citotóxicas que as NLS-CT e os CT, tanto para os queratinócitos quanto para os fibroblastos (Gráficos 21 e 23) nas mesmas concentrações, além dos fibroblastos serem mais resistentes aos tratamentos do que os queratinócitos. Também não houve diferença na viabilidade celular após cada uma das linhagens celulares serem submetidas ou não à 2 Gy de RI (Gráficos 21 e 23).

Ainda, as doses nestes testes foram administradas diretamente às células, em monocamadas, estando elas em contato direto com os produtos e sem a possibilidade de intercâmbio com outros tipos celulares. Este fato pode alterar completamente seu comportamento num tecido mais organizado como a pele. Trata-se de uma limitação destes experimentos, no entanto, os resultados podem indicar uma dose mais apropriada.

5.2.2. Liberação de β -hexosaminidase e citotoxicidade em mastócitos

O potencial alergênico dos curcuminoides incorporados em sistemas de nanopartículas lipídicas sólidas tem sido pouco analisado. Consequentemente, analisar a capacidade dos curcuminoides para inibir a ativação de mastócitos e a degranulação foram considerados neste estudo.

A degranulação de mastócitos após estimulação por alérgenos é um evento importante na resposta alérgica (WERNERSSON; PEIJLE, 2014; KAMBAYASHI; KORETZKY, 2007).

A conhecida ativação antígeno-mastocítica desencadeia uma cascata de sinalização responsável pelos sintomas de inflamação alérgica, segundo Seuanes et al. (2015). A liberação de muitos mediadores químicos, como mediadores lipídicos, prostaglandinas e leucotrienos, citocinas, IL-4, TNF- α e conteúdo de grânulos citoplasmáticos, histamina, β -hexosaminidase e serotonina estão relacionados a esse processo (GALI; TSAI; PILIPONSKY, 2008).

A porcentagem média de liberação de β -hexosaminidase foi maior no grupo tratado com NLS-CT do que com CT. Ainda, a porcentagem de liberação desta enzima não representa um perfil de atividade antialérgica usual. Ainda, os curcuminoides não-encapsulados (CT) e os encapsulados (NLS-CT) não estimularam a liberação de β -hexosaminidase nos mastócitos quando comparados com o controle. Entretanto, o comportamento das células tratadas com CT foi diferente até doses abaixo de 2,500 $\mu\text{g/mL}$ entre os diferentes tratamentos e doses ($p = 0,0000$) (Tabela 11).

O menor potencial antialérgico pode ser atribuído aos curcuminoides liberados das NLS-CT no período analisado (2h), quando comparados aos curcuminoides não encapsulados.

A literatura aponta os curcuminoides como substâncias similares aos anti-inflamatórios não esteroides AINEs, inibindo as duas isoformas da ciclooxigenase, denominadas COX-1 e COX-2. Estas enzimas são responsáveis pela produção inicial de prostaglandinas, moléculas envolvidas na resposta alérgica via cascata do ácido araquidônico (KIM et al., 2014). Portanto, esperávamos que os CT e as NLS-CT pudessem ter um efeito positivo na inibição da liberação de β -hexosaminidase, o que não ocorreu (Gráfico 25), à exceção apenas para a dose de CT de 5,00 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, segundo Matsuda et al. (2004), as olefinas conjugadas nas posições 1 a 7 e os grupos 4' e 4'-hidroxila dos curcuminoides estão relacionados à atividade antialérgica, enquanto os grupos 3' e 3'-metoxila melhoraram apenas a atividade destes compostos.

A liberação controlada de curcuminoides do NLS-CT, apesar das concentrações de curcuminoides nos diferentes tratamentos serem equivalentes, pode estar associada ao

comportamento diferente destes compostos quando não encapsulados em relação à % de liberação de β -hexosaminidase dos mastócitos no experimento, Tabela 11 e gráfico 25.

A atividade inibitória dos curcuminoides ($IC_{50} = 4,9 \mu\text{g/mL}$) foi consideravelmente mais potente que a exibida pelo fumarato de cetotifeno ($IC_{50} = 65,5 \mu\text{g/mL}$), determinado a partir de trabalho anterior (SANTOS et al., 2013). O cetotifeno é um estabilizador de mastócitos que é usado como controle positivo em ensaios de degranulação de mastócitos (SERNA et al., 2006).

O efeito citotóxico nos mastócitos observado neste estudo é corroborado por outros que demonstraram a influência de curcuminoides não encapsulados na viabilidade celular, onde doses acima de $5 \mu\text{g/mL}$ em células neoplásicas de próstata PC-3M e nas células epiteliais normais da próstata são consideravelmente citotóxicas (KURAPATI et al., 2015).

5.3. Etapa 3: Estudos *in vivo*

Na sequência serão discutidos os dados relativos aos estudos *in vivo*, tanto de toxicidade da formulação, quanto de indução de radiodermite e de dose-resposta.

5.3.1. Estudo de Toxicidade

Os dados deste estudo não corroboram os de outros, que indicam que os curcuminoides estão associados a reações locais de hipersensibilidade quando administrados topicamente (BALAJI; CHEMPAKAM, 2010) e que a toxicidade de NLS estaria relacionada às moléculas utilizadas para obtenção dos sistemas carreadores (CHEN et al., 2009). Os excipientes e os princípios ativos (curcuminoides) utilizados não parecem ter adicionado toxicidade à formulação desenvolvida, na via de administração utilizada. A pele dos cinco animais observados ao longo dos 21 dias não sofreu nenhuma reação inflamatória ou alérgica.

Na produção das NLS-CT foi utilizado o polissorbat 80, Tween 80, um adjuvante aniônico amplamente utilizado em cosméticos, produtos alimentícios e formas farmacêuticas orais, parenterais e tópicas (SHAHANI; PANYAM, 2011; ZHANG et al., 2011; NAYAK et al., 2010). Não há produtos de decomposição perigosos e a toxicidade não é esperada em condições normais. No entanto, reações de hipersensibilidade foram relatadas na literatura em estudos pré-clínicos e clínicos (SHELLEY et al., 1995; ESCHALIER et al., 1988), fato não corroborado por este estudo.

Outro adjuvante utilizado na produção das NLS-CT foi a lecitina, com 96% de fosfatidilcolina, PC. Pode ser utilizado como excipiente, por razões tecnológicas ou como ingrediente fisiologicamente ativo em diversas aplicações (LOPES, 2016; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). A lecitina, essa mistura complexa de fosfolipídios e outros componentes, como triglicérides, ácidos graxos, esteróides e glicolipídios, pode ser caracterizada pelo seu conteúdo lipídico polar. É um constituinte natural de todas as células, apresenta funções essenciais para humanos, animais e plantas e sua composição fosfolipídica é o que determina sua funcionalidade em diferentes aplicações.

A cera de abelha, usada como carreador de curcuminoides neste sistema lipídico, é um produto da secreção glandular de abelhas operárias. Sua composição é lipídica, basicamente ácidos graxos, entre os quais ceróticos e palmítico, além de ésteres alcoólicos, traços de própolis (aproximadamente 6%), pólen e diferentes pigmentos.

Durante o tratamento tópico com gel de 30 mg/100g de NLS-CT, os cinco camundongos não apresentaram perda ponderal considerável, permaneceram ativos e sem sinais de sofrimento.

Quanto ao consumo de ração, houve um aumento no consumo médio, exceto na primeira semana. Este aumento foi mais acentuado no grupo experimental. Em relação à ingesta hídrica, esta decresceu na terceira semana no grupo experimental e na segunda e terceira no controle, porém sem repercussão na média de peso.

Adicionalmente, foi realizada uma avaliação de parâmetros sanguíneos de toxicidade renal e hepática, entre eles, ureia, creatinina, fosfatase alcalina, proteínas totais e TGP. As diferenças entre os grupos foram significativas somente para as proteínas totais (p-valor = 0,025). Apesar de ter sido observada diferença entre os grupos, quando avaliamos dados da literatura para normalidade destes parâmetros, os resultados contribuem para que se possa inferir, preliminarmente, que a formulação em teste não apresenta toxicidade aguda para os rins e fígado (SPINELLI et al., 2012).

É sabido que estabelecer uma relação de causa e efeito entre uma formulação e um dano hepático pode ser muito difícil. Segundo Sharon (1995), na clínica dos pequenos animais, normalmente anormalidades nas atividades séricas de enzimas hepáticas podem ser indicadores sensíveis de alterações hepatobiliares, que podem ser decorrentes de alterações reversíveis ou irreversíveis na permeabilidade celular, indução de enzimas microsomais ou lesões estruturais associadas à necrose, colestase ou isquemia hepatocelular. Ainda, considera que muitos processos patológicos envolvendo o fígado podem causar elevações proporcionalmente distintas nas enzimas hepáticas, devido à variação na distribuição de cada enzima específica no

lóbulo hepático (SHARON, 1995). Neste projeto um animal foi responsável pela elevação da média das proteínas totais, não sendo esta uma característica de todo o grupo experimental nem do controle.

Outro parâmetro que pode ser associado a dano hepatobiliar é a fosfatase alcalina. Geralmente qualquer hepatopatia ativa pode aumentar seus valores, mas as maiores elevações nos níveis da enzima ocorrem nos casos de obstrução. O animal que apresentou maior elevação nas proteínas totais não foi o mesmo que teve elevação na fosfatase alcalina, fato que poderia ter contribuído para uma provável inferência de toxicidade da formulação, à despeito de drogas hepatotóxicas apresentarem elevações menores desta enzima (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Neste estudo, por se tratar de roedores, a preocupação incorria no fato dos animais ingerirem a formulação em teste, que apesar de ser tópica, poderia ter outra via de absorção (a oral). Além disso, na literatura poucos estudos apresentaram testes de toxicidade direta e indireta a órgãos como coração, fígado, rins, pulmão, baço, estômago e intestinos, além de dados preliminares *in vitro*, com diferentes linhagens celulares (DANDEKAR et al., 2010a; NAYAK et al., 2010; PUGLIA et al., 2012; DANDEKAR et al., 2010b; CHEN et al., 2009).

Enquanto a pele é geralmente uma barreira eficaz contra substâncias estranhas, o trato digestório é mais vulnerável. No entanto, são os pontos mais prováveis de entrada para nanopartículas, além do trato respiratório. Sabe-se, também, que a extensão da absorção de partículas é afetada pelo tamanho, química de superfície, carga, tempo de administração e dosagem (HOET; BRUSKE-HOHLFELD; SALATA, 2004). As NLS-CT aplicadas topicamente neste estudo estão na faixa de maior possibilidade de absorção. Somando-se a este fato, temos a pele dos roedores, com uma epiderme com menos camadas do que a pele humana (ANDRADE, 2007) e com um número bem maior de pêlos, locais indicados como maiores responsáveis pela penetração de NLS (CONTRI et al., 2011).

Um estudo avaliou a toxicidade aguda de nanopartículas de curcumina na ingestão oral, mostrando que a formulação não parece apresentar toxicidade aguda na dose de 2000 mg/kg (DANDEKAR et al., 2010a). Outro avaliou a toxicidade aguda e subaguda de nanopartículas contendo curcumina em hidrogel administrada em fêmeas de ratos Holtzman. Os animais não apresentaram toxicidade aguda ou subaguda ou alterações significativas de peso; os parâmetros hematológicos, bioquímicos e de órgãos também não sofreram alterações significativas (DANDEKAR et al., 2010a).

Quaisquer efeitos mecânicos da administração devem ser considerados e tal abordagem foi discutida devido as características inerentes entre as espécies adotada neste estudo. Este fato permitiu algumas inferências quanto à distinção entre os efeitos mecânicos e as ações físico-

químicas, toxicológicas ou farmacodinâmicas da formulação. Para essa distinção, além das análises histológicas, a tricotomia da área nos animais do grupo controle serviu de comparação. Se uma reação cutânea local ocorresse, poderia estar associada ao processo de tricotomização e não apenas ao produto em teste.

Os cortes histológicos dos órgãos foram importantes para analisar possíveis efeitos locais não observáveis pela avaliação macroscópica. Como pode ser visto nas figuras 9 a 12, não foram observadas alterações histológicas. A arquitetura do órgão permaneceu normal e a presença de infiltrado inflamatório não foi visualizada. A diferença pôde ser observada na pele dos animais do grupo experimental, figura 13, onde a matriz extracelular apresentou-se mais organizada, com maior concentração das fibras colágenas.

Segundo o estudo de Fathima et al. (2009), a curcumina promove alterações físico-químicas na molécula de colágeno. Os curcuminoides estão associados à proteção da matriz cutânea através da inibição da degradação enzimática das fibras de colágeno, ou da promoção da síntese e deposição de colágeno pelos fibroblastos (MOON et al., 2010; DOU et al., 2018).

5.3.2. Estudo de indução de radiodermite

Foi induzida radiodermite de Graus 1, 2 e 3, sem provocar alterações sistêmicas nos camundongos. Em doses acima de 25 Gy a probabilidade de indução desta toxicidade foi mais significativa. Com 25 e 30 Gy todos os animais apresentaram epilação e com 30 Gy eritema leve a moderado.

Os animais, apesar de serem da mesma linhagem e idade, apresentaram diferenças quanto às médias dos pesos, cabendo destaque para os grupos que receberam 20 Gy, 25 Gy e 30 Gy em relação ao de 6 Gy. Também foi observada perda ponderal na primeira semana em quase todos os grupos, fato que pode marcar a fase inicial do processo de reparo tecidual, em decorrência da lesão que foi induzida pela RI. Estes possuem um metabolismo mais acelerado que também pode influenciar o tempo de reparo das lesões. Adicionalmente, por não terem apresentado perda ponderal ao longo das outras semanas, mostra que não houve o comprometimento sistêmico e que a proteção corporal instituída foi eficaz.

Num estudo onde foi avaliada a resposta tecidual e fatores relacionados à susceptibilidade ao desenvolvimento de radiodermite em diferentes linhagens de roedores, iniciando com 10 Gy até 60 Gy, os autores sugeriram que existe uma diferença na expressão

gênica envolvendo o processo de dano, reparo e remodelamento das lesões (IWAKAEA et al., 2003).

Archambeau, Pezner e Wasserman. (1995) observaram que em doses entre 20 e 25 Gy a perda de células da membrana basal começa a ser notada, sendo que a máxima depleção é observada com doses próximas à 50 Gy. O objetivo deste estudo de indução não era promover a depleção máxima de células da membrana basal e nem proporcionar a perda dos anexos (folículos pilosos e glândulas sebáceas), mas sim verificar o desenvolvimento de radiodermite de forma gradual. De fato, não foi observada perda desta membrana após 30 Gy em nenhum dos grupos analisados.

Ainda, Rezvani et al. (1991) observaram que a maioria das lesões nos animais estavam recuperadas em quatro semanas após o término do tratamento. Este fato contribuiu para o aumento no período de observação, que passou de três para quatro no estudo de dose-resposta subsequente.

Na literatura podemos observar que para a indução de radiodermite e radionecrose foram utilizados diferentes tipo de radiação, dose total, fracionamento e modelos experimentais. Ainda, dada a difícil operacionalização de estudos como estes, alguns autores desenvolveram equipamentos tanto para a produção de radiação ionizante quanto para a fixação dos animais (SINGH et al. 2015; MOSCA, 2014).

A variabilidade de modelos dificulta a reprodução e a comparação dos resultados. Contudo, estudos neste campo são necessários para melhorar a compreensão dos fenômenos que se sucedem na fisiopatia da radiodermite aguda, tardia e da radionecrose.

O painel de expressão de citocinas e quimiocinas ainda é pouco compreendido, por isso em muitos estudos são utilizados marcadores inflamatórios mais conhecidos e as análises são realizadas nos tempos mais estudados deste processo.

5.3.3. Estudo dose-resposta

No estudo dose-resposta 60 camundongos BALB foram alocados em diferentes grupos, sendo 12 em cada um, a saber: controle da radiação (CR); controle da formulação (CF); experimental 1, que recebeu aplicação tópica de gel contendo 5 mg de CT em NLS (E1), o experimental 2, que recebeu aplicação tópica de gel contendo 17,5 mg de CT em NLS (E2) e o experimental 3, que recebeu aplicação tópica de gel contendo 30 mg de CT em NLS (E3). Estes animais foram mantidos em condições sanitárias semelhantes, com livre oferta de água e ração.

Observamos uma grande variabilidade do peso dos animais nos diferentes grupos, sendo esta variabilidade significativa. Todos apresentaram ganho ponderal no D28, em relação ao D0; houve perda ponderal no D7 (Tabela 22).

No estudo de Yoon et al. (2012), com uma espécie diferente de camundongos (Hairless-1), submetidos a RI com 60 Gy (10 Gy – 6 dias) na pata posterior, houve perda ponderal significativa dos animais no grupo experimental em relação ao controle entre o D6 e o D23, fato não corroborado neste estudo. Talvez esta diferença se justifique pelo modelo experimental adotado e pela dose total de RI empregada.

Quanto ao consumo alimentar, todos os grupos apresentaram um aumento do consumo no D28 em relação ao D7. Em relação à ingesta hídrica, todos a aumentaram em relação ao início do estudo. Estes resultados reforçam o fato que, tanto a RI quanto os tratamentos aos quais os animais foram submetidos não refletiram em perda ponderal significativa.

Em relação ao Grau de radiodermite avaliado macroscopicamente, no CR esta se iniciou no D17; no CF no D15; no E1 teve início precoce (D5 após a RI), sendo que novos episódios só ocorreram no D15; no E2 no D14 e no E3 no D10. O E3 apresentou menor porcentagem de camundongos com Grau 2 ao longo do estudo. Os únicos grupos que não apresentaram radiodermite Grau 3 foram o E1 e E3. Também foi observada redução de Grau nos grupos CR, E1 e E3.

O óbito de um camundongo no grupo E3 (D7) pode estar associado a radiosensibilidade do animal e ao posicionamento durante a radiação. Estudos apontam que a letalidade em consequência de problemas intestinais ocorre por volta de 10 dias após a exposição à radiação. Ainda, na literatura há relato que a linhagem BALB possui um defeito no reparo de dano de cadeia dupla no DNA, responsável pela sua maior sensibilidade à radiação (OKAYASU et al., 2000).

Quanto às citocinas quantificadas por Elisa na pele dos camundongos, também observamos uma grande variabilidade dos resultados entre os diferentes grupos. A maior expressão de IL-1 β foi no D21 no grupo E1 e a menor no D28 no grupo E3. As médias dos valores foi maior nos grupos E1, E2 e E3 em relação ao CR e no D14 e D21 em relação ao D7 (Tabela 30).

A literatura aponta a IL-1 como uma citocina que desempenha um papel crucial na fisiopatogênese da radiodermite (HAUBNER et al., 2012). Janko et al. (2012) desenvolveram um modelo experimental em camundongos e observaram que os que apresentavam deficiência tanto na IL-1 quanto no seu receptor celular desenvolveram menos inflamação e alterações

patológicas na pele, em comparação com os animais com expressão normal destas moléculas, principalmente alterações tardias.

Quanto ao FNT- α , esta molécula também apresentou grande variabilidade de expressão entre os grupos e dias, sendo maiores nos grupos E1, E2 e E3 em relação ao CR (Tabela 32). Entre os dias, a média foi maior somente para o D14 em relação ao D7 (Tabela 44).

A maior expressão de FNT- α foi observada no D7 no grupo E1, seguido do E2 e do CF e a menor no D28 no grupo E2, seguido do CF (Tabela 31). A menor expressão desta molécula pro-inflamatória no D28 em todos os grupos foi significativa e corrobora com os achados histológicos, onde não foram observados infiltrados inflamatórios característicos.

O FNT- α é uma molécula importante na genese do processo inflamatório, sendo considerado um potente pro-inflamatório (HAUBNER et al., 2012). Juntamente com a IL-1 β , é uma das substâncias superexpressas logo após a indução de lesão por RI na fase inflamatória (HERSKIND; BAMBERG; RODEMANN, 1998, apud HAUBNER et al., 2012).

Um importante alvo bioquímico da curcumina é o Fator Nuclear Kappa B (FN- κ B, do inglês NF- κ B), uma proteína que participação da resposta inflamatória, processos tumorais e em infecções parasitárias. Ela inibe a via do FN- κ B, em diversos pontos; captura radicais reativos, minimizando a ativação da via que necessita de espécies reativas de oxigênio; inibe uma das proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de proteínas que irão se transformar em FN- κ B; inibe a enzima óxido nítrico sintase e a ligação no DNA do fator de transcrição de c-jun/AP-1, pontos posteriores da via do FN- κ B. Consequentemente, a curcumina inibe a transcrição de muitas citocinas e quimiocinas, entre elas o FNT- α e a IL-6 (SUETH-SANTIAGO et al. 2015).

Em relação à IL-6, esta citocina apresentou maior variabilidade entre os grupos no D28 e a menor no D21, sendo que no grupo CR esta foi menor e no grupo E3 maior. Após análise de regressão em função da média da expressão, esta mostrou diferença em relação aos grupos e dias e apresentou efeito de interação dia-grupo (Tabela 34). As médias foram maiores nos grupos CF, E1, E2 e E3.

Trata-se de uma citocina pro-inflamatória que age na maturação e ativação de neutrófilos, na maturação de macrófagos e na diferenciação e manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células matadoras naturais (*natural killer*) (OLIVEIRA et al., 2011).

O FNT- α e a IL-1 são potentes indutores da IL-6, sendo este um dos mediadores mais precoces e importantes tanto na indução quanto na síntese e liberação de proteínas de fase aguda, de acordo com Oliveira et al. (2011). Uma atividade interessante desta citocina é a propriedade anti-inflamatória durante a lesão, por liberar receptores solúveis de FNT (sFNTRs)

e IL-1AR (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; RAEBURN et al., 2002).

Quanto à citocina IL-10, observamos uma maior variabilidade no D7 e no D14. Houve diferença entre as médias das quantificações entre o grupo E3 em relação ao CR, entre o grupo E3 nos dias D14, D21 e D28 em relação ao CR no D7, e entre o CF e o E2 no D28 em relação ao CR no D7 (Tabela 36).

A IL-10 é sintetizada por células imunológicas e tecidos neuroendócrino e neural, atuando na inibição de citocinas pro-inflamatórias, principalmente FNT, IL-1 e IL-6 (ASADULLAH et al., 2004; POTT et al., 2007, apud OLIVEIRA et al., 2011).

Já o KC (IL-8) teve maior expressão no D28 no grupo CR, a menor no D7 no CF e a menor média no D21 no CR. As médias dos grupos E1, E2 e E3 foram maiores do que a do CR; também houve diferença entre a média do D28 em relação ao D7. Outro fato que chamou a atenção foi que houve efeito de interação significativo para os grupos CF, E1, E2 e E3 no D28, em relação ao CR no D7 (Tabela 38).

O KC (IL-8) é um importante fator relacionado às doenças inflamatórias e autoimune devido as suas propriedades pró-inflamatórias (HARADA et al., 1994; KOCH et al., 1992). A expressão de IL-8 é influenciada por diferentes estímulos, cabendo destaque para os que promovem estresse celular como espécies reativas de oxigênio, privação de nutrientes, hipóxia e citocinas pró-inflamatórias como por FNT- α , IL-1 β ou infiltração de macrófagos. Estudos apontam que gene promotor de IL-8 contem sítios de ligação de diversos fatores de transcrição, sendo que a regulação por FN-kB parece ser necessária para atividade de transcrição (MUKAIDA; MAHE; MATSUSHIMA, 1990). Portanto, sua expressão pode ser alterada de forma indireta pelos curcuminoides.

Em relação às análises histológicas, a pele dos animais nos grupos E1, E2 e E3 sofreram modificações em relação ao controle da pele íntegra (CP) e ao controle da radiação (CR). As alterações no CR foram progressivas e demonstraram a deposição de colágeno característica após a RI.

Nos animais tratados com curcuminoides pode-se observar a presença de vasos sanguíneos e linfáticos, além de uma derme tendendo à normalidade no D28, após uma intensa deposição de colágeno nas semanas anteriores. Também pode ser observada uma menor descamação da epiderme e anexos mais fortemente marcados e presentes. No D28, o CR apresentava sinais de fibrose e espaços na derme diferente dos grupos experimentais.

Em relação ao percentual de colágeno da pele dos camundongos dos diferentes grupos, este também foi bastante variável (Gráfico 38). O menor valor foi observado no grupo E2 no

D21 e o maior no E1 no D14. Porém, em relação à média, o grupo que apresentou a maior foi o E1. Já em relação ao dia, a maior média foi no D14 e a menor no D28 (Tabela 40).

É sabido que a RI promove a produção e deposição de colágeno na derme de forma desorganizada e em maior quantidade, fator que tem implicação na formação de fibrose (IWAKAWA et al., 2003).

Na literatura há referência acerca das propriedades da curcumina na qualidade da produção da MEC em processo de cicatrização da pele (SAJITHALAL; CHITTRA; CHANDRKASAN, 1998). Foi sugerido que ocorrem mudanças na viscosidade e na superfície tensora na interação entre a molécula de colágeno e a curcumina, e que um aumento na concentração desta substância pode resultar na agregação proteica, aumentando a estabilidade do colágeno à temperatura (FATHIMA et al. 2009).

Os mecanismos de lesão por radiação permanecem pouco entendidos e pesquisas como esta são essenciais para elucidar tais questões.

Neste estudo, dificuldades referentes à estabilidade das NLS-CT merecem novos investimentos, pois a cera de abelha sofre alteração na sua consistência em temperaturas próximas a 30°C, temperatura esta comumente observada no nosso país. Ainda, os curcuminoides possuem muita afinidade pelos lipídeos, podendo interferir na quantificação do ativo em tempos superiores ao analisado (seis meses). É necessário pensar em armazenamento em geladeira, o que encarece o processo.

Além disso, o próprio modo de preparo das NLS, que necessita de uma temperatura de 70°C e uma alta taxa de cisalhamento, promove o desgaste de materiais que compõem a haste do equipamento e liberação de limalha. Este fato pode ser minimizado com o emprego de um planejamento mais adequado e com aumento de escala, observando a altura da coluna aquosa e formação de vórtice.

Quanto ao modelo experimental adotado, apesar de ser considerado mais radiossensível que outros camundongos, ainda assim possui uma pele delgada e um processo de reparo tecidual mais rápido que o dos seres humanos. Porém, foi importante realizar esta etapa em camundongos e, a sugestão é que novos estudos sejam realizados, talvez em ratos ou coelhos, pois possuem uma epiderme com mais camadas e um tempo de reparo tecidual mais parecido com o dos seres humanos.

Outras dificuldades referem-se ao tempo de exposição de cada camundongo à RI e ao número de animais estudados, bem como a procedimentos técnicos.

Estudos de marcadores do processo inflamatório e de reparo tecidual em pele são sugeridos para etapas futuras.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Foi possível atingir todos os objetivos listados nesta tese. A formulação é estável por pelo menos três meses e mostrou ser promissora para aplicações futuras. As análises de estabilidade mostrando as características organolépticas foram realizadas. Não houve mudança significativa quanto à cor, odor e sensação ao tato. Somente pode ser observada uma alteração na coloração da formulação mais concentrada (30 mg) na avaliação do T6, fato que pode ser atribuído ao teor lipídico. Quanto aos aspectos físico-químicos, houve uma elevação do pH (acima de 7) das formulações contendo 17,5 e 30 mg de CT nas NLS no T6, também atribuída ao teor lipídico.

As três formulações apresentaram comportamento reológico pseudoplástico nos diferentes tempos analisados e perderam viscosidade no T6 em relação ao T0, porém apresentaram boa espalhabilidade.

Em relação ao teor de ativos (curcumina e curcuminoides), após seis meses de análise das formulações na embalagem na qual foram acondicionada (pote branco, opaco, com tampa de rosca e batoque), pode ser observada uma perda de água que levou a formulação 3 a uma aparente concentração, em relação às demais. Foi uma perda considerável dos curcuminoides e este fato foi atribuído ao envase e temperatura de acondicionamento.

Nos estudos *in vitro*, com culturas celulares, foi possível observar que os queratinócitos são mais sensíveis aos CT e às NLS-CT do que os fibroblastos e os mastócitos, mostrando um perfil de citotoxicidade diferente do produto, de acordo com o tipo celular e a dose empregada. As NLS, isoladamente, são menos citotóxicas que os curcuminoides livres. Já as NLS-CT também demonstraram menor citotoxicidade que os curcuminoides livres na maioria das doses aplicadas. Este resultado é positivo, visto que os curcuminoides são substâncias utilizadas há milênios e os seus efeitos são considerados importantes para a saúde humana.

Além da citotoxicidade, ao se avaliar se as NLS-CT e os CT poderiam causar alguma reação alérgica não se observou, a partir dos dados obtidos na metodologia empregada, indícios que pudessem atribuir a estas substâncias um potencial alergênico. Considerando que há relatos na literatura acerca de reações cutâneas atribuíveis aos curcuminoides quando aplicados topicamente, os resultados são satisfatórios quanto a este aspecto.

Em relação ao estudo de toxicidade da formulação, esta mostrou-se segura na via e dose administrada, não promovendo alterações nos marcadores de função renal e hepática dos camundongos. Os animais não apresentaram alteração comportamental e nem perda ponderal

considerável. Também não foram observadas alterações na arquitetura tecidual do coração, fígado, rins e pulmão dos animais, em relação ao grupo controle.

Como se tratava de pele saudável, foi interesse avaliar reações locais onde foi aplicada topicamente a formulação. Pode ser notado no grupo experimental a derme mais fortemente corada, com mais fibras de colágeno e uma MEC mais organizada. Esta análise qualitativa foi corroborada pela quantitativa, onde os resultados expressaram um aumento percentual de colágeno de 34,03% (p-valor < 0,0001).

Foi induzida radiodermite com sucesso, em doses menores do que as observadas na literatura, sem provocar sofrimento aos animais. Os animais não apresentaram alterações comportamentais e nem apresentaram perda ponderal significativa.

No estudo dose-resposta também não se observou perda ponderal significativa e nem alteração comportamental que pudesse sugerir sofrimento. A exceção se deu no camundongo 9 do E3, que foi a óbito no D7. Uma possível movimentação do animal ou a radiosensibilidade podem, eventualmente, estar relacionadas a esses achados.

Quanto à radiodermite, o grupo E3 apesar de apresentar uma maior incidência de radiodermite Grau 1 no D14, foi o que apresentou menor incidência de Grau 2 no estudo, além de ter apresentado redução de Grau 2 para 1 e não ter tido nenhum Grau 3.

Além disso, os camundongos que receberam tratamento tópico (formulação sem e com NLS-CT) manipulavam a área irradiada frequentemente, o que pode ter contribuído para uma piora aparente (macroscópica) da área irradiada, nos outros grupos (CF, E1 e E2). Este fato foi confirmado com as análises histológicas.

Os grupos E1, E2 e E3 apresentaram maior média de expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , FNT- α , IL-6 e KC. Todavia, o E3 apresentou a maior média de expressão da IL-10, uma citocina anti-inflamatória induzida pela IL-1 β e pelo FNT- α . Este fato pode ser observado na histologia, onde a pele do animal do grupo E3 estava mais parecida com a pele íntegra do que os outros grupos.

Quanto ao colágeno, por tratar-se de pele que havia recebido 30 Gy de RI, o comportamento esperado é um depósito de colágeno na derme que pode evoluir para fibrose. O grupo E1 foi o que apresentou maior média que o CR (p-valor = 0,0002); quanto ao dia, o D14 também teve a maior média em relação ao D7 (p-valor = 0,0007) e o D28 a menor (p-valor = 0,0040).

Podemos inferir que a formulação tópica contendo NLS-CT (30 mg CT/100 g de gel de hidroxiethylcelulose) não apresentou toxicidade local ou sistêmica, conferiu um melhor aspecto à pele íntegra através do aumento da porcentagem de colágeno após 21 dias de aplicação. Ainda,

foi a mesma formulação aplicada no grupo E3 do estudo dose-resposta que proporcionou mudanças no padrão de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias e na porcentagem de colágeno, conferindo à pele um aspecto mais próximo ao do controle da pele saudável dos camundongos.

POTENCIALIDADES

POTENCIALIDADES

Este estudo permitiu que uma rede de colaboração fosse constituída e isso é importante para o avanço das pesquisas e das relações entre os pesquisadores.

As análises realizadas poderão contribuir para uma melhor compreensão do mecanismo de dano tecidual provocado pela RI ao tecido saudável.

Dada à evolução das fases da pesquisa, os resultados apresentados poderão ser motivo de complementação quanto ao processo de desenvolvimento das NLS. O aumento da escala de produção de NLS ainda é pouco estudado e motivo de interesse em estudos futuros no Laboratório de Física Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Os resultados obtidos nestas etapas são encorajadores para o desenvolvimento de estudos em seres humanos saudáveis, primeiramente, num ensaio fase I, para estabelecer uma evolução preliminar da segurança e do perfil farmacocinético da formulação.

E, se possível, para um de fase II, considerado um estudo piloto, em pacientes em tratamento radioterápico, potencialmente passíveis de desenvolver radiodermite.

Também são importantes os dados relativos ao colágeno na pele não irradiada após a utilização da formulação. A área de dermocosmética pode ser uma nova frente de investigação, pois muitos produtos contra o envelhecimento da pele são focados no aumento desta substância.

Além, ainda, de ser promissor como anti-inflamatório em processos osteoarticulares de uso tópico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS⁴

ABE, Y.; HASHIMOTO, S.; HORIE, T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. **Pharmacological Research**, London, v. 39, n.1, p. 41-47, Jan. 1999.

ARCHAMBEAU, J. O.; PEZNER, R.; WASSERMAN, T. Pathophysiology of irradiated skin and breast. **International Journal of Radiation and Oncology, Biology, Physics**, v. 31, p.1171-1185, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia brasileira**. 3a ed. São Paulo: Andrei, 1977.

_____. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

_____. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2004. 52 p. (Série Qualidade em Cosméticos, 1).

_____. **Formulário de fitoterápicos da farmacopeia brasileira**. Brasília, 2011. 126 p.

_____. **Formulário nacional da farmacopeia brasileira**. 2a ed. Brasília, 2012. 224 p.

_____. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: ANVISA e Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia (GESEF), 2013. 48 p.

_____. **Monografia da espécie Curcuma longa L. (Curcuma)**. Brasília: ANVISA, 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/05/Monografia-Curcuma.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 3, n. 9, p. 745-756, Sep. 2003.

AGGARWAL, B. B.; EESSALU, T. E.; HASS, P. E. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. **Nature**, London, v. 318, n. 6047, p. 665-667, Dec. 1985.

AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. C.; KIM, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood**, New York, v. 119, n. 3, p. 651-665, Jan. 2012.

AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. C.; SUNG, B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 169, n. 8, p. 1672-1692, Aug. 2013.

⁴ De acordo com a associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 40-59, 2009.

AGRAGONIK, M. **Equações de estimação generalizadas (GEE): aplicação em estudo sobre mortalidade neonatal em gemelares de Porto Alegre, RS (1995-2007)**. 2009, 111 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

AGRESTI, A. **Categorical data analysis**. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons, 2013. 744 p.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. Tradução Ana Beatriz Gorini Veiga et al. 4a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALMEIDA, A. S. et al. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 6, p. 429-432, dez. 2008. doi: 10.1590/S1676-24442008000600006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v44n6/06.pdf>>. Acesso em: 06 fev. 2018.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis Ediciones SRL, 1998.

ANDRADE, M. et al. Prevenção de reações de pele devido à teleterapia em mulheres com câncer de mama: revisão integrativa. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 20, n.3, p. 604-611, 2012.

ANDRADE, T. A. et. al. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 10, p. 1036-1047, Oct. 2011.

ANDRADE, T. A. M. **Atividade de biomembrana de látex natural da seringueira Hevea brasiliensis na neoformação tecidual de camundongos**. 2007. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

ANIDROL PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA. **Ficha de informação de segurança de produto químico - curcumina**. São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.anidrol.com.br/fispq/CURCUMINA%20A-0002.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. Tradução Terezinha Oppido et al. 6a ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

ARAÚJO, M. A. R. Hepatotoxicidade associada à nimesulida: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 3, p. 283-289, 2012.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. The role of green extraction techniques in green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 71, p. 2-8, Sep. 2015.

ASADULLAH, K. et al. Interleukin-10: an important immunoregulatory cytokine with major impact on psoriasis. **Current Drug Targets – Inflammation & Allergy**, 2004;3:185-192.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002a. 24 p.

AUGUSTYNIAK, A. et al. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 44, n. 10, p. 1216–1262, Oct. 2010.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Tradução George González Ortega et al. 2a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BAJINSKIS, A. et al. DNA double strand breaks induced by the indirect effect of radiation are more efficiently repaired by non-homologous end joining compared to homologous recombination repair. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 756, n.1-2, p. 21-29, Aug. 2013.

BALAJI, S.; CHEMPAKAM, B. Toxicity prediction of compounds from turmeric (*Curcuma longa* L). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 2951-2959, Oct. 2010.

BARNETT, G. C. et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. **Nature Reviews. Cancer**, London, v. 9, n. 2, p. 134-142, Feb. 2009.

BARROS, M. V. G.; SANTOS, S. G. **A atividade física como fator de qualidade de vida e saúde do trabalho**. Florianópolis: Núcleo de Pesquisa em Atividade Física e Saúde, EPS/UFSC - Ergonomia, 2001.

BECKER, M. P.; CLOGG, C. C. Analysis of sets of two-way contingency tables using association models. **Journal of American Statistics Association**, v. 84, p. 142-151, 1989.

BEIDLER, S. K. et al. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. **Journal of Vascular Surgery**, St. Louis, v. 49, n. 4, p. 1013-1020, Apr. 2009.

BHAVANI-SHANKAR, T. N.; SREENIVASA-MURTHY, V. Effect of turmeric (*Curcuma longa*) fractions on the growth of some intestinal and pathogenic bacteria in vitro. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.17, n. 12, p. 1363-1366, Dec.1979.

BHOGAL, N. et al. Late residual gamma-H2AX foci in murine skin are dose responsive and predict radiosensitivity in vivo. **Radiation Research**, New York, v. 173, n. 1, p. 1-9, Jan. 2010.

BLECHA, F. P.; GUEDES, M. T. S. Tratamento de radiodermatite no cliente oncológico: subsídios para intervenções de enfermagem. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 2, p. 151-163, 2006.

BOURS, V. et al. Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 60, n. 8, p. 1085-1089, Oct. 2000.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society - Series B - Methodological**, London, v. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.

BRICKS, L. F.; SILVA, C. A. A. Toxicidade dos anti-inflamatórios não hormonais. **Pediatria (São Paulo)**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 181-193, 2005.

BRITO, N M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p. 129-146, jan.-dez. 2003. doi: 10.5380/pes.v13i0.3173.

BUSANELLO, J. et al. Fisiologia e prática de enfermagem no cuidado de portadores de feridas. **Revista Ciência e Extensão**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 254-261, 2014. Disponível em: <http://ojs.unesp.br/index.php/revista_proex/article/view/961/1057>. Acesso em: 20 ago. 2017.

BUTCHER, K.; WILLIAMSON, K. Management of erythema and skin preservation; advice for patients receiving radical radiotherapy to the breast: a systematic literature review. **Journal of Radiotherapy in Practice**, Cambridge, v. 11, n. 1, p. 44-54, Mar. 2012.

CALDECOTT, K. W. Single-strand break repair and genetic disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 619-631, 2008.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CARVER, J. R. et al. (ASCO Cancer Survivorship Expert Panel). American society of clinical oncology clinical evidence review on the ongoing care of adult cancer survivors: cardiac and pulmonary late effects. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 25, n 25, p. 3991-4008, Sep. 2007.

CECÍLIO FILHO, A. B. et al. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 171-177, jan.-mar. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v30n1/a28v30n1.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2016.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route. a state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 141, n. 3, p. 277-299, Feb. 2010.

CHAN, M. M. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 49, n. 11, p. 1551-1556, May 1995.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 7, p. 8615-8627, 2012.

CHEN, C. et al. An in vitro study of liposomal curcumin: stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein-Barr virus-transformed human B-cells. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 366, n. 1-2, p. 133-139, Jan. 2009.

CHENG, A. L. et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Research**, Athens, v. 21, n. 4B, p. 2895-2900, Jul.-Aug.2001.

CHEUNG, K. L.; KHOR, T. O.; KONG, A. N. Synergistic effect of combination of phenethyl isothiocyanate and sulforaphane or curcumin and sulforaphane in the inhibition of inflammation. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 26, n.1, p. 224-231, Jan. 2009.

CHO, J. W.; LEE, K. S.; KIM, C. W. Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 19, n. 3, p. 469-474, Mar. 2007.

CODEVILLA, C. F. et al. Incorporation of curcumin into nanostructured systems: A review. **Ciência e Natura**, Santa Maria, Edição Especial - Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, v. 37, p. 152 – 163, Dec. 2015. Available from: <https://periodicos.ufsm.br/cienciaenatura/article/viewFile/19744/pdf>. Cited: DOI: <http://dx.doi.org/105902/2179460X>.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN). **Apostila educativa: radiações ionizantes e a vida**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.cnem.gov.br/images/cnen/documentos/educativo/radiacoes-ionizantes.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

COMMISSION RECOMMENDATION. **Definition of nanomaterial (2011/696/EU)**. THE EUROPEAN COMMISSION. Brussels, 2011.

CONTRI, R. V. et al. Transport of substances and nanoparticles across the skin and in vitro models to evaluate skin permeation and/or penetration. In: BECK, R.; GUTERRES, S.;

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n.1, p. 73-78, jan.-mar. 2005.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, Oct. 1999.

COX, J. D.; STETZ, J.; PAJAK, T. F. Toxicity criteria of radiation therapy oncology group (RTOG) and european organization for research and treatment of cancer (EORTC). **International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics**, Elmsdord, v. 31, n. 5, p. 1341-1346, Mar. 1995.

CUNHA et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 60, p. 1418-24, 2000.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 742-780, 1997.

DANDEKAR, P. et al. Toxicological evaluation of pH-sensitive nanoparticles of curcumin: acute, sub-acute and genotoxicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 8-9, p. 2073-2089, Aug.-Sep. 2010.

DANDEKAR, P. P. et al. Curcumin-loaded hydrogel nanoparticles: application in anti-malarial therapy and toxicological evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 99, n. 12, p. 4992-5010, Dec. 2010

DAS, L.; VINAYAK, M. Long-term effect of curcumin down-regulates expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 via modulation of E26 transformation-specific protein and nuclear factor- κ B transcription factors in livers of lymphoma bearing mice. **Leukemia and Lymphoma**, Chur, v. 55, n. 11, p. 2627-2636, Nov. 2014.

DAS, R. K.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, New York, v. 6, n. 1, p. 153-160, Feb. 2010.

DAVIE, J. R.; SPENCER, V. A. Control of histone modifications. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 75, p. 141–148, 1999. Supplement 32-33.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B. Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery: a comprehensive review. **Expert Opinion on Drug Delivery**, London, v. 6, n. 2, p. 165-176, Feb. 2009.

DOU, Y. et al. Curcumin attenuates collagen-induced inflammatory response through the “gut-brain axis”. **Journal of Neuroinflammation**, v.15, p. 6, Jan 2018.

DUNN, M. The role of arachidonic acid metabolites in renal homeostasis: non-steroidal anti-inflammatory drugs, renal function and biochemical, histological and clinical effects and drug interactions. **Drugs**, New York, v. 33, p. 56-66, 1987. Supplement 1.

EJAZ, P.; BHOJANI, K.; JOSHI, V.R. NSAIDs and kidney. **Journal of the Association of Physicians of India**, Bombay, v. 52, p. 632-640, Aug. 2004.

ESCHALIER, A. et al. Study of histamine release induced by acute administration of antitumor agents in dogs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v. 21, n. 3, p. 246-250, 1988.

FATHIMA, N. N. et al. Collagen-curcumin interaction — A physico-chemical study. **Journal of Chemical Sciences**, v. 121, Issue 4, p 509–514, July 2009.

FERREIRA, A. O. **Guia prático da farmácia magistral**: boas práticas de manipulação. Juiz de Fora: Pharmabooks, 2000. p. 159-197.

FIERS, W. et al. Lymphokines and monokines in anti-cancer therapy. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, Cold Spring Harbor, v. 51, p. 587-595, 1986.

FIRMINO, F. Potencial terapêutico da fenitoína na cicatrização de radiodermite. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 143-149, mar. 2007. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/ean/v11n1/v11n1a21.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 18, n. 6, p. 565-571, Dec. 2007.

FLORENCIO, L. A. **Engenharia de avaliações com base em modelos GAMLSS**. Dissertação [Mestrado]. Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Estatística, 2010

FORSBERG, J. A. et al. Correlation of procalcitonin and cytokine expression with dehiscence of wartime extremity wounds. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**, Boston, v. 90, n. 3, p. 580-588, Mar. 2008.

FORWARD, N. A. et al. Curcumin blocks interleukin (IL)-2 signaling in T-lymphocytes by inhibiting IL-2 synthesis, CD25 expression, and IL-2 receptor signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 407, n. 4, p.801-806, Apr. 2011.

FREITAS, L. A. P.; TEIXEIRA, C. C. C.; ZAMARIOLI, C. M. **Recent Developments in Phytomedicine Technology**. Nova York: Nova Science Publishers, 2017.

FREITAS, L. A. P.; TEIXEIRA, C. C. C.; ZAMARIOLI, C. M. Turmeric: therapeutic actions and toxicity. In: TAYLOR, G. (Ed.). **Turmeric: nutritional properties, uses and potential benefits**. Nova York: Nova Science Publishers, 2015.

FUJISAWA, S. et al. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds. **Anticancer Research**, Athens, v. 24, n. 2B, p.563-569, Mar.-Apr. 2004.

GALI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445–454, 2008. doi: 10.1038/nature07204.

GALLIN, J. I.; SNYDERMAN, R. (Ed.). **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. 3rd ed. Philadelphia/Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 1335 p.

GAO, S. et al. Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, New York, v. 85, p. 131-139, Aug. 2015.

GAO, X. et al. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 68, n.1, p. 51-61, Jul. 2004.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 787-809, Feb. 2008.

GOHEL, M. S. et al. The relationship between cytokine concentrations and wound healing in chronic venous ulceration. **Journal of Vascular Surgery**, St. Louis, v. 48, n. 5, p. 1272-1277, Nov. 2008.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29, p. 302-307, Mar. 2015.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **The pharmacological basis of therapeutics**. 8th ed. Elmsford, NY: Pergman Press, 1990.

GRIGOLLI, B. F. et al. Estudo clínico da Curcuma longa L para cicatrização de úlceras por pressão. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, Recife, n. 7, p. 5632-5637, set 2013. Número especial.

GUEDES, M. T. S.; NASCIMENTO, M. A. L. A recuperação de radiodermite com sulfadiazina de prata e cério: relato de experiência. In CONGRESSO BRASILEIRO DE ENFERMAGEM, 55., 2003, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: ABEn, 2003.

GUIPAUD, O. et al. Time-course analysis of mouse serum proteome changes following exposure of the skin to ionizing radiation. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, n. 21, p. 3992-4002, Nov. 2007.

GUPTA, B. et al. Mechanisms of curcumin induced gastric ulcer in rats. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 71, p. 806-814, May 1980.

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

HADDAD, C. M. K.; PELOSI, E. L. Aplicações clínicas. In: SALVAJOLI, J. V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S. L. (Ed.). **Radioterapia em oncologia**. 2a ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the Radiologist**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 546 p.

HARADA, A. et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, p. 559-564, 1994.

HARANAKA, K.; SATOMI, N.; SAKURAI, A. Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. **International Journal of Cancer**, New York, v. 34, n. 2, p. 263-267, Aug. 1984.

HARDY, R.. **Handbook of experimental immunology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1986.

HARRIS, I. R. et al. Cytokine and protease levels in healing and non-healing chronic venous leg ulcers. **Experimental Dermatology**, Copenhagen, v. 4, n. 6, p. 342-349, Dec. 1995.

HARVEY, K. F. et al. Caspase-mediated cleavage of the ubiquitin-protein ligase Nedd4 during apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 22, p. 13524-13530, May 1998.

HASTON, C. K. Mouse genetic approaches applied to the normal tissue radiation response. **Frontiers in Oncology**, v. 2, p. 1-7, Aug. 2012. Article 94.

HAUBNER, F. et al. Wound healing after radiation therapy: Review of the literature. **Radiation Oncology**, v. 7, p. 1-9, 2012.

HEGGIE, S. et al. A phase III study on the efficacy of topical aloe vera gel on irradiated breast tissue. **Cancer Nursing**, New York, v. 25, n. 6, p. 442-451, Dec. 2002.

HERSKIND, C.; BAMBERG, M.; RODEMANN, H. P. The role of cytokines in the development of normal-tissue reactions after radiotherapy. **Strahlenther und Onkologie**, v. 174, Suppl 3, p. 12–15, 1998.

HOET, P. H. M.; BRÜSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles - known and unknown health risks. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 2, n. 1, p. 212-227, Dec. 2004.

HOLLER, V. et al. Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 129, n. 5, p. 1280-1291, May 2009.

HOM, D. B.; MANIVEL, J. C. Promoting healing with recombinant human platelet-derived growth factor--BB in a previously irradiated problem wound. **The Laryngoscope**, St. Louis, v. 113, n. 9, p. 1566-1571, Sep 2003.

HUANG, H. W.; WU, Y. Lipid-alamethicin interactions influence alamethicin orientation. **Biophysical Journal**, New York, v. 60, n. 5, p. 1079-1087, Nov. 1991.

HUANG, M. T. et al. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. **Cancer Research**, Baltimore, v. 51, n. 3, p. 813-819, Feb. 1991.

ILYASOVA, D. et al. Individual responses to chemotherapy-induced oxidative stress. **Breast Cancer Research and Treatment**, Dordrecht, v. 125, n. 2, p. 583-589, Jan. 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2017. 128 p.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). **The radiological accident in Goiânia**. Vienna, 1988.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs - threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. **Annals of the ICRP**, Oxford, v.41, n.1-2, p.1-322, Feb. 2012.

IRVING, G. R. et al. Curcumin: the potential for efficacy in gastrointestinal diseases. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, London, v. 25, n. 4-5, p. 519-534, Aug. 2011.

IWAKAWA, M. et al. Different radiation susceptibility among five strains of mice detected by a skin reaction. **Journal of Radiation Research**, Tokyo, v. 44, n. 1, p. 7–13, Mar. 2003.

JAGETIA, G. C.; RAJANIKANT, G. K. Acceleration of wound repair by curcumin in the excision wound of mice exposed to different doses of fractionated γ radiation. **International Wound Journal**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 76-92, Feb. 2012.

JAIN, S. K. et al. Curcumin supplementation lowers TNF-alpha, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion in high glucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF-alpha, IL-6, MCP-1, glucose, and glycosylated hemoglobin in diabetic rats. **Antioxidants and Redox Signalling**, Larchmont, v. 11, n. 2, p. 241-249, Feb. 2009.

JANG, M. K.; SOHN, D. H.; RYU, J. H. A curcuminoid and sesquiterpenes as inhibitors of macrophage TNF-alpha release from *Curcuma zedoaria*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 67, n. 6, p. 550-552, Aug. 2001.

JANKO, M. et al. IL-1 Generated Subsequent to Radiation-Induced Tissue Injury Contributes to the Pathogenesis of Radiodermatitis. **Radiation Research**, v. 178, n. 3, p. 166-172, Sep. 2012.

JEGGO, P. A.; GEUTING, V.; LÖBRICH, M. The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. **Radiotherapy and Oncology**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 7-12, Oct. 2011.

JIN, C. Y. et al. Curcumin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shanghai, v. 28, n. 10, p. 1645-1651, Oct. 2007.

JOBIN, C. et al. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, n. 6, p. 3474-3483, Sep. 1999.

JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. **Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic**, Saindpoint, v.14, n. 2, p. 141-153, Jun. 2009.

KAKKAR, V, et al. Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 55, n. 3, p. 495-503, Mar. 2011.

KAMBAYASHI, T.; KORETZKY, G. A. Proximal signaling events in Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 3, p. 544-552, Mar. 2007.

KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. **Nature Review Drug Discovery**, v. 4, p. 489-499, 2005.

KATAOKA Y. et al. Relationship between phosphorylated histone H2AX formation and cell survival in human microvascular endothelial cells (HMEC) as a function of ionizing radiation exposure in the presence or absence of thiol-containing drugs. **Radiation Research**, New York, v. 168, n. 1, p. 106-114, Jul. 2007.

KELLOFF, G. J. et al. Clinical development plan: tea extracts, green tea polyphenols, epigallocatechin gallate. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 26, p. 236-257, 1996. Supplement.

KIANG, J. G. et al. Wound trauma increases radiation-induced mortality by activation of iNOS pathway and elevation of cytokine concentrations and bacterial infection. **Radiation Research**, New York, v. 173, n. 3, p. 319-332, Mar. 2010.

KIM, M. et al. Aceriphyllum Rossii Extract and Its Active Compounds, Quercetin and Kaempferol Inhibit IgE-Mediated Mast Cell Activation and Passive Cutaneous Anaphylaxis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3750-3758, 2014. <http://dx.doi.org/10.1021/jf405486c>.

KOCH, A. E. et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v. 258, Issue 5089, p. 1798-1801, Dec 1992:

KOUVARIS, J. R. et al. Dermatitis during for vulvar carcinoma: prevention and treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor impregnated gauze. **Wound Repair and Regeneration**, St. Louis, v. 9, n. 3, p. 187-193, May-Jun. 2001.

KOWALSKI, L. P. et al. **Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia**. 2a ed. São Paulo: Âmbito Editores, 2002. p. 92-98. (Radio-oncologia).

KOZAK, J. et al. Rapid repair of DNA double strand breaks in Arabidopsis thaliana is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 413-419, Mar. 2009.

KUO, L. J.; YANG, L. X. γ -H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. **In Vivo**, Athens, v. 22, n. 3, p. 305-309, May-Jun. 2008.

KUPRASH, D. V. et al. Redundancy in tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) signaling in vivo: mice with inactivation of the entire TNF/LT locus versus single-knockout mice. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 22, n. 24, p. 8626-8634, Dec. 2002.

KURAPATI, K. R. et al. Combinatorial cytotoxic effects of Curcuma longa and Zingiber officinale on the PC-3M prostate cancer cell line. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 23, Issue 4, 2012.

LEE, H. S. et al. Neuroprotective effect of curcumin is mainly mediated by blockade of microglial cell activation. **Pharmazie**, Berlin, v.62, n. 12, p. 937-942, Dec. 2007.

LIANG, G. et al. Synthesis and anti-inflammatory activities of mono-carbonyl analogues of curcumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 1525-1529, Feb. 2008.

LIANG, K. Y.; ZEGER, S. L. Longitudinal data analysis using generalized linear models. **Biometrika**, London, v. 73, n. 1, p. 13-22, Apr. 1986.

LIEPINSH, D. J. et al. Novel lymphotoxin alpha (LTalpha) knockout mice with unperturbed tumor necrosis factor expression: reassessing LTalpha biological functions. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 26, n. 11, p. 4214-4225, Jun. 2006.

LIN, C. C. et al. Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. **Food Chemistry**, Barking, v. 116, n. 4, p. 923-928, Oct. 2009.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126, 2000

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 214, n. 1-2, p. 9-12, Feb. 2001.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R.H.; MÄDER, K. Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: rheological characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 58, n. 3, p. 561-567, Nov. 2004.

LOPES, F. C. C. N. **Síntese de nanopartículas lipídicas sólidas para veiculação de curcumina**. 2016. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2016.

LU, Y. P. et al. Inhibitory effect of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced increase in ornithine decarboxylase mRNA in mouse epidermis. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 293-297, Feb. 1993.

LUENGO, J. et al. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. **Skin Pharmacology and Physiology**, Basel, v. 19, n. 4, p. 190-197, 2006.

LUNARDELLI, M. J. M.; BECKER, M. W.; BLATT, C. R.. Lesão hepática induzida por medicamentos: qual o papel do farmacêutico clínico? **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 31-35, out.-dez. 2016.

LUNDVIG, D. M. S. Cytoprotective responses in HaCaT keratinocytes exposed to High doses of curcumin. **Experimental Cell Research**, v. 336, n. 2, p. 298-307, Jun. 2015.

LUTOMSKI, J.; KEDZIA, B.; DEBSKA, W. Effect of an alcohol extract and of active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria and fungi. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 26, n. 1, p. 9-19, Aug. 1974.

MARTIN, A. **Physical Pharmacy**: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 153-476.

MATSUDA, H. et al. Anti-allergic principles from Thai zedoary: structural requirements of curcuminoids for inhibition of degranulation and effect on the release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, Issue 22, p. 5891-5898, nov. 2004.

MEDEIROS, A. C. S. **Circular técnica 125: preparo e uso de soluções salinas saturadas para a caracterização fisiológica de sementes florestais**. Colombo: EMBRAPA, dez. 2006. 6 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/41217/1/circ-tec125.pdf>>. Acesso em: 14 ago. 2016.

MELGAÇO, S. S. C. et al. Nefrotoxicidade dos anti-inflamatórios não esteroidais. **Medicina (Ribeirão Preto)**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 4, p. 382-390, 2010.

MICHAELS, M. L. et al. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 15, p. 7022-7025, Aug. 1992.

MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. Bioquímica do sangue. In: _____. **Laboratório para o clínico**. 8a ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 55-65.

MINER, P. E. Emulsions rheology: creams and lotions. In: LABA, D. (Ed.). **Rheological properties of cosmetic and toiletries**. New York: Marcel Dekker, 1993, p. 313-370.

MOON, D. O. et al. Curcumin attenuates inflammatory response in IL-1 β -induced human synovial fibroblasts and collagen-induced arthritis in mouse model. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 605–610, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, Jan. 2010.

MOSCA, R. C. **Modelo de radionecrose cutânea induzida em camundongos nude (Nu/Nu) para desenvolvimento de terapias regenerativas baseadas em substitutos dermo-epidérmicos humanos**. 2014, 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MUKAIDA, N.; MAHE, Y.; MATSUSHIMA, K. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding proteinlike factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by proinflammatory cytokines. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 265, p. 21128–21133, 1990.

NAAL, R. M. Z. G. et al. In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. **Biosensors Bioelectronics**, v. 20, p. 791–795, 2004.

NAYAK, A. P. et al. Curcuminoid-loaded lipid nanoparticles: novel approach towards malaria treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 263-273, Nov. 2010.

NEIDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models **Journal of the Royal Statistical Society**, Series A, v.135, p.370–384, 1972.

NISHIDA, M. et al. Monoacetylcurcumin strongly regulates inflammatory responses through inhibition of NF-kappaB activation. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 25, n.5, p. 761-767, May 2010.

NOBLE-ADAMS, R. Radiation-induced skin reactions. 3: Evaluating the RISRAS. **British Journal of Nursing**, London, v. 8, n. 19, p. 1305-1312, Oct.-Nov. 1999.

OEHLERT, G. W. *A note on the delta method*. **The American Statistician**, Alexandria, v. 46, n. 1, p. 27-29, Feb. 1992.

OGIWARA H, et al. Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 34, n.11, p. 2486-2497, Nov. 2013.

OKAYASU, R. et al. A deficiency in DNA repair and DNA-PKcs expression in the radiosensitive BALB/c mouse. **Cancer Research**, Baltimore, v. 60, n. 16, p. 4342-4345, Aug. 2000.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 27, n. 77, p. 185-199, 2013.

OKUNO, E. **Radiação: efeitos, riscos e benefícios**. São Paulo: Harbra, 1988. 81 p.

OKUNO, E.; CALDAS, I. L.; CHOW, C. **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1982. 490 p.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. M. **Física das radiações**. São Paulo: Oficina de Textos, 2010. 296 p.

OLD, L. J. Tumor necrosis factor (TNF). **Science**, Washington, v. 230, n. 4726, p. 630-632, Nov. 1985.

OLIVEIRA et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.6, n. 1, p. 255-265, 2011.

ORIQUEI, L. R.; MORI, M.; WONGTSCHOWSKI, P. Guia para a determinação da estabilidade de produtos químicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 340-347, 2013. doi: 10.1590/S0100-40422013000200023.

OTONI, E. S. B.; NARDIN, J. M. Avaliação da citotoxicidade de curcuminóides em células linfocitárias normais. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba, v. 1, n. 11, p. 34-45, 2014.

PARIMITA, S. P. et al. Redetermination of curcumin: (1E,4Z,6E)-5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3- methoxyphenyl)hepta-1,4,6-trien-3-one. **Acta Crystallographica Section E**, v. 63, p. 0860- 0862, 2007.

PARIZE, A. L. et al. Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 1127-1132, 2012.

PAULA, G. A. **Modelos de regressão: com apoio computacional**. São Paulo: Instituto de Matemática e Estatística (IME), Universidade de São Paulo (USP), 2010.

PAULUCCI, V. P. et al. Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. **Revista Brasileira de Farmacognosia / Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v.23, n. 1, p. 94-100, Jan.-Feb. 2013.

PELLIZZON, A. C. A. et al. **Rotinas e condutas em radioterapia**. 3a ed. São Paulo: Lemar, 2007. 455 p.

PHARMASPECIAL. Especialidades Químicas e Farmacêuticas Ltda. [homepage]. São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.pharmaspecial.com.br>>. Acesso em: ago. 2016.

PHILP, R. B. **Herbal-drug interactions and adverse effects: an evidence-based quick reference guide**. Canadá: McGraw-Hill Professional, 2004.

PIEPHO, R. et al. Drug-induced nephrotoxicity. **Journal of Clinical Pharmacology**, Stamford, v. 31, n. 9, p. 785-791, Sep. 1991.

PINAR, B. et al. Radiation-induced DNA damage as a predictor of long-term toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with high-dose hyperfractionated radical radiotherapy. **Radiation Research**, New York, v. 168, n. 4, p. 415-422, Oct. 2007.

PINHEIRO, A. C.; COIMBRA, M. A.; VICENTE, A. A. In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers e Effect of interfacial composition. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 460-467, 2016.

PIRES, A. M. T.; SEGRETO, R. A.; SEGRETO, H. R. C. Avaliação das reações agudas da pele e seus fatores de risco em pacientes com câncer de mama submetidas à radioterapia. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 5, p. 844-849, set.-out. 2008. doi: 10.1590/S0104-11692008000500008.

POHLMANN, A. (Ed.). **Nanocosmetics and nanomedicines: new approaches for skin care**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. Chapter 1, p. 3-36.

POMMIER, P. et al. Phase III randomized trial of Calendula officinalis compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 22, n. 8, p. 1447-1453, Apr. 2004.

POROCK, D. et al. Predicting the severity of radiation skin reactions in women with breast cancer. **Oncology Nursing Forum**, New York, v. 25, n. 6, p. 1019-1029, Jul. 1998.

POROCK, D. Factors influencing the severity of radiation skin and oral mucosal reactions: development of a conceptual framework. **European Journal of Cancer Care**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 33-43, Mar. 2002.

POSTLETHWAITE, A. E.; KANG, A. H. Fibroblasts and Matrix Proteins. In: **Basic Principles and Clinical Correlates**. GALLIN, J. I.; SNYDERMAN, R. 3rd Ed. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

POTT, G. B. et al. Effect of a four-week course of interleukin-10 on cytokine production in a placebo-controlled study of HIV-1-infected subjects. **European Cytokine Network**, v. 18, p. 49-58, 2007

PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, p. 81-95, 2009.

PUGLIA, C. et al. Curcumin loaded NLC induces histone hypoacetylation in the CNS after intraperitoneal administration in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 81, n 2, p. 288-293, Jun. 2012.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: The R Foundation for Statistical Computing, 2017. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

RAEBURN, C. D. et al. Cytokines for surgeons. **The American Journal of Surgery**, v. 183, p. 268–273, 2002.

REZVANI, M. et al. Normal tissue reactions in the British Institute of Radiology Study of 3 fractions per week versus 5 fractions per week in the treatment of carcinoma of the laryngo-pharynx by radiotherapy. **The British Journal of Radiology**, v. 64, n. 768, p. 1122-33, Dec 1991.

ROCHA, L. et al. Mikania glomerata Spreng: desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, p. 744-747, dez. 2008. Suplemento. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18s0/a19v18s0.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2016. doi: 10.1590/S0102-695X2008000500019.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROTHKAMM K. et al. Laboratory intercomparison on the gamma-H2AX foci assay. **Radiation Research**, New York, v. 180, n. 2, p. 149-155, Aug. 2013.

ROY, B. et al. Depletion of deoxyribonucleoside triphosphate pools in tumor cells by nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 36, n. 4, p. 507-516, Feb. 2004.

RÜBE, C. E. et al. DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 14, n. 20, p. 6546-6555, Oct. 2008.

RUSIG, O.; MARTINS, M. C. Efeito da temperatura, do pH e da luz sobre extratos de oleoresina de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e curcumina. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, Viçosa, v. 1, n. 1, p. 158-164, jan. 1992.

RYAN, J, L. et al. Decreasing the adverse effects of cancer therapy: an NCI workshop on the preclinical development of radiation injury mitigators/protectors. **Radiation Research**, New York, v. 176, n. 5, p. 688-691. Nov. 2011

SAAD, E. D. et al. Common Toxicity Criteria of the National Cancer Institute. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 1, p.63-69, jan.-mar.2002.

SAJITHLAL, G. B.; CHITHRA, P.; CHANDRAKASAN, G. Effect of curcumin on the advanced glycation and cross-linking of collagen in diabetic rats. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 56, Issue 12, p. 1607-1614, Dec 1998.

SALVAJOLI, J. V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S. L. (Ed.). **Radioterapia em oncologia**. 2a ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

SALVAJOLI, J. V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S. L. Princípios de enfermagem em radioterapia. In: _____. **Radioterapia em oncologia**. 1a ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. Cap. 12.

SALVO, N. et al. Prophylaxis and management of acute radiation-induced skin reactions: A systematic review of the literature. **Current Oncology**, Toronto, v.17, n. 4, p. 94-112, Aug. 2010.

SANTOS M. S. et al. In situ screening of 3-arylcoumarin derivatives reveals new inhibitors of mast cell degranulation. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 6, p. 731-738, Jun. 2013.

SARTORELLI, P. et al. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 133-152, Jan. 2000.

SATO, A. et al. Proteome and transcriptome analysis of 5-fluoro-2-deoxyuridine-induced cell death mechanisms. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, n. 50, p. 101-102, 2006.

SCELZA, M. Z. et al. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 12-18, Jan. 2012.

SCHMUTH, M. et al. Topical corticosteroid therapy for acute radiation dermatitis: a prospective, randomized, double-blind study. **The British Journal of Dermatology**, London, v.146, n. 6, p. 983-991, Jun. 2002.

SEGRETO, H. R. C. Radiobiologia. In: SALVAJOLI, J. V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S. L. (Ed.). **Radioterapia em oncologia**. 2a ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

SERNA, H.; PORRAS, M.; VERGARA, P. Mast cell stabilizer ketotifen [4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4h-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9H)-one fumarate] prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental *Trichinella spiralis* inflammation in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 319, n. 3, p. 1104-1111, Dec 2006.

SERRA, M. L. G. et al. Efecto de los componentes de la formulación en las propiedades de las nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, México, v. 40, n. 2, p. 26-40, abr.-jun. 2009.

SEUANES, G. C. et al. Novel binuclear μ -oxo diruthenium complexes combined with ibuprofen and ketoprofen: Interaction with relevant target biomolecules and anti-allergic potential. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 153, p. 178-185, 2015.

SHAH, J. M. et al. Cellular events and biomarkers of wound healing. **Indian Journal of Plastic Surgery**, Mumbai, v. 45, n. 2, p. 220-228, May 2012.

SHAHANI, K.; PANYAM, J. Highly loaded, sustained-release microparticles of curcumin for chemoprevention. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 100, n. 7, p. 2599-2609, Jul. 2011.

SHARON, A. CENTER DMC. Avaliação bioquímica da função hepática no cão e no gato. In: _____. **Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais**, 1995. p.1166-1183.

SHELLEY, W. B.; TALANIN, N.; SHELLEY, E. D. Polysorbate 80 hypersensitivity. **Lancet**, London, v. 345, n. 8960, p. 1312-1313, May 1995.

SHOBA, G. et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 64, n. 4, p. 353-356, May 1998.

SINGH, V. K. et al. Animal models for acute radiation syndrome drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, London, v. 10, n. 5, p. 497-517, May 2015. doi: 10.1517/17460441.2015.1023290.

SOOBRAATTEE, M. A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation research. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 579, n. 1-2, p. 200-213, Nov. 2005.

SOUTO, Eliana B et al. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 10, p. 1762-1769, 2011. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011001000009&lng=en&nrm=iso>. access on 08 May 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011001000009>.

SPINELLI, M. O. et al. Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 8, n. 2, p. 1-8, fev. 2012.

STASINOPOULOS D.; RIGBY, R. Generalized Additive Models for Location Scale and Shape (GAMLSS). **Journal of Statistical Software**, v. 23, n.7, p. 1-46, 2007.

STASINOPOULOS, D. M.; RIGBY, R. A. Generalized additive models for location scale and shape (GAMLSS). **Journal of Statistical Software**, v. 23, Issue 7, p. 1-46, Dec 2007.

STASINOPOULOS, D. M.; RIGBY, R. A.; AKANTZILIOTOU, C. **Technical Report 01/06**. STORM Research Centre, London Metropolitan University, London, 2008. URL <http://www.gamlss.com/>.

STORER; J. B. Acute responses to ionizing radiation. In: GREEN, E. L. (Ed.). **Biology of the laboratory mouse**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1966. Chapter 22. Disponível em: <<http://www.informatics.jax.org/greenbook/chapters/chapter22.shtml>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

STRASSER, E. M. et al. The relationship between the anti-inflammatory effects of curcumin and cellular glutathione content in myelomonocytic cells. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 70, n. 4, p. 552-559, Aug. 2005.

STRIMPAKOS, A. S.; SHARMA, R. A. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. **Antioxidants and Redox Signalling**, Larchmont, v. 10; n. 3, p. 511-545, Mar. 2008. doi: 10.1089/ars.2007.1769.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 538-552, May 2015. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422015000400538&lng=en&nrm=iso>. access on 09 May 2018. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150035>

SUHAIL, N. et al. Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast-cancer patients undergoing chemotherapy. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 22-26, Feb. 2012.

SUN, J. et al. Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles have prolonged in vitro antitumour activity, cellular uptake and improved in vivo bioavailability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 111, p. 367-375, Nov. 2013.

SUN, Q.; RADOSZ, M.; SHEN, Y. Challenges in design of translational nanocarriers. **Journal of Controlled Release**, v. 164, p. 156-169, 2012.

SUN, X. Z. et al. Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 147-153, 2013.

SUNDY, J. S.; PATEL, D. D.; HAYNES, B. F. Cytokines in normal and pathogenic inflammatory responses. In: GALLIN, J. I.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. 3rd Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

SURH, Y. J. et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 480-481, p. 243-268, Sep. 2001.

SUZUKI, K. et al. UV-induced imbalance of the deoxyribonucleoside triphosphate pool in E. coli. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 122, n. 3-4, p. 293-298, Dec. 1983.

TAGLIARI, M. P. et al. Estabilidade térmica e compatibilidade da hidroquinona. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 20, n. 2, mar.-abr. 2008.

TAJIRI, K.; SHIMIZU, Y. Practical guidelines for diagnosis and early management of drug-induced liver injury. **World Journal Gastroenterology**, Beijing, v. 14, n. 44, p. 6774-6785, Nov. 2008.

TAVEIRA, S. F. **Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele**. 2009. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

THANGAPAZHAM, R. L.; SHARMA, A.; MAHESHWARI, R. K. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, Arlington, v. 8, n. 3, p. E443-449, Jul. 2006.

THANIK, V. D. et al. A novel mouse model of cutaneous radiation injury. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 127, n. 2, p. 560-568, Feb. 2011.

THIER, H. P.; ZEUMER, H. (Ed.). **Manual of pesticide residue analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987, p. 37-41.

THOMPSON, J. E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TIBBS, M. K. Wound healing following radiation therapy: a review. **Radiotherapy and Oncology**, Amsterdam, v. 42; n. 2, p. 99-106, Feb. 1997.

TOLEDO, E. M. **Estudo das propriedades estruturais da curcumina no vácuo usando dinâmica molecular de car-parrinello**. Dissertação [Mestrado]. Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2013.

TONNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids: VI - kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, Berlin, v. 180, n. 5, p. 402-404, May 1985.

TOULOUMIS, A. R Package multgee: a generalized estimating equations solver for multinomial responses. **Journal of Statistical Software**, v. 64, n. 8, p. 1-14, Mar. 2015.

TOULOUMIS, A.; AGRESTI, A.; KATERI, M. GEE for multinomial responses using a local odds ratios parameterization. **Biometrics**, v. 69, n. 3, p. 633-640, 2013.

TRENGOVE, N. J.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; STACEY, M. C. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, St. Louis, v. 8, n. 1, p. 13-25, Jan.-Fev. 2000.

TUCKER, S. L. et al. How much could the radiotherapy dose be altered for individual patients based on a predictive assay of normal-tissue radiosensitivity? **Radiotherapy and Oncology**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 103-113, Feb. 1996.

TURESSON, I. et al. A. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. **International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics**, Elmsford, v.36, n.5, p.1065-1075, Dec. 1996.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte I (ABNT) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. --3.ed. rev. ampl. mod. - - São Paulo: SIBiUSP, 2016. 100p. : il. -- (Cadernos de estudos; 9)

VANACLOCHA, B. V. **Fitoterapia: vademecum de prescripción - plantas medicinales**. Barcelona: Masson, 1999. 1148 p.

VELOSO, L. A. **Dossiê técnico: corantes e pigmentos**. Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), 2012. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTcwOA==>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

WAGNER, H.; WIESENAUER, M. **Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas**. 2a ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

WALLACH, D. Cytotoxins (tumour necrosis factor, lymphotoxin and others): molecular and functional characteristics and interactions with interferons. **Interferon**, London, v. 7, p. 89-124, 1986.

WAMBIER, C. G. et al. Factors associated with seropositivity for APGL-Iamong household contacts of leprosy patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 49, n. 1, p. 83-89, Jan.-Fev. 2016. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v49n1/1678-9849-rsbmt-49-01-00083.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2016.

WANG, A. M. et al. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. **Science**, Washington, v. 228, n. 4696, p. 149-154, Apr. 1985.

WANG, Y.J. et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 1867-1876, 1997.

WELLS, M.; MACBRIDE, S. Radiation skin reactions. In: FAITHFULL, S.; WELLS, M. (Ed.). **Supportive care in radiotherapy**. London: Elsevier, 1999. p. 135-159.

WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 7, p. 478-94, Jul.2014. doi: 10.1038/nri3690. Epub 2014 Jun 6.

WOO, H. M. et al. Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes. **Life Sciences**, Oxford, v. 80, n.10, p. 926-931, Feb. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Monographs on selected medicinal plants**. Geneva, Switzerland, 1999. 295 p. v. 1.

WRIGHT, T. I.; SPENCER, J. M.; FLOWERS, F. P. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 54, n. 6, p. 933-946, Jun. 2006.

YADAV, A. et al. Curcumin encapsulated in chitosan nanoparticles: a novel strategy for the treatment of arsenic toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 199, n. 1, p. 49-61, Jul. 2012.

YAO, M., MCCLEMENTS, D. J., XIAO, H. Improving oral bioavailability of nutraceuticals by engineered nanoparticle-based delivery systems. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 14-19, 2015.

YONN, A. et al. TGF- β 1 Expression by Proliferated Keratinocytes in the Skin of E-Irradiated Mice. **Journal of Life Science**, v. 22, n. 2, p. 133-141, 2012.

YOSHIDA, K. et al. Objective assessment of dermatitis following post-operative radiotherapy in patients with breast cancer treated with breast-conserving treatment. **Strahlentherapie und Onkologie**, München, v. 186, n. 11, p. 621-629, Nov. 2010.

ZAMARIOLI, C. M. **Formulação tópica para prevenção e tratamento de radiodermites: desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo curcuminoides e estudo in vitro**. 2014, 139 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

ZAMARIOLI, C. M. et al. Nanoparticles containing curcuminoids (Curcuma longa): development of topical delivery formulation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 53-60, Feb. 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v25n1/0102-695X-rbfar-25-01-0053.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

ZHANG, L. et al. Eudragit® S100 coated calcium pectinate microspheres of curcumin for colon targeting. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 28, n. 7, p. 659-667, 2011.

ZHANG, L. et al. Physical characterization and cellular uptake of propylene glycol liposomes in vitro. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 38, n. 3, p. 365-371, Mar. 2012.

ZHANG, L. J. et al. Comparison of inhibitory potency of three different curcuminoid pigments on nitric oxide and tumor necrosis factor production of rat primary microglia induced by lipopolysaccharide. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 447, n. 1, p. 48-53, Dec. 2008.

ZHAO, C. et al. Synthesis of mono-carbonyl analogues of curcumin and their effects on inhibition of cytokine release in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v 18, n.7, p. 2388-2393, Apr. 2010.

APÊNDICE A – Análise de Estabilidade

Produto: Gel de Natrosol com NLS-CT

Data de manipulação:

Embalagem:

Mês	Data 25°C ± 2°C 75% ± 5% UR	Características Organolépticas			Características Físico-químicas		
		Aspecto	Cor	Odor	pH	Concentração	Viscosidade
0							
3							
6							

Observação: _____

Nome e assinatura: _____

APÊNDICE B - Toxicidade da Formulação

Camundongo: _____ Dose: _____ Data de início: _____ Data do sacrifício: _____

Tabela 1 - Tabela de sinal de dor

Sinais	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21
Diminuição no consumo de água e alimento																						
Respiração com a boca aberta																						
Respiração abdominal																						
Aumento/diminuição de movimentos																						
Aparência da pelagem (erizada, emaranhada, opaca)																						
Postura anormal																						
Rigidez muscular/falta de tônus muscular																						
Desidratação/olhos fundos																						
Espasmos/tremores																						
Vocalização (raro)																						
Vermelhidão ou inchaço ao redor da lesão																						

Fonte: Adaptado do *National Institute of Health*

Tabela 2 – Peso do camundongo em gramas.

D0	D7	D14	D21

Obs.: Fotografia da área pele no D0, D2, D7, D14 E D21; coleta de sangue para dosar função renal e hepática; biópsias da pele e de órgãos-alvo (fígado, rins, coração, pulmão) no D21.

APÊNDICE C – Indução de Radiodermite

Camundongo: _____ Dose de radiação: _____ Data de início: _____ Data do sacrifício: _____

Tabela 1 - Tabela de sinal de dor

Sinais	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21
Diminuição no consumo de água e alimento																						
Respiração com a boca aberta																						
Respiração abdominal																						
Aumento/diminuição de movimentos																						
Aparência da pelagem (erizada, emaranhada, opaca)																						
Postura anormal																						
Rigidez muscular/falta de tônus muscular																						
Desidratação/olhos fundos																						
Espasmos/tremores																						
Vocalização (raro)																						
Vermelhidão ou inchaço ao redor da lesão																						

Fonte: Adaptado do *National Institute of Health*

Tabela 2 – Graduação da Radiodermite

Grau de radiodermite	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21
Grau 0 - sem reação																						
Grau 1 - eritema leve, descamação seca, epilação, sudorese diminuída																						
Grau 2 - eritema moderado, brilhante, dermatite exsudativa em placas e edema moderado																						
Grau 3 - dermatite exsudativa além das pregas cutâneas, edema intenso																						
Grau 4 - ulceração, hemorragia, necrose																						

Fonte: *Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) - Acute Radiation Morbidity Scoring Criteria*

Tabela 3 – Peso do camundongo em gramas.

D0	D2	D7	D14	D21

Obs.: Fotografia da área irradiada no D0, D2, D7, D14 E D21; coleta de sangue para armazenamento do soro; biópsia da pele da área irradiada (dia do sacrifício).

APÊNDICE D – Dose-Resposta

Camundongo: _____ Grupo: _____ Data de início: _____ Data do sacrifício: _____

Tabela 1 - Tabela de sinal de dor

Sinais	DIAS																												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Diminuição no consumo de água e alimento																													
Respiração com a boca aberta																													
Respiração abdominal																													
Aumento/diminuição de movimentos																													
Aparência da pelagem (erizada, emaranhada, opaca)																													
Postura anormal																													
Rigidez muscular/falta de tônus muscular																													
Desidratação/olhos fundos																													
Espasmos/tremores																													
Vocalização (raro)																													
Vermelhidão ou inchaço ao redor da lesão																													

Fonte: Adaptado do *National Institute of Health*

Tabela 2 – Graduação da Radiodermite

Grau de radiodermite	DIAS																												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Grau 0 - sem reação																													
Grau 1 - eritema leve, descamação seca, epilação, sudorese diminuída																													
Grau 2 - eritema moderado, brilhante, dermatite exsudativa em placas e edema moderado																													
Grau 3 - dermatite exsudativa além das pregas cutâneas, edema intenso																													
Grau 4 - ulceração, hemorragia, necrose																													

Fonte: Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) - Acute Radiation Morbidity Scoring Criteria

Tabela 3 – Peso do camundongo em gramas.

D0	D7	D14	D21	D28

Obs.: Fotografia da área irradiada no D0, D7, D14, D21 E D28. Coleta pele da área irradiada (dia do sacrifício) para histologia, e avaliação de citocinas.

ANEXO A – Aleatorização

The screenshot shows a web browser window with several tabs open: "USP Mail: Divulgação Edita...", "Facebook", "(169 não lidos) - cristina_z...", and "RANDOM.ORG - Sequence...". The address bar shows the URL "https://www.random.org/sequences/?min=1&max=12&col=1&format=html&rnd=new" and a search bar with the text "Pesquisar".

The website header includes a navigation menu with links: Home, Games, Numbers, Lists & More, Drawings, Web Tools, Statistics, Testimonials, Learn More, and Login. The main heading is "RANDOM.ORG" in large, bold, black letters, followed by the tagline "True Random Number Service". A search bar with the text "Search RANDOM.ORG" and a "Search" button is also present.

A green banner below the header reads: "Do you own an iOS or Android device? Check out our app!".

The main content area is titled "Random Sequence Generator". Below this, it says "Here is your sequence:" followed by a vertical list of numbers: 2, 6, 1, 4, 10, 12, 7, 3, 9, 5, 11, 8.

Below the sequence, it says "Timestamp: 2016-04-15 17:53:56 UTC".

At the bottom of the main content area, there are two buttons: "Again!" and "Go Back".

The footer section includes social media links: "Follow @RandomOrg" (3,569 followers), "Like" (440K), and "Share" (>10mil). It also includes copyright information: "© 1998-2016 RANDOM.ORG" and links to "Terms and Conditions" and "About Us".

The Windows taskbar at the bottom shows the Start button, Internet Explorer, Firefox, and several other icons. The system tray on the right shows the time "14:54" and the date "15/04/2016".

ANEXO B – Aprovação da CEUA

Centro Colaborador do CIQA/USP para o
Desenvolvimento de Pesquisas em Enfermagem

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - CEP: 14040-902
Fone: 55 16 3315.3352 - 55 16 3315.3351 - Fax: 55 16 3315.3318
www.eerp.usp.br - eerp@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudos pré-clínicos com dispersões e formulações tópicas contendo nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando curcuminóides (NLS-CUR)", protocolo nº 15.1.430.22.2, sob a responsabilidade de Cristina Mara Zamarioli e Emilia Campos de Carvalho que envolve a manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA EERP) na Reunião Ordinária da CEUA de 31/07/2015.

Vigência do Projeto	12/08/2015 a 12/08/2016
Espécie/Linhagem	Camundongo isogênico BALB
Nº de animais	76
Peso	7 a 8 semanas – 20-25g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central PUSP-RP

Ribeirão Preto, 11 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli
Presidente da CEUA EERP-RP

Avenida Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo
Fone: (16) 3315 3355