UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de nanopartículas de fase líquido-cristalina funcionalizadas com peptídeos de penetração celular para carreamento do ácido lipóico na pele

Patrícia Mazureki Campos

Ribeirão Preto
2016

RESUMO

CAMPOS, P. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de fase líquido-cristalina funcionalizadas com peptídeos de penetração celular para carreamento do ácido lipóico na pele.** 2016. 191f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A modulação da penetração de fármacos na/através da pele representa um desafio para sobrepor o efeito barreira proporcionado pela camada mais externa da pele, o estrato córneo. Sistemas de liberação nanoestruturados e funcionalizados representam uma importante estratégia para promover a penetração de fármacos nas camadas mais profundas da pele. O ácido lipóico (AL) é uma molécula com atividade antioxidante e constitui terapia antioxidante tópica para tratamento de estresse oxidativo e inflamação recorrente em patologias cutâneas. A encapsulação de AL em nanodispersões líquido-cristalinas (NDLCs) funcionalizadas com os peptídeos de penetração celular (PPCs), a saber, os peptídeos D4 e TAT, visa promover a liberação de AL em camadas específicas da pele através de uma estratégia inovadora associando tanto as vantagens de um sistema nanoparticulado como a superfície modificada para melhorar a interação com células e tecido-alvos. Nesse trabalho, foram desenvolvidos e validados métodos de cromatografia líquida de alta eficiência com detectores ultravioleta, eletroquímico e espalhamento de luz evaporativo específicos para quantificação do AL em várias faixas de linearidade para as diferentes etapas experimentais. As NDLCs foram preparadas com mono-oleato de glicerila, ácido oleico, lipopolímeros, peptídeos TAT e D4 em diversas proporções e associações. NDLCs foram caracterizadas por diferentes métodos. A microscopia de luz polarizada e difração de raios X de baixo ângulo identificaram o sistema líquido-cristalino como fase hexagonal reversa. As técnicas de espalhamento dinâmico de luz e análise de rastreamento mostraram nanopartículas na ordem de 200 nm, estreito índice de polidispersividade, portencial zeta negativo e número de partículas por mL na faixa de 10^{12}. A eficiência de encapsulação foi em torno de 79% e a capacidade de carga (*drug loading*) de AL nas NDLCs atinigiu 15%. A avaliação de comportamento e ação *in vitro* das NDLCs foi estudada em queratinócitos e fibroblastos, evidenciando que o tratamento com as NDLCs não diminuiu a viabilidade celular nas células estudadas. A internalização celular das NDLCs comprovada por microscopia confocal a laser e citometria de fluxo foi aumentada com a funcionalização com peptídeo D4 de maneira dependente da concentração e do tempo de incubação e com peptídeo TAT por mecanismo inespecífico. Em estudos de permeação *in vitro* foi demonstrada a penetração cutânea aumentada de AL a partir das NDLCs. Ensaio *in vivo* com camundongos *hairless* expostos à radiação UVB evidenciou a eficácia das NDLCs contendo AL pela atividade de mieloperoxidase ter sido diminuída, além de menor liberação da citocina inflamatória TNF-α, mostrando que as NDLCs desenvolvidas podem ser uma opção de tratamento tópico contra processos de estresse oxidativo e inflamação presentes no envelhecimento cutâneo e outras desordens cutâneas.

Palavras-chave: pele, ácido lipóico, nanodispersões líquido-cristalinas, funcionalização, peptídeos de penetração celular, estresse oxidativo, aplicação tópica.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pele e vias de penetração cutânea

A pele humana é considerada o maior órgão do corpo, recobrindo-o, e contempla 16% do peso corporal. É formada por uma estrutura altamente organizada e especializada para desempenhar as suas funções de proteção contra: perda de água e danos físicos como fricção e choques, bem como aqueles advindos do ambiente como absorção de substâncias químicas, patógenos e radiação ultravioleta (UV). A pele desempenha papel importante nas funções sensoriais, participa das respostas imunes e controle da temperatura corporal, realiza síntese da vitamina D, cicatrização de feridas e regeneração tecidual (N'DA, 2014; WICKETT; VISSCHER, 2006; WOLK; WITTE; SABAT, 2010).

A pele é histologicamente dividida em três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). A epiderme é formada por epitélio estratificado, composta por queratinócitos, que são formados pela divisão das células na camada basal, originando várias camadas distintas, que à medida que migram para a superfície, progressivamente se diferenciam, sofrendo mudanças morfológicas e metabólicas. Os queratinócitos da epiderme são organizados em camadas, as quais são nomeadas em função da posição ou propriedade estrutural, como a camada basal que é composta por células proliferativas sobre a junção dermoepidérmica; camada espinhosa com células que apresentam grande quantidade de filamentos de queratina organizados ao redor do núcleo e inseridos na periferia celular associados aos desmossomos; camada granulosa, local de geração de componentes estruturais (grânulos de querato-hialina) que posteriormente vão formar a barreira epidérmica e, por fim, camada córnea formada por células anucleadas achatadas em estágio avançado de degeneração que se dispõem em lamelas num sistema bicompartimental de corneócitos ricos em proteínas rodeados por uma matriz lipídica contínua, essa camada é a responsável pela função barreira e proteção (CHU, 2008; VAN SMEDEN, 2014).

Dentro da epiderme há várias populações de células, como os melanócitos, que se localizam na camada basal da epiderme, sintetizam o pigmento melanina e transferem para os queratinócitos vizinhos, o que dá cor para a pele e protege contra a radiação ultravioleta; células de Langerhans e dendríticas apresentadoras de antígeno, as quais possuem funções imunológicas, e células de Merkel responsáveis pela sensação tátil (GARTNER; HIATT, 2001; MCGRATH; EADY; POPE, 2004).

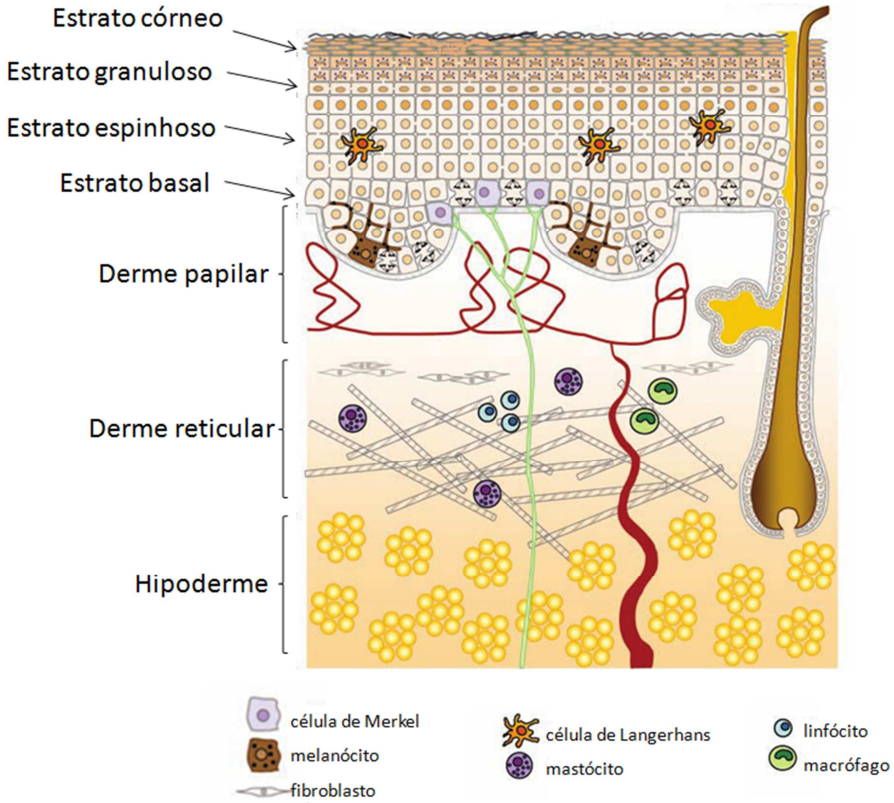

Figura 1: Esquema da Pele (adaptado de WOLK; WITTE; SABAT, 2010).

Logo abaixo da epiderme está a junção dermoepidérmica, que faz interface epiderme/ derme, mantendo-as unidas e proporcionando resistência contra forças de cisalhamento (CHU, 2008).

A derme é formada por tecido conjuntivo com substância fundamental amorfa, constituída de fibras colágenas, elásticas e reticulares, células como os fibroblastos e leucócitos, vasos sanguíneos e linfáticos e fibras nervosas de axônios. Nesse local também estão localizados os folículos pilosos, as glândulas sudoríparas e sebáceas. A derme se divide em papilar, que nutre a epiderme por difusão e, em reticular, com vasos sanguíneos de maior calibre e fibras de colágeno e elastina mais espessas, importantes para a flexibilidade e distensão da pele. Abaixo da derme, está a hipoderme, composta de células adiposas circundadas por tecido conjuntivo frouxo, a qual é responsável pelo amortecimento de choques físicos e reserva energética (GARTNER; HIATT, 2001; WOLK; WITTE; SABAT, 2010).

A aplicação de substâncias ativas na pele ou através dela, abrem diversas possibilidades de uso para produtos farmacêuticos e cosméticos. Além disso, por receber um terço da circulação sanguínea, a pele representa uma rota ideal para tratamento (BLUME-PEYTAVI et al, 2010; N'DA, 2014). Todavia, a pele exerce

função barreira através do estrato córneo, que é a camada mais externa da pele, a qual influencia a taxa de absorção/penetração de substâncias, juntamente com outros fatores como área de contato (local e extensão), duração da exposição, integridade do estrato córneo e espessura da epiderme; ainda, há aqueles fatores relacionados à molécula como lipofilicidade/hidrofilicidade, peso molecular, concentração e finalmente, tipo da formulação que veicula a molécula (KARADZOVSKA et al, 2013).

A penetração de substâncias na pele pode ocorrer através do estrato córneo por três vias principais, são elas: intracelular, intercelular e folicular (Figura 2). A via intercelular se dá pelas lamelas lipídicas que rodeiam os corneócitos. A via folicular acontece através de folículos pilosos associados às glândulas sebáceas, os quais correspondem a 0,1% da área da pele e servem como vias de acesso rápido de curto prazo, assim como as glândulas sudoríparas, para a derme profunda. A via intracelular ocorre pelos corneócitos preenchidos de queratina e lamelas lipídicas compostas de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres (JEPPS et al, 2013; MICHINIAK-KOHN et al, 2005).

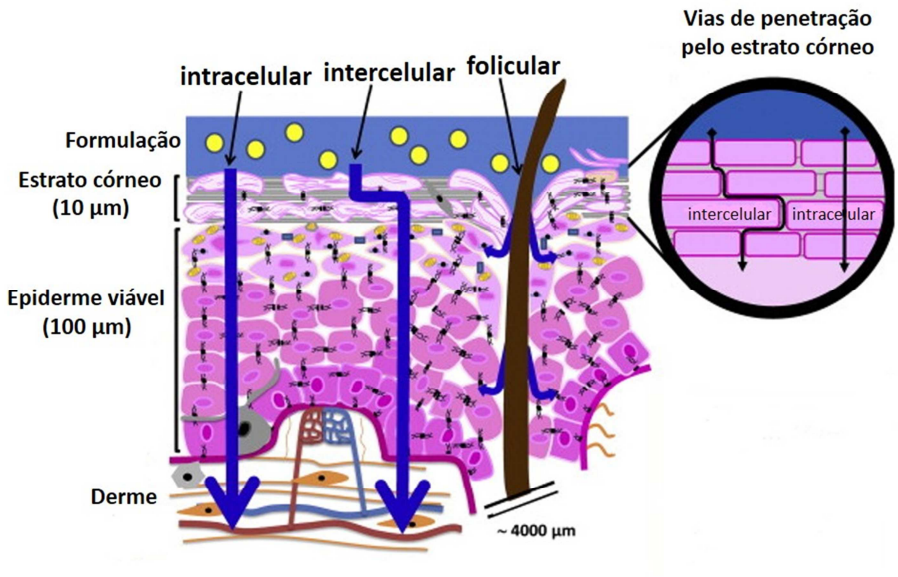

Figura 2: Esquema das vias de penetração cutânea (adaptado de BOLZINGER et al, 2012).

Com relação aos perfis de hidrofilicidade e lipofilicidade, a pele é formada de várias camadas que alternam essas propriedades, começando pelo estrato córneo que tem característica lipofílica (13% de água), seguido da epiderme viável (70% de água) e derme com características hidrofílicas. Se uma substância alcançar a derme,

será absorvido pela circulação sanguínea local, podendo atingir a circulação sistêmica (BOLZINGER et al, 2012).

Quando se inicia o transporte de moléculas através do estrato córneo, o mesmo ocorre essencialmente por difusão passiva pelas vias intercelular e intracelular dependendo da polaridade da molécula, sendo que moléculas lipofílicas permeiam pela via intercelular (lamelas lipídicas) e moléculas hidrofílicas pelas paredes celulares dos corneócitos (domínios protéicos) numa sequência sucessiva de interações. Um fenômeno importante que acontece no transporte pelo estrato córneo é o efeito reservatório para fármacos lipofílicos, pelo facilitado particionamento nesse meio e represamento ao atingir a epiderme viável (JEPPS et al, 2013). Em outro contexto, é possível estabelecer que a entrada de fármaco na pele ocorra a favor de gradiente de concentração e, ainda, através da relação entre a constituição da pele e as propriedades físico-químicas da molécula, considerando os seguintes aspectos: *i)* peso molecular (PM) associado ao coeficiente de difusão; *ii)* número de pontes de hidrogênio estabelecidos durante a rota; *iii)* coeficiente de partição óleo/água ($\log K_{octanol/água}$), que governa a afinidade entre a queratina dos corneócitos e lipídios do estrato córneo (GUY; HADGRAFT, 1985; LIU; TESTA; FAHR, 2011; NAIK; KALIA; GUY, 2000). Assim é possível predizer a permeabilidade de moléculas por meio do cálculo do coeficiente de permeabilidade ($\log k_P$) com a equação 1, baseada na relação de Potts-Guy (POTTS; GUY, 1992).

$$\log K_p \left(\frac{cm}{h}\right) = -2{,}7 + \left(0{,}71 \,.\, \log K_{\frac{octanol}{água}}\right) - (0{,}0061 \,.\, \mathrm{PM}) \qquad \textit{equação 1}$$

De uma forma geral, pode-se afirmar que moléculas com peso molecular abaixo de 500 Da e moderadamente hidrofílicas com coeficiente de partição entre 1 e 3 são mais facilmente permeáveis através da pele (NG; LAU, 2015).

Estabelecido que a difusão passiva de uma substância que adentra a pele segue a lei de Fick, após a instauração do estado de fluxo estacionário (J), considera-se que a quantidade de substância que entra na pele é igual a quantidade que sai da mesma, de acordo com a equação 2:

$$J = \left(\frac{D \,.\, K_{ec/veic}}{h}\right) . C_{veic} = K_p \,.\, C_{veic} \qquad \textit{equação 2}$$

Onde J é o fluxo no estado estacionário *(mg. cm^{-2}. h^{-1})* através de uma membrana de espessura h *(cm)*; $K_{ec/veic}$ é o coeficiente de partição da substância estrato córneo/ veículo; D é a difusibilidade da substância *(cm^2. h^{-1})* no estrato córneo; C_{veic} é a concentração da substância *(mg. cm^{-3})* no veículo; K_p é o coeficiente de permeabilidade da substância dependente da formulação. Por meio dessa equação é possível aumentar a entrada de substâncias na pele pelo aumento da difusibilidade e particionamento no estrato córneo, bem como pelo aumento da concentração da substância na formulação (aumento da atividade termodinâmica da substância). Tais parâmetros aqui apontados podem ser modificados através de diversas estratégias no delineamento de formulações, incluindo sistemas de liberação de fármacos. Porém, deve ser levado em conta também a capacidade da formulação de permitir a saída da substância do veículo para que haja o particionamento na pele (LANE, 2013; NAIK; KALIA; GUY, 2000).

Por outro lado, pode-se melhorar a difusão da molécula na pele por mecanismos de aumento da magnitude da permeação cutânea, tais como: aumento da fluidez das lamelas do estrato córneo, extração de lipídios intercelulares, aumento da hidratação do estrato córneo e alteração das proteínas dos corneócitos (PAUDEL et al, 2010). A função barreira da pele pode ser modificada de diversas formas, dentre elas, estão os promotores de absorção que agem sobre o estrato córneo como álcoois, aminas, ésteres, ácidos graxos, sulfóxidos, terpenos, surfactantes e fosfolipídios. Tais substâncias exercem sua função por vários mecanismos, o que facilita a entrada de substâncias na pele (BARRY, 2006; NAIK; KALIA; GUY, 2000). Outras soluções para superar a barreira cutânea e aumentar a entrada de substâncias na pele, de forma mais incisiva, são por métodos físicos como microagulhas, dermoabrasão, ablação térmica, eletroporação, iontoforese e sonoforese (PAUDEL et al, 2010). Assim, pode-se traçar um paralelo, moléculas de baixo peso molecular e lipofílicas podem ter sua difusão aumentada por métodos químicos e moléculas de alto peso molecular, hidrofílicas e carregadas podem ter sua penetração aumentada por métodos físicos (ESCOBAR-CHÁVEZ; RODRÍGUEZ-CRUZ; DOMÍNGUEZ-DELGADO, 2012; YANG; KALLURI; BANGA, 2011).

Num segundo momento, quando a molécula ultrapassa o estrato córneo e atinge a epiderme viável, a difusão ocorre num sistema aquoso com alta concentração de proteínas e repleto de membranas celulares a serem atravessadas, portanto, a penetração e distribuição das moléculas são dependentes de ligação e sequestramento dentro da epiderme viável, transporte ativo e metabolização (JEPPS et al, 2013; LANE, 2013). O tipo de mecanismo de passagem através da derme é o mesmo para a epiderme viável, uma difusão dificultada em meio aquoso, porém nessa camada o transporte e distribuição da molécula estão facilitados pela presença das circulações sanguínea e linfática, as quais permitem depuração da molécula, criando uma corrente convectiva de transporte da molécula para tecidos profundos (JEPPS et al, 2013).

O transporte de moléculas via apêndices cutâneos oferecem a vantagem de não precisar alterar a fisiologia da pele e, ainda, por serem invaginações da epiderme em direção à derme, propiciando uma maior área de contato para produtos aplicados na pele. Quando se considera sistemas de liberação em tamanho nanométrico essa via é a porta de entrada na pele, pela acumulação de nanopartículas nos apêndices cutâneos, bem como a influência de massagem, oclusão local e rigidez das nanopartículas, produzindo efeito na penetração cutânea (LADEMANN et al, 2009; TRAUER et al, 2014). Outro importante aspecto relacionado com essa via de penetração é o acúmulo de longo prazo de nanopartículas, principalmente para aquelas de tamanho ao redor de 100 nm, o que foi descrito em um experimento realizado com formulações fotoprotetoras. Ainda, em outros relatos na literatura que consideraram partículas de diversos materiais, tamanhos e diferentes propriedades de superfície, partículas numa faixa de 300 a 600 nm tiveram a penetração aumentada e armazenamento mais longo nos folículos pilosos comparado com o estrato córneo. Assim, moléculas carreadas em sistemas de liberação nanoparticulados podem ter uma permeação aumentada pelos aspectos acima expostos (LADEMANN et al, 2011).

1.2 Desenvolvimento de sistemas de liberação de fase líquido-cristalina

Os sistemas líquido-cristalinos tem atraído grande atenção pelas suas propriedades físico-químicas peculiares e pela sua capacidade de veicularem substâncias em suas estruturas como fármacos de baixos pesos moleculares, assim

como os de altos pesos moleculares como proteínas e ácidos nucléicos, promovendo uma liberação sustentada. Os sistemas líquido-cristalinos são representados pelas mesofases: lamelar, cúbica e hexagonal (GUO et al, 2010). São consideradas estruturas supramoleculares de estado intermediário da matéria, que possuem a fluidez do estado líquido com a organização do estado sólido, resultantes do alinhamento espontâneo de moléculas anfifílicas formadas a partir da hidratação das mesmas em ambientes hidrofílicos (SAULNIER et al, 2008). Devido à formação bem definida em estados agregados com morfologia controlável e estrutura em escala nanométrica, esse sistema é colocado em posição privilegiada pela ampla gama de aplicações tecnológicas (YAGHMUR; GLATTER, 2009).

As moléculas anfifílicas com essa caractetística de auto-organização são uma classe de lipídios polares como os monoglicerídeos, fosfolipídios, lipídios baseados em uréia e glicolipídios (BOYD et al, 2006; YAGHMUR; GLATTER, 2009). Pela característica anfifílica do sistema líquido-cristalino, podem ser veiculadas substâncias de naturezas lipofílica e hidrofílica (LOPES et al, 2006a; ROSSETTI et al, 2011). O lipídio polar mono-oleato de glicerila (Figura 3), também chamado de monoleína, é capaz de se organizar em meio aquoso e formar as mesofases do tipo lamelar, cúbica e hexagonal (AMAR-YULI et al, 2008; LARA et al, 2005; LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011). O mono-oleato de glicerila é um éster de ácido graxo ligado a uma molécula de glicerina, onde duas hidroxilas livres conferem caráter polar à molécula. Esta porção hidrofílica faz pontes de hidrogênio com a água em ambientes hidrofílicos e, por outro lado, a cadeia hidrocarbônica possui dupla ligação no carbono 9, que confere propriedades hidrofóbicas. O mono-oleato de glicerila é uma substância lipofílica com HLB 3 – 4 e possui formação micelar em água em concentrações acima da concentração crítica de agregação de 4 x 10^{-6} M (MILAK; ZIMMER, 2015).

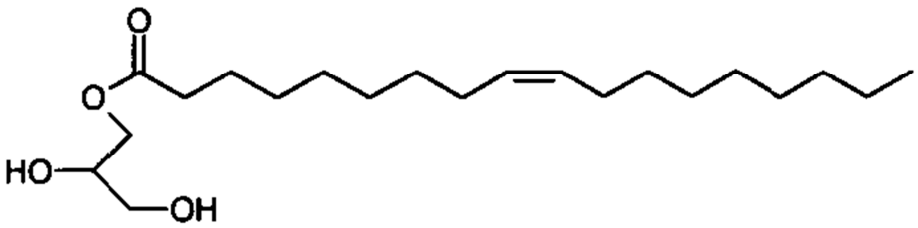

Figura 3: Estrutura química do mono-oleato de glicerila

Lipídios polares como a monoleína possuem capacidade finita de hidratação em ambientes aquosos, portanto, quando veiculado moléculas no interior da matriz lipídica, promove uma liberação sustentada da substância por difusão através das estruturas líquido-cristalinas (BOYD et al, 2006). Ainda, a matriz lipídica, também chamada de fase gel, pode ser dispersa em partículas de tamanho nanométrico que conservam a estrutura líquido-cristalina de origem no seu interior (LARSSON, 1989).

Sistemas líquido-cristalinos constituídos de monoleína são bioadesivos, biodegradáveis e não tóxicos. A formação das fases líquido-cristalinas são dependentes de pressão, teor de água, temperatura do sistema, pH da fase aquosa, geometria da molécula anfifílica e concentração de sais. A caracterização dessas fases pode ser realizada por difração de raios X (CHEN; MA; GUI, 2014; MILAK; ZIMER, 2015; ROSSETTI et al, 2011), microscopia de luz polarizada, microscopia de criotransmissão, calorimetria diferencial exploratória, estudos de reologia e métodos espectroscópicos como ressonância magnética nuclear e RAMAN (FERREIRA et al, 2006; MILAK; ZIMER, 2015; SINGH, 2000).

A organização de moléculas anfifílicas em ambientes aquosos é governada por vários aspectos, dentre eles: densidade de moléculas anfifílicas que tendem a se auto-organizar, formando agregados mais ou menos complexos em função da estrutura química da molécula e a composição do meio que a circunda. Além disso, a presença de cadeias hidrofóbicas, as responsáveis pelo efeito hidrofóbico baseado na baixa solubilidade em água, tendem a formar cavidades de estrutura ordenada e, consequentemente, diminuir a entropia na água. Essas cavidades espontâneas formadas se mantem unidas pelas forças de atração, constituindo agregados estáveis. A porção hidrofílica da molécula, que faz a interface com a água, interage através de pontes de hidrogênio e, determina o tamanho e a forma dos agregados através da interação entre as moléculas e água (TRESSET, 2009).

Em função da geometria da molécula anfifílica pode-se calcular seu comportamento em água, através da teoria do fator de empacotamento. O fator de empacotamento (*crucial packing parameter* = *CPP*) é definido por $CPP = \nu / a_o \cdot l$. Onde, ν é volume da cauda hidrofóbica, a_o é a área da cabeça polar, l é o comprimento da cadeia hidrofóbica. Em função dos valores de CPP, diferentes fases são formadas, para: CPP = 1 ocorre formação de fase lamelar (La); CPP < 1 há arranjo de estruturas óleo em água – micelas normais (L_1) e fase hexagonal normal

(H_1); CPP > 1 formam-se arranjos de estruturas de fase reversa, como fases cúbica (Q_2) e hexagonal (H_2) reversas, micela reversa (L_2), tais representações estão mostrados na Figura 4.

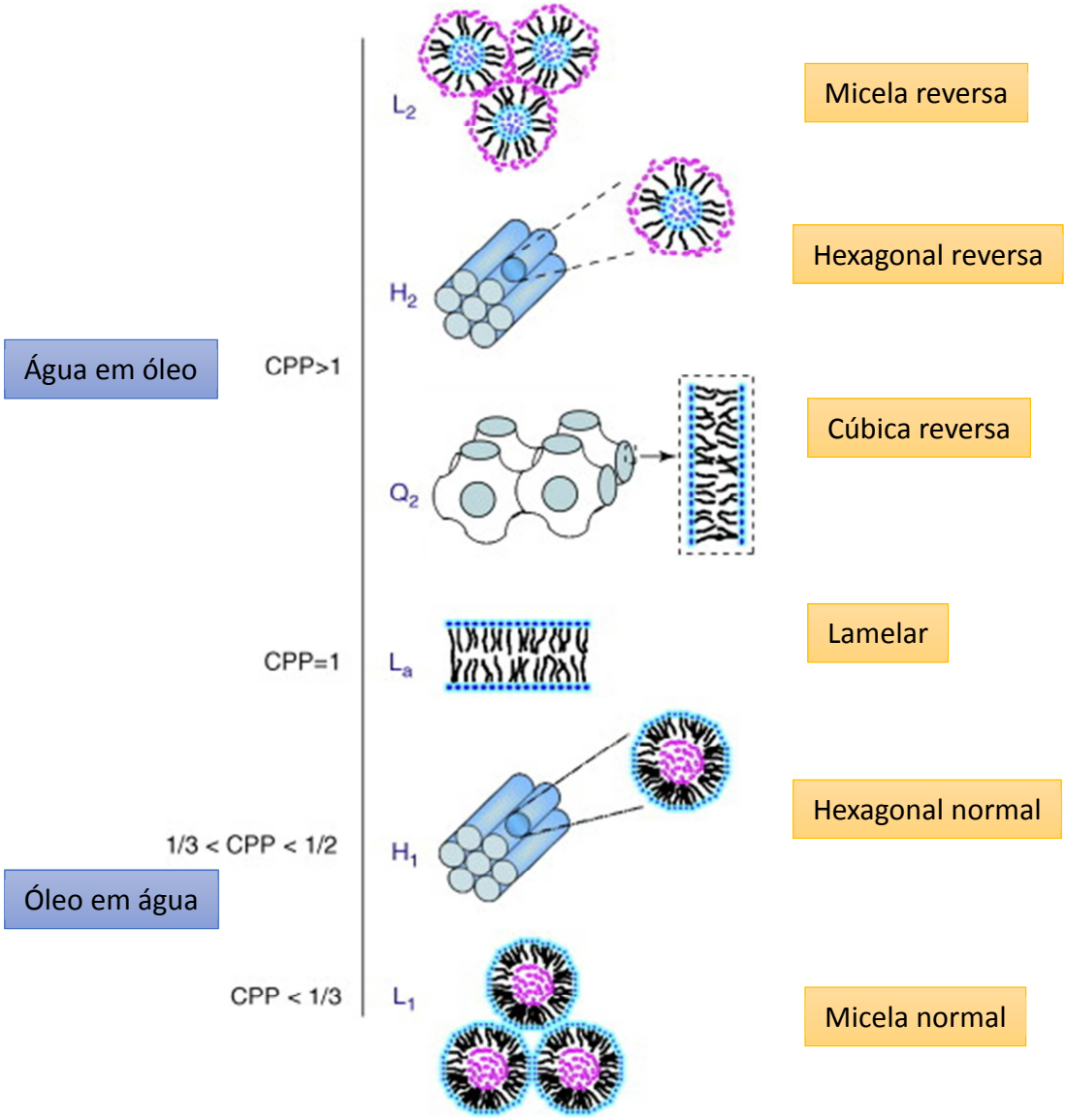

Figura 4: Diagrama esquemático das diferentes fases líquido-cristalinas formadas em função do fator de empacotamento – CPP (adaptado de GUO et al, 2010).

Tal predição é assegurada se houver apenas um tipo de molécula anfifílica no sistema. Do contrário quando ocorre adição de sais, tensoativos ânionicos e catiônicos com diferentes fatores de empacotamento ou outro tipo de substância, há a ocorrência de interações eletrostáticas, forças de van der Waals, pontes de hidrogênio entre as moléculas adicionadas, reorganizando todo o sistema em estruturas mais complexas dependendo da estequiometria (TRESSET, 2009).

Essas estruturas complexas geradas podem ser categorizadas como as estruturas das fases líquido-cristalinas, as quais possuem as seguintes características:

- Fase lamelar: é composta de bicamadas lipídicas entremeadas por fases aquosas, com os grupamentos polares das moléculas voltados para a fase aquosa, enquanto a parte lipofílica está disposta paralelamente. Geralmente, essa fase líquido-cristalina ocorre em baixa concentração de molécula anfifílica, a qual se organiza em finas bicamadas dispostas lateralmente de extensão "infinita", em teoria, como pratos. A espessura da bicamada diminui com o aumento da temperatura e teor de água, transformando-se em outras fases líquido-cristalinas. A fase lamelar é fluida, anisotrópica, estável em baixa concentração de água e temperatura reduzida (MILLER; GHOSH, 1986; TYLE, 1989).
- Fase cúbica: gel viscoso, transparente, termodinamicamente estável em excesso de água e com capacidade de carrear e promover a liberação sustentada de fármacos com variadas propriedades físico-química, como moléculas protéicas (Figura 5A). Sua estrutura é única e corresponde a uma bicamada lípidica contínua curvada com espessura estimada de 3,5 nm, que se estende tridimensionalmente com duas interpenetrações, formando nanocanais aquosos de aproximadamente 5 nm de diâmetro. A fase gel tem aparência e reologia similares a hidrogéis poliméricos. As nanopartículas de fase cúbica são formadas a partir da fase cúbica dispersa em água. Estudos cristalográficos de raios X demonstraram que a fase cúbica pode ser subdividida em primitiva, diamante e giróide (GUO et al, 2010; LARA et al, 2005).
- Fase hexagonal: caracterizada por estruturas colunares extensas compostas por micelas ordenadas, apresentando-se na forma bidimensional (GUO et al, 2010). Pode ser formada em temperatura ambiente pela adição de ácido oléico a mistura de monoleína e água. Caracteriza-se por ser menos viscosa que a fase cúbica e por possuir anisotropia estriada (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2001; LOPES et al, 2006b). É capaz de encapsular moléculas no interior da estrutura líquido-cristalina promovendo liberação sustentada (Figura 5B). A fase gel hexagonal pode ser dispersa em solução aquosa na forma de nanopartículas (CHEN; MA; GUI, 2014).

A grande área superficial das nanopartículas de fase líquido-cristalina associadada às características tridimensionais e bidimensionais de simetria propiciam complexas vias de difusão para as moléculas encapsuladas. A dispersão das nanopartículas conserva a baixa viscosidade de um sistema formado por partículas leves de baixa densidade (AMAR-YULI et al, 2007).

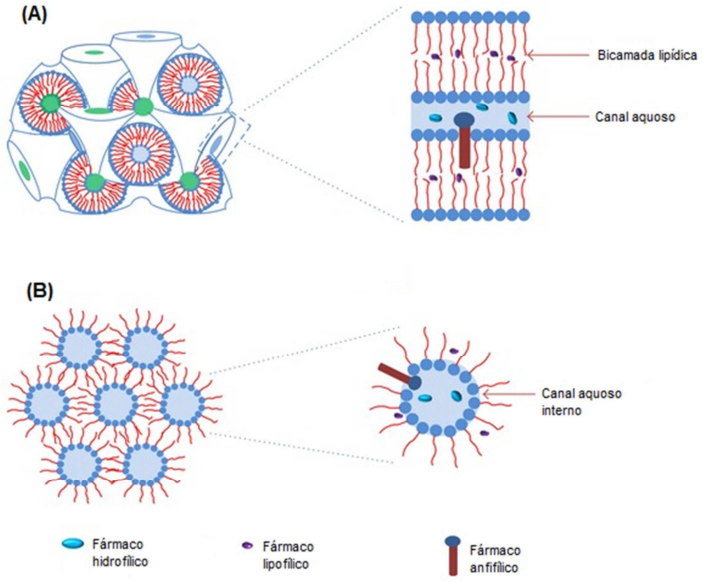

Figura 5: Representação esquemática das fases líquido-cristalinas: cúbica (A) e hexagonal (B) com as possíveis localizações de fármacos dentro da estrutura líquido-cristalina (Adaptado de CHEN; MA; GUI, 2014).

Portanto, nanodispersões aquosas de fase líquido-cristalina apresentam-se como interessantes nanocarreadores para liberação tópica de fármacos de diferentes características físico-químicas, pois tem a capacidade de ultrapassar a função barreira exercida pelo estrato córneo, aumentando a entrada de fármacos nas diversas camadas da pele. Tais nanodispersões são biodesivas, promovem liberação sustentada de fármacos na pele, solubilizando-os e protegendo-os da degradação física, química e enzimática e, ainda, apresentam como formadores estruturais a monoleína e o fitantriol, que são lipídios não tóxicos (LOPES et al, 2006a; GUO et al, 2010; ROSSETTI et al, 2011; VICENTINI et al, 2013).

Por característica, conforme descrito anteriormente, sistemas líquido-cristalinos sofrem transição de fases com a adição de lipídios, fármacos, polímeros e solventes. Com isso, a caracterização das fases líquido-cristalinas deve ser feita após a adição de cada componente acima mencionado (ROSSETTI et al, 2011). Componentes lipídicos como os triglicerídeos de diversos tamanhos de cadeia foram adicionados

ao sistema monoleína – água, a fim de examinar a transição das fases líquido-cristalinas, sendo observados que triglicerídeos de cadeia muito curta como o triacetato de glicerila localizou-se próximo das cabeças polares da monoleína, o que não modificou seu fator de empacotamento, por consequência não alterou a mesofase. Entretanto, triglicerídeos como tributirina e tricaprilato de glicerina de cadeias curta e média, respectivamente, incorporaram-se entre as cadeias hidrofóbicas da monoleína, afetando seu fator de empacotamento, transformando a fase líquido-cristalina para tipo hexagonal (AMAR-YULI; GARTI, 2005).

O ácido oléico é um ácido graxo com o mesmo tamanho de cadeia da monoleína, que ao ser adicionado ao sistema monoleína – água produz maior efeito de resposta a mudanças de pH e concentração salina, sendo a repulsão eletrostática determinante para o comportamento das fases líquido-cristalinas (NAKANO et al, 2002). A adição de ácido oléico tende a se localizar na região interfacial da bicamada e canais aquosos, acomodando-se na região das caudas hidrofóbicas, o que aumenta o volume dessas caudas, e, por consequência, altera o fator de empacotamento com mudança da fase cúbica para hexagonal reversa (CABOI et al, 2001). Sendo que, com 2 % de ácido oléico adicionado à mistura monoleína – água foi possível obter fase líquido-cristalina hexagonal reversa em temperatura ambiente (LOPES et al, 2006b).

Dentre as aplicações das fases líquido-cristalinas como sistemas de liberação de fármacos, Vicentini e colaboradores (2013) desenvolveram nanodispersões líquido-cristalinas (NDLCs) de fase hexagonal contendo o lipídio catiônico oleilamina e o polímero catiônico polietilenoimina para veiculação de *small interfering RNA* (siRNA) na pele. Nesse estudo foi mostrado a efetiva entrega dessa macromolécula na pele, que sobrepôs o estrato córneo e atingiu a epiderme viável, com supressão dos níveis de proteínas em modelo animal com camundongos *hairless*. Ainda, com aplicação na pele para a terapia gênica, foram desenvolvidos sistemas líquido-cristalinos associados com polietilenoimina para veiculação de siRNA. Tais sistemas se caracterizaram como fases cúbica do tipo diamante e hexagonal reversa, as quais promoveram liberação prolongada *in vitro* por sete dias e geleificação *in situ* após injeção subcutânea permanecendo por 30 dias (BORGHETI-CARDOSO et al, 2015).

Na área de terapia fotodinâmica tópica, sistemas de fase líquido-cristalinas foram capazes de veicular diversos fotossensibilizantes como derivado da clorina

para a terapia de câncer cutâneo (PETRILLI et al, 2013), aumentar a penetração na pele de compostos de ftalocianina de zinco (PRAÇA et al, 2012) e veiculá-los em formulações estáveis impedindo a agregação e aumentando a solubilidade desse fotossensibilizantes (ROSSETTI et al, 2011).

Em relação à terapia anti-câncer foram feitas administrações simultâneas pela via oral em modelo animal com ratos de duas NDLCs, uma contendo doxorrubicina (fase cúbica) com intuito de exercer atividade antitumoral e outra contendo coenzima Q10 (fase hexagonal) com a finalidade de minimizar os efeitos colaterais provocados pela doxorrubicina como a peroxidação lipídica advindos da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e cardiotoxicidade. As NDLCs aumentaram a eficácia terapêutica da doxorrubicina e coenzima Q10, bem como protegeram os fármacos veiculados que atravessaram trato gastrointestinal (SWARNAKAR; THANKI; JAIN, 2014).

Dentro da farmacoterapia de antirretrovirais foi veiculado efavirenz em nanopartículas de fase cúbica baseadas em fitantriol que foram administrados oralmente. A NDLC manteve-se estável, aumentou a biodisponibilidade do efavirenz, sendo uma opção de tratamento principalmente para pacientes pediátricos (AVACHAT; PARPANI, 2015). Ainda, com essas nanopartículas de fase cúbica há relatos de veiculação de ciclosporina A para veiculação ocular e cinarizina e anfotericina B para via oral. E, para nanopartículas de fase hexagonal carreamento de vitamina K para via transdérmica e progesterona por via oral (CHEN; MA; GUI, 2014).

1.3 Peptídeos de penetração celular

Peptídeos de penetração celular (PPCs) são definidos como sequências peptídicas de até 30 aminoácidos, com a habilidade de entrar nas células através da translocação da membrana celular (LUNDBERG; LANGEL, 2003). O início do uso de PPCs ocorreu a partir de uma observação feita por Frankel e Pabo (1988) quando estudavam o vírus HIV-1 da síndrome da imunodeficiência adquirida, notando que a proteína transativadora-transcritora (TAT) era capaz de entrar espontaneamente nas células, o que colocou o peptídeo TAT, com 11 aminoácidos na sequência peptídica, como proteína mais usada para a entrega de substâncias. Alguns anos depois foi descoberta outra proteína com a mesma capacidade, chamada Antennapedia,

advinda de um fator de transcrição da *Drosophila melanogaster*, mais tarde denominada Penetratin, a qual possui 16 aminoácidos na sequência peptídica (COPOLOVICI et al, 2014; BRUGNANO; WARD; PANITCH, 2010). Outros PPCs empregados de forma bem sucedida são o transportan, derivado de peptídeos quiméricos, e peptídeos sintéticos anfipáticos (COPOLOVICI et al, 2014; LUNDBERG; LANGEL, 2003).

De uma forma geral os PPCs têm sido utilizados de maneira efetiva para a entrega de peptídeos, proteínas, anticorpos, nanopartículas, oligonucleotídeos, siRNA e DNA, fármacos e agentes de contraste (BRUGNANO; WARD; PANITCH, 2010; KOREN; TORCHILIN, 2012). Assim, o uso de PPCs abrem possibilidades de melhorar a entrega de pequenas e grandes moléculas bioativas que são impedidas de alcançar alvos específicos em células ou, ainda, intracelulares como em organelas, por exemplo, mitôcondrias e lisossomos (KOREN; TORCHILIN, 2012). Um transporte efetivo de moléculas para atingir concentrações intracelulares suficientes para obter efeito biológico, geralmente envolve grande quantidade de fármaco. Portanto, um aumento na translocação da membrana celular pelo transporte aumentado de fármaco, reduz significativamente a quantidade administrada e o surgimento de efeitos colaterais em tecidos saudáveis (VIVÈS; SCHMIDT; PÈLEGRIN, 2008). Além disso, PPCs tem sido aplicados para transporte de substâncias através da pele, barreira hematoencefálica e conjuntiva dos olhos (REISSMANN, 2014). Em relação à aplicação cutânea, a presença de carga positiva dos PPCs pode provocar um acúmulo sobre a pele, que tem residual de carga negativa, melhorando a eficiência de penetração e entrega de substâncias (LOPES et al*,* 2008; DESAI et al*,* 2012).

PPCs tem como características: solubilidade em água, baixa toxicidade, habilidade de entrar em vários tipos celulares, eficiência relacionada com a dose utilizada e nenhuma restrição a respeito do tamanho e tipo de carga a ser transportada (COPOLOVICI et al, 2014). PPCs adentram as células por diversos mecanismos para realizar o transporte de substâncias e partículas. A maioria das células possui na superfície glicosaminoglicanas e proteoglicanas, as quais conferem carga negativa à membrana celular, o que propicia a adsorção e interação eletrostática com os aminoácidos de carga positiva, como arginina e lisina, constituintes das sequências peptíticas de PPCs como peptídeo TAT, Penetratin e

poliargininas. Após a adsorção, entram nas células num processo independente de energia, através da translocação da membrana plasmática (KOREN; TORCHILIN, 2012; LUNDBERG; LANGEL, 2003). Outros mecanismos de entrada dos PPCs são endocíticos como via caveolina ou clatrina e macropinocitose, sendo dependentes da concentração usada, carga e hidrofobicidade de PPCs, bem como do tipo celular envolvido, preponderando um ou outro mecanismo ou, ainda, há ocorrência de mais de um tipo simultaneamente (VIVÈS; SCHMIDT; PÈLEGRIN, 2008).

Para se obter uma efetiva entrega e distribuição no interior da célula, a ligação dos PPCs com a substância ou nanopartícula a ser veiculada pode ser covalente ou não covalente, por conjugação direta ou adsorção física, respectivamente (Figura 6). A ligação covalente pode ocorrer por meio de fusão direta ou de um ligante, entre o PPC e o material a ser veiculado. Com esse tipo de ligação foram realizadas conjugações entre PPCs e o polímero polietilenoglicol (PEG), os quais foram posteriormente inseridos em lipossomas, em que a porção terminal do polímero PEG na superfície do lipossoma estava ligada a PPCs específicos para alvos de interesse com subsequente entrega de fármacos (KOREN; TORCHILIN, 2012). Por fusão direta, foram obtidos bons resultados com sequências peptídicas, de 10 a 16 aminoácidos, ligadas covalentemente em ácidos nucleicos ou nanopartículas de ferro (40 nm), que atravessaram as membranas biológicas por transdução de proteínas (MUNYENDO et al, 2012).

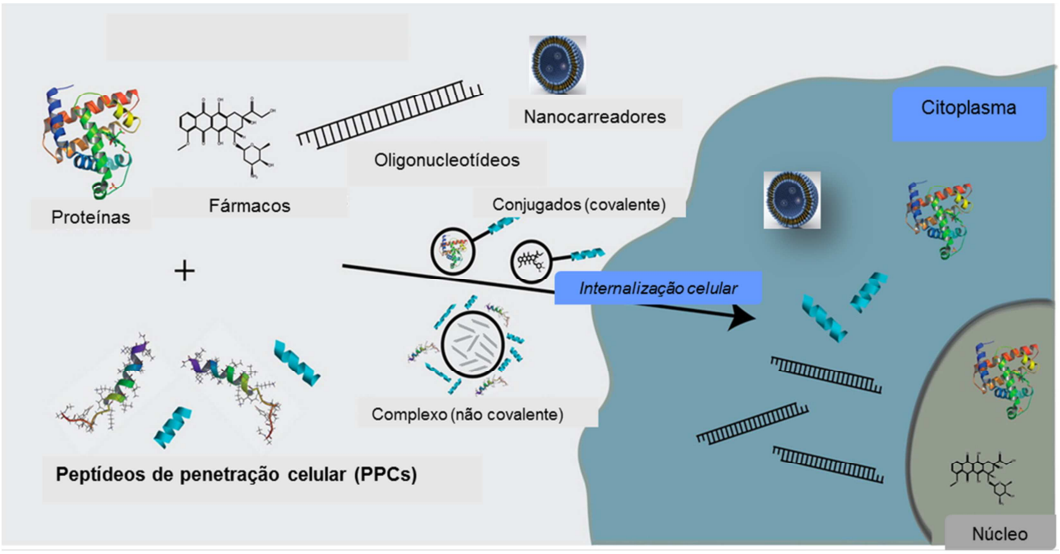

Figura 6: Representação esquemática dos peptídeos de penetração celular (PPCs) com moléculas bioativas e nanocarreadores e indicação da internalização celular (adaptado de COPOLOVICI et al, 2014).

Peptídeo TAT ligado a polímeros a base de PEG foram inseridos em lipossomas com aplicação na área de terapia gênica, o qual promoveu melhor transfecção *in vitro* e *in vivo* de um plasmídeo em células tumorais de cérebro humano após injeção intracraniana em modelo de xenoenxerto em ratos imunossuprimidos (GUPTA; LEVCHENKO; TORCHILIN, 2007). Nesse mesmo tipo de sistema de liberação, foram inseridos polímeros a base de PEG e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) ligados entre si através de um ligação hidrazona sensível a pH, que quando circulantes no organismo protegem de degradação o peptídeo TAT inserido no lipossoma, porém em região tumoral, pH ácido, perdem o recobrimento de PEG e expõe o peptídeo TAT que interage com as células tumorais por meio de ligações eletrostáticas, bem como através pontes de hidrogênio, e subsequentemente, por macropinocitose permite a entrada de macromoléculas e nanopartículas, seguido de escape endossomal aumentado com liberação do material transportado no citoplasma (KOREN et al, 2012).

A forma de ligação entre PPC e o material a ser transportado define vários parâmetros como mecanismo e efetividade da internalização celular, e também o efeito biológico, como em estudo realizado com ácido nucleicos de microRNA ligados covalentemente com PPC, que continha arginina. Tais ligações asseguram maior estabilidade ao material conjugado antes de atingirem o local de entrega do material transportado e podem ser do tipo: peptídica, maleimida, dissulfídica, éster, tioéter, dentre outras (KOREN; TORCHILIN, 2012; LEBLEU et al, 2008).

A complexação do material a ser transportado com PPCs por adsorção física ou ligação não covalente ocorre através de interações eletrostáticas entre cargas positiva (aminoácidos da sequência peptídica – lisina, histidina, arginina) com negativa (material a ser transportado), além de interações hidrofóbicas entre os grupamentos apolares desse complexo (KOREN; TORCHILIN, 2012; HEITZ; MORRIS; DIVITA, 2009; MUNYENDO et al, 2012). Esse tipo de ligação não covalente tem sido aplicado para o transporte de proteínas e oligonucleotídeos com PPCs como peptídeo TAT e poliargininas (HEITZ; MORRIS; DIVITA, 2009). Ainda, há relatos na literatura mostrando a eficiência desse tipo de ligação para peptídeo à base de biotina, que efetivamente penetrou através do estrato córneo e camadas da pele, bem como provocou aumentada internalização celular em células da epiderme após a aplicação tópica. Peptídeo TAT e polilisina-9 acoplados a enzimas

antioxidantes propiciaram a entrega dessas enzimas na epiderme e derme aumentando seus níveis na pele (DESAI; PATLOLLA; SINGH, 2010). Outro estudo feito com PPCs complexado a um fosfopeptídeo demonstrou a aplicação de promotor de penetração cutânea dos peptídeos YARA e WLR, sendo que a ligação não covalente foi mais efetiva comparado com a ligação covalente entre os PPCs e o fosfopeptídeo (LOPES et al, 2008).

A necessidade de delineamento de sistemas de liberação que apresentem maior efetividade e também sejam mais específicos para a entrega de substâncias bioativas em locais em que patologias se desenvolvem é força propulsora para o direcionamento das terapias baseadas em PPCs (MARTÍN; TEIXIDÓ; GIRALT, 2010). O conhecimento das características biológicas locais onde as moléculas devem alcançar pode garantir concentração aumentada local e evitar falta de especificidade, constituindo a melhor maneira para o desenvolvimento seletivo de tratamento voltado para células-alvo e tecidos-alvo, permitindo maior sucesso terapêutico (PERCHE; TORCHILIN, 2013).

PPCs convencionais como peptídeo TAT e poliargininas tem seu mecanismo de entrada celular baseado nas interações eletrostáticas entre os aminoácidos de carga positiva da sequência peptídica com a carga negativa residual de membranas plasmáticas das células eucarióticas, essa interação espontânea ocorre de forma não seletiva, caracterizando a inespecificidade desses PPCs, apesar de sua efetividade (MARTÍN; TEIXIDÓ; GIRALT, 2010).

A seletividade e o direcionamento das terapias levam em consideração características histológicas, celulares e moleculares do local de ação terapêutica, assim como as peculiaridades das doenças que modificam os locais alvos (VIVÈS; SCHMIDT; PÈLEGRIN, 2008). Essa estratégia é denominada *active targeting* (tradução “alvo ativo”), em que se pode orientar a terapia para uma célula específica como a cancerígena, usando-a como alvo, como para receptores de membrana superexpressos para a transferrina, por exemplo. Assim, através da proteína transferrina ancorada na superfície de lipossomas pode-se melhorar a entrega e segurança de substâncias quimioterápicas (MARUYAMA, 2011). Ou ainda, pode-se realizar carreamento de anticorpos na superfície de sistemas de liberação voltados para o receptor de fator de crescimento epidermal tipo 2 (HER2) em células de

câncer de mama para melhorar a eficácia de tratamento, através da aumentada internalização celular e acúmulo tumoral da doxorrubicina (LAGINHA et al, 2008).

Nesse contexto, o desenvolvimento de novas formulações utilizando PPCs voltados para aplicação tópica também são válidos por possibilitarem a entrega de fármacos e macromoléculas em células e tecidos como a pele, bem como por produzirem terapia localizada para as patologias cutâneas evitando efeitos adversos (NASROLLAHI et al, 2012). Estudo relacionado com tratamento tópico anti-inflamatório foi conduzido com ciclosporina A conjugada com poliarginina-7 (sequência peptídica com 7 monômeros de arginina) através de um ligante a base de biotina sensível a pH, estável em pH ácido (pele) e em pH 7,4 (intracelular) libera a ciclosporina A. Este conjugado sobrepôs à barreira do estrato córneo, provocou eficiente liberação local com inibição da inflamação em ensaio *in vivo*, sendo útil para as terapias de psoríase e dermatite atópica (ROTHBARD et al, 2000). A aplicação tópica de PPCs inespecíficos como peptídeo TAT e poliargininas constitui uma estratégia específica, pois as cargas positivas advindas dessas sequências peptídicas provocam um agrupamento de cargas sobre a superfície da pele negativamente carregada, por consequência acúmulo do material a ser transportado, favorecendo a penetração pelas vias de transporte da pele (NASROLLAHI et al, 2012).

Explorando características locais, diversas terapias tem se voltado para o microambiente da lesão ou patologia, os quais possuem atividade enzimática aumentada (proteases), pH diferenciado e alta atividade metabólica. Com isso, utilizam-se ligantes, entre os PPCs e as moléculas transportadas, sensíveis a alta atividade enzimática de metaloproteinases, ao pH ácido da região tumoral ou, ainda, a proteases celulares de agentes infectantes. Assim, após estímulo liberam o PPC para interagir localmente e aumentar a internalização de moléculas. Esse mecanismo constitui a terapia sensível a estímulos locais, também chamada de “ativável” (PERCHE; TORCHILIN, 2013; VIVÈS; SCHMIDT; PÈLEGRIN, 2008). Outros exemplos de condições locais típicas estimulatórias ocorrem em região de infarto e inflamação e em regiões com alterações de tensão de oxigênio (hipóxia) e *status* redox (KOREN; TORCHILIN, 2012).

Outra forma de individualizar a terapia localizada envolve sequências peptídicas específicas complementares ao alvo pretendido, a qual se encaixa no conceito e

propósito de PPCs. Essa técnica se baseia na produção de uma biblioteca de sequências peptídicas por bioprospecção levando em consideração: as proteínas que compõem receptores de superfície de membrana celular, células saudáveis e ensaios *in vivo* de diversas sequências peptídicas similares entre si com avaliação da ação biológica. Essa tecnologia fornece sequências peptídicas para diversos tipos de câncer, dentre eles, HN-1, um PPC específico de 12 aminoácidos para a membrana celular de células de câncer escamoso de cabeça e pescoço, que tem mecanismo de internalização envolvendo endocitose mediada por receptor. Além disso, pode-se também direcionar PPCs para organelas, como um peptídeo para mitocôndrias que exerce atividade citotóxica para células de câncer prostático (MARTÍN; TEIXIDÓ; GIRALT, 2010). De uma forma geral, relacionam-se aspectos de estrutura-atividade com vistas nas interações moleculares de ligação entre proteínas e receptores. Técnicas de caracterização auxiliam esses estudos como cristalografia de proteínas por difração de raios-X, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas e estudos de afinidade entre os ligantes (VIVÈS; SCHMIDT; PÈLEGRIN, 2008).

Dentro desse conceito, o peptídeo D4 possui grande potencial. Ele possui uma sequência peptídica de 6 aminoácidos: Leucina-Alanina-Arginina-Leucina-Leucina-Treonina, obtido de estudos de modelagem molecular e cristalografia *in silico* do receptor de membrana para o fator de crescimento epidermal (EGFR). O peptídeo D4 tem sequência peptídica completar ao receptor mencionado e teve sua atividade avaliada em estudos de aumento de internalização celular de lipossomas funcionalizadas com peptídeo D4 em linhagem celular de pulmão com alto padrão de expressão do receptor EGFR e em modelo de xenoenxerto *in vivo* (SONG et al, 2009). Com o intuito de aumentar a especificidade de terapia cutânea antioxidante, o peptídeo D4 nesse trabalho foi delineado para os receptores EGFR da membrana celular de queratinócitos, que em condições fisiológicas apresentam padrão normal de expressão, porém em situações patólogicas como lesões de ceratose actínica e câncer escamoso de pele, tais queratinócitos possuem superexpressão de receptores EGFR. Essas lesões são provocadas pela exposição sucessiva e continuada à radiação UV ao longo da vida. Assim terapias voltadas para esse receptor constituem terapêutica específica (URIBE; GONZALEZ, 2011).

Todas essas estratégias de melhorar o tratamento de patologias com a utilização de PPCs, incluindo aumento de efetividade e espeficidade das moléculas bioativas veiculadas são melhores aproveitadas se houver uma associação de sistemas de liberação de fármacos, pois ocorre adição das particularidades intrínsecas desses sistemas. Ainda, os PPCs conforme descrito anteriormente possuem a capacidade de aumentar a internalização de sistemas nanoparticulados. Portanto, NDLCs funcionalizadas com peptídeo D4 de ação específica para a epiderme e com peptídeo TAT de ação pronunciada pela interação com tecidos e internalização celular pela presença das cargas positivas dos aminoácidos, apresentam-se como nanocarreadores inovadores para liberação cutânea e entrega de fármacos de uso dermatológico, como o AL.

1.4 Estresse oxidativo e inflamação

O funcionamento de organismos aeróbicos depende de oxigênio para gerar energia a partir de oxidação de moléculas, como glicose e ácidos graxos. Durante essa oxidação, elétrons são removidos, transferidos para uma série de reações, até alcançar o aceptor final, oxigênio molecular. Esses elétrons produzidos são transportados por formas intermediárias de oxigênio, as espécies reativas de oxigênio (EROs), anteriormente chamados de radicais livres, as quais possuem tempo de duração curto e são continuamente geradas em baixa concentração dentro do metabolismo aeróbico normal. No metabolismo endógeno, a maior fonte de EROs são geradas pelas mitocôndrias (BICKERS; ATHAR, 2006; EWBIEWENGA et al, 1997; CIRCU; AW, 2010).

Dentre as EROs estão o oxigênio singlete ($^1O_2$), ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), sendo o oxigênio singlete o mais potente oxidante comparado com os outros mencionados, o qual se forma pela transferência de energia física ou química para o oxigênio molecular (O_2) e, quando se reduz forma as outras formas de EROs ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, OH^-), produtos gerados a partir de reações em cadeia (BICKERS; ATHAR, 2006). Além disso, EROs também podem ser produtos da exposição a xenobióticos e dependendo da sua concentração podem ser benéficos ou nocivos para células e tecidos, agindo como mensageiros na sinalização e regulação intracelular (BARTOSZ, 2009). Uma fonte de produção *in situ* de EROs na pele é a infiltração de leucócitos ativados que

liberam $O_2^{\cdot -}$ e hipoclorito, com o propósito de eliminar micro-organismos e degradar tecidos danificados durante o processo inflamatório. Ainda, íons metálicos como Fe^{+2} e Cu^{+1} funcionam como catalisadores das reações geradoras de EROs (BICKERS; ATHAR, 2006).

A fim de controlar o processo oxidativo, os sistemas biológicos possuem diversos mecanismos antioxidantes, tais como antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutase, catalase, peroxidases e os antioxidantes não enzimáticos, como a glutationa, isoformas de vitamina E e ubiquinol, que previnem danos em proteínas, lipídios e DNA celulares. Os antioxidantes enzimáticos estão na linha de frente de proteção, pois sequestram as EROs, convertendo-as em espécies menos reativas. Além desses compostos mencionados, a pele possui outros antioxidantes de maior potência como ascorbato, ácido úrico, carotenoides e sulfidrilas, sendo que a epiderme contém maior concentração de antioxidantes comparado com a derme (GODIC et al, 2014; SCANDALIOS, 2005).

Os sistemas antioxidantes e as EROs devem estar balanceados dentro das células, porém quando ocorre algum desequilíbrio entre eles, por depleção dos antioxidantes ou por acúmulo de EROs, surge o estresse oxidativo. Um indicador de estresse oxidativo é o aumento dos níveis endógenos de EROs geradas, por exemplo, pela exposição à radiação UV (SCANDALIOS, 2005). Em outras palavras, o distúrbio no equilíbrio de substâncias oxidantes/ antioxidantes no sentido de reações pró-oxidantes leva a danos de componentes celulares, como peroxidação de ácidos nucléicos e lipídios, contribuindo para o desenvolvimento de doenças (KRUK; DUCHNIK, 2014).

A pele é um órgão constantemente exposto ao estresse oxidativo. A radiação UV que incide sobre a pele, especialmente nos queratinócitos, produz uma grande quantidade de EROs. A radiação ultravioleta B (UVB), mesmo após exposições curtas, provoca danos na pele, como formação de dímeros de DNA e fotoprodutos e, ainda, redução de antioxidantes fisiológicos, pela ação de EROs na epiderme e derme, o que desregula o sistema redox celular (BITO; NISHIGORI, 2012). Exposições prolongadas e sucessivas à radiação UV sobrecarregam o sistema antioxidante da pele e a capacidade de resposta imune, levando a danos oxidativos, imunotoxicidade, envelhecimento cutâneo prematuro e câncer de pele (GODIC et al, 2014).

Concentrações moderadas de EROs propagam-se como sinalizadores celulares em cascata, desencadeando uma onda de EROs através dos tecidos, o que os constitui como importantes mediadores regulatórios de diversas vias e processos como proliferação celular e apoptose (WAGENER; CARELS; LUNDVIG, 2013). Além de existir uma relação entre o estresse oxidativo e a inflamação, é possível afirmar que a etiologia e progressão de um grande número de patologias advêm dessa inter-relação. A produção de EROs é parte da resposta inflamatória, como também da ativação de células inflamatórias que geram EROs para eliminar patógenos em geral. Por exemplo, um dos modos de desenvolvimento de tumor em células epiteliais é a produção de EROs, os quais são capazes de ativar neutrófilos e macrófagos promovendo câncer em células epiteliais. Considerando que, a liberação de fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), importante citocina pró-inflamatória, é mediadora chave da inflamação com potencial mutagênico, se tiver sua produção continuada pode exacerbar todo esse quadro (KHAN et al, 2012).

H_2O_2 é reconhecidamente o maior sinalizador celular por mediar oxidação dos grupos tióis de proteínas, provocar modificações covalentes entre aminoácidos afetando a atividade das proteínas e alterar o estado redox de proteínas e, por consequência, o *status* redox celular. O fator de transcrição nuclear kappa beta (NF-κβ) contem resíduos de cisteína sensíveis à modificação redox, o que afeta a ligação de moléculas de DNA e a regulação da transcrição de genes sensíveis à modificação redox. Ainda, a ativação por EROs resulta na translocação do NF-κβ para o núcleo com transcrição de vários genes-alvo seguido de desenvolvimento de inflamação, proliferação e sobrevivência celulares. Entretanto, altas concentrações de EROs inativam o NF-κβ seguido de morte celular (KRUK; DUCHNIK, 2014; WAGENER; CARELS; LUNDVIG, 2013). Especificamente, a formação do NF-κβ leva a ativação da proteína quinase C (PKC), enzima que medeia à formação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o TNF-α, sendo que este último estimula e aciona a proliferação e diferenciação de células do sistema imune, apoptose celular e é considerada citocina chave da inflamação (KRUK; DUCHNIK, 2014).

Após a exposição da pele à radiação UV, ocorre a ativação de um complexo multiprotéico chamado *inflammasome* que está no citoplasma de queratinócitos, esse complexo é fonte rica de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1β (IL-

1β) e interleucina-1α (IL-1α), o que implica no papel imunológico e de resposta inflamatória dos queratinócitos (WAGENER; CARELS; LUNDVIG, 2013). Além disso, a presença de IL-1β culmina na ativação de NF-κβ, bem como a liberação de novas citocinas como TNF-α, IL-6 e IL-1, resultantes da exposição à radiação UV (BANERJEE; LEPTIN, 2014). Por outro lado, tal exposição induz diminuição dos níveis antioxidantes endógenos como glutationa e aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO), enzima oxidorredutase presente em leucócitos granulocíticos como leucócitos polimorfonucleares e monócitos, sendo um biomarcador para avaliar a resposta inflamatória frente a agentes irritantes e tumorigênicos (VILELA et al, 2013).

A inflamação é essencial para a sobrevivência, está ligada à resposta imune inata, com função de proteção contra os agentes patogênicos, com consequente desenvolvimento da imunidade específica gerada a longo prazo e, ainda, participa do reparo de tecidos danificados. A inflamação aguda é processo auto limitante rápido, que se permanecer por tempo prolongado pode ser tornar crônica (MUELLER, 2006). Essa resposta é considerada um instrumento para suprir o tecido de fatores de crescimento e citocinas, que sinalizam os movimentos celulares e teciduais necessários para a reparação, como a migração de mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares. Essas células liberam mediadores quando ativadas por estímulos físico, químico, microbiológico ou imunológico, e esses mediadores provocam reações como permeabilidade vascular e vasodilatação, dor, coceira e recrutamento de células inflamatórias para o local (GILLITZER; GOEBELER, 2001; EMING; KRIEG; DAVIDSON 2007).

A pele por recobrir toda a extensão do corpo, com função primária de proteção, está diretamente envolvida no reparo de injúrias para manter a homeostasia. Para se alcançar esse restabelecimento cutâneo há vários processos envolvidos, desde numerosos tipos de células até fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular (DELAVARY et al, 2011). Se algum dos passos do mecanismo inflamatório falhar, pode tornar esse processo resolutivo desregulado culminando para uma cronicidade (DEBENEDICTIS et al, 2001).

Os antioxidantes atenuam os danos provocados pelas EROs, podendo reduzir ou reverter muitos dos eventos celulares que contribuem para degradação da epiderme e surgimento de patologias (GODIC et al, 2014). Terapias antioxidantes

aplicadas na pele podem exercer ação sobre a transdução de sinais para queratinócitos, pois essas terapias agem sobre as EROs, as quais por sua vez participam da cascata inflamatória para regulação de proliferação de queratinócitos. No processo de transdução de sinal, uma grande quantidade de EROs intracelular pode provocar danos no DNA e se persistir esse dano, inicia-se resposta inflamatória, e em associação com a proliferação de células danificadas tem-se aparecimento de tumor (PARK et al, 2003; BITO; NISHIGORI, 2012).

EROs estão envolvidos nos três estágios de desenvolvimento de câncer de pele (iniciação, promoção e progressão) e também no aparecimento de patologias cutâneas que incluem inflamação e estresse oxidativo como envelhecimento cutâneo. Portanto, a utilização adequada de substâncias antioxidantes nesse cenário para minimizar ou proteger dos efeitos deletérios provocados por EROs podem contribuir para o restabelecimento de respostas fisiológicas, bem como prevenção e tratamento de envelhecimento cutâneo e câncer de pele (CASAGRANDE et al, 2006; BICKERS; ATHAR, 2006).

A terapia antioxidante tópica constitui adequada estratégia em prevenir o estresse oxidativo e os danos advindos desse desequilíbrio (GODIC et al, 2014). Tal terapia está geralmente relacionada com a aplicação de substância antioxidantes não enzimáticas de baixo peso molecular como vitaminas E e C e seus derivados, coenzima Q10 e compostos fenólicos, em que a propriedade antioxidante intrínseca tem o intuito de reduzir a ação de EROs. Como forma de aumentar a efetividade desses compostos, faz-se necessária apropriada veiculação em formulação baseada em nanocarreadores como lipossomas e nanopartículas, que são capazes de propiciar maior estabilidade e concentração de substância antioxidante para aplicação cutânea (STOJILJKOVIC; PAVLOVIC; ARSIC, 2014).

1.5 Ácido lipóico

O ácido lipóico (AL) foi isolado pela primeira vez de fígado bovino, em 1951. É um composto antioxidante dissulfídico sintetizado endogenamente por quase todas as células mamíferas. É um cofator-chave do metabolismo enzimático oxidativo, com papel importante na transdução de energia nas mitocôndrias, agindo como coenzima para a piruvato desidrogenase e para a α-cetoglutarato desidrogenase. De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), traduzindo União Internacional de Química Pura e Aplicada, sua nomenclatura química é ácido 5-(1,2-

ditiolan-3-il) pentanóico. Sua estrutura química apresenta oito carbonos e um carbono assimétrico (centro quiral), o que permite duas formas de isômeros ópticos. Além disso, após ser absorvido por células e tecidos transforma-se em sua forma reduzida – ácido diidrolipóico (ADHL), também com ação antioxidante, constituindo a dupla redox AL/ADHL com potencial de redução de – 0,32 V (Figura 7) (GORACA et al, 2011; HERMANN et al, 1996; HO et al, 2007; KEITH et al, 2012; TEICHERT et al, 2005).

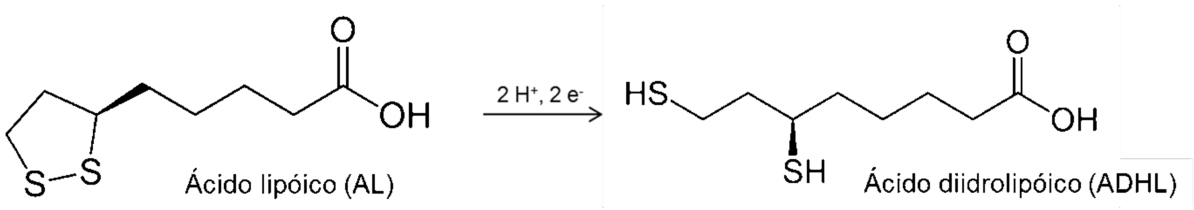

Figura 7: Representação da dupla redox – ácido lipóico (AL) e ácido diidrolipóico (ADHL).

Os efeitos do AL se dão em função da reação de troca entre ponte dissulfídica e formação de tióis, base da dupla redox AL/ADHL, que auxilia na modulação do estado redox das células com diversos efeitos biológicos, dentre eles: sequestramento de EROs, atividade quelante de íons metálicos, interação com antioxidantes endógenos como glutationa, vitaminas E e C e exógenos como a cisteína/cistina, bem como ação sobre a expressão gênica e apoptose (ALVAREZ; BOVERIS, 2000; GORACA et al, 2011; KIM et al, 2008; PACKER; CADENAS, 2011). O transporte de AL para as células pode ocorrer através de transportadores para ácidos graxos e de vitaminas dependente de sódio. A redução do AL para ADHL nas células é efetuada por enzimas como NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), tiorredoxina redutase, lipoamida desidrogenase e glutationa redutase (PACKER; CADENAS, 2011).

Pela sua atividade antioxidante, atua na prevenção química do estresse oxidativo, modula a sinalização da cadeia de citocinas como agente anti-inflamatório, o que contribui para tratamentos tópicos de pele relacionados com o estresse oxidativo associado ao envelhecimento cutâneo e aparecimento de câncer (HO et al, 2007; MATSUGO; BITO; KONISHI, 2011).

Relacionado com as suas propriedades no envelhecimento cutâneo, pesquisadores avaliaram o AL em ensaios *in vitro* com fibroblastos da derme a

produção de fibras de colágeno. Após tratamento por 24 h com AL 100 μM, houve aumento e produção de novas fibras de colágeno, bem como a expressão de uma enzima relacionada com o processamento do colágeno (TSUJI-NAITO et al, 2010). Considerando o efeito anti-melanogênico do AL, Kim e colaboradores (2008) fizeram uma ligação éster entre AL e moléculas de PEG, sinteticamente AL – PEG, que provocou diminuição da melanogênese em torno de 63 % numa concentração de 0,25 mM, superando a inibição de AL puro na mesma concentração, sem provocar diminuição da viabilidade celular de melanócitos B16F10, desta maneira, caracterizou-se como opção para clareamento de manchas hiperpigmentadas presentes em regiões da pele expostas à radiação UV.

Estudo relacionado com estresse oxidativo em queratinócitos evidenciou que AL numa concentração de tratamento de 10 μM foi capaz de protegê-los após a ação do agente oxidante peróxido de hidrogênio (100 μM). Essa proteção foi provada com ensaios de produção de EROs e inibição de IL-6, porém os efeitos foram mais bem evidenciados para a ação antioxidante e anti-inflamatória quando houve associação de várias substâncias com essas mesmas propriedades terapêuticas, dentre elas coenzima Q10, resveratrol, vitamina E, óleo de semente de uva e selênio, pela redução da secreção de citocinas e modulação de NF-κβ (FASANO et al, 2014). Outro estudo que realizou tratamento com associações utilizou nanoemulsões enriquecidas com nanopartículas de ouro, extrato de calêndula e AL em modelo *in vitro* com fibroblastos. E, através de ensaios de atividade antioxidante celular e de cicatrização e proliferação celulares, propuseram essa associação para tratamento antioxidante e de regeneração tecidual tópico (GULER et al, 2014).

A relação existente entre AL e NF-κβ decorrem do estado redox intracelular, pois o AL faz modulação reversível dos antioxidantes celulares glutationa e cisteína/cistina. Ainda, pode reagir com os resíduos de enxofre presente nas proteínas intracelulares (metionina e cistina) através da oxidação dos grupos sulfidrila ou formando pontes dissulfídicas, o que altera o estado tiol redox de moléculas sinalizadoras (Figura 8). Tais modificações intracelulares ativam as porções redox sensíveis do NF-κβ que está envolvido na expressão de genes de citocinas inflamatórias e apoptose. Quando o AL está presente no interior das células provoca inibição do NF-κβ, diminuindo a inflamação como o que ocorreu em estudos descritos na literatura com monócitos, linfócitos T, osteoclastos, células

tubulares renais e ovarianas, pois provocou supressão das vias de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α, assim como de enzimas envolvidas no processo inflamatório como a ciclooxigenase 2 (GORACA et al, 2011; PACKER; CADENAS, 2011).

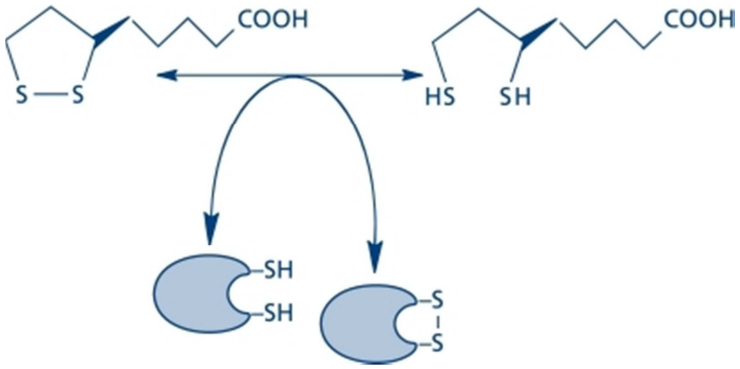

Figura 8: Troca tiol/dissulfeto acoplado com a dupla redox AL/ADHL como base da ativação/inibição da sinalização celular e transcrição (adaptado de PACKER; CADENAS, 2011).

Em geral, as propriedades terapêuticas do AL têm sido relacionadas com o tratamento de diversas patologias que envolvem estresse oxidativo como: neurodegenerativas, autoimune, cardiovasculares, bem como diabetes mellitus e câncer (GORACA et al, 2011; LI et al, 2015).

AL é uma molécula pequena com peso molecular de 206 g, que se dissolve em meios hidro e lipofílicos (THOMAS et al, 2014). Porém sua solubilidade em água é muito baixa, o que exige veiculação em formulações que superem essa limitação para aplicações cosméticas e farmacêuticas, o que foi demonstrado por Liu e colaboradores (2011) quando estabeleceram ligação entre moléculas de AL e PEG para melhorar a solubilidade aquosa do AL. Ainda, AL apresenta instabilidade na presença de luz, pois absorve luz na faixa de comprimento de onda de 300 nm e é vulnerável à termólise, pelo seu baixo ponto de fusão (59 - 62°C) (KOFUJI et al, 2008).

No caso de aplicação tópica é essencial a utilização de sistemas de liberação como opção de suplementação de AL na pele, visto que o mesmo exerce efeitos benéficos quando administrado exogenamente (YAMADA et al, 2011). Da mesma forma, para propiciar considerável concentração local e intracelular, pois o AL tem atividade terapêutica relacionada a altas doses e ao tempo de meia-vida curto (ALVAREZ; BOVERIS, 2000; KOFUJI et al, 2008). Ainda, AL pode ser considerado

um antioxidante ideal para aplicação tópica, porque uma vez penetrado na pele se transforma na sua forma antioxidante mais potente – ADHL (PODDA et al, 1996).

Desse modo, a encapsulação do AL num sistema nanoestruturado como as NDLCs garantem proteção contra degradação, propiciando estabilização química, além de promover uma liberação adequada nas camadas da pele. Também, tem a capacidade de promover liberação de AL na pele e nas células pela sua composição estar baseada em promotores de penetração associado ao tamanho nanométrico das partículas que compõem o sistema. A funcionalização com PPCs representa uma inovação com o intuito de aumentar a penetração e o tempo de residência desses sistemas nanoestruturados contento AL na pele, objetivando melhorar o desempenho e a efetividade das NDLCs em tratamentos dermatológicos.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos permitiu-se concluir que:

- Foi possível a validação de três metodologias de CLAE para os detectores UV, EQ e ELE para a quantificação do fármaco AL com exatidão e precisão, bem como desenvolvimento de técnica de extração de AL a partir da pele com taxas de recuperação acima de 73% com quantificação pelas três metodologias cromatográficas validadas.
- Foram realizadas com sucesso as reações de conjugação, através de ligações covalentes, entre polímeros de PEG2000 e PEG3400 com o lipídio DOPE, bem como ligação dos lipopolímeros produzidos: DOPE-PEG_{3400} e DOPE-PEG_{2000} com os PPCs, peptídeos D4 e TAT, respectivamente.
- Foram obtidas NDLCs com diferentes composições e concentrações dos componentes formadores das nanopartículas líquido-cristalinas, assim como diversificadas composições de superfície relativas à associação com o peptídeo TAT e às funcionalizações com lipopolímeros e lipopolímeros conjugados aos PPCs.
- As caracterizações físico-químicas dos sistemas obtidos exibiram fases líquido-cristalinas de tipos hexagonal, em sua maioria, e cúbica; tamanho reduzido de partícula na ordem de 200 nm, estreito índice de polidispersividade, potencial zeta negativo, número de nanopartículas por mL das NDLCs na faixa de 10^{12} e EE em torno de 79% com diversas CC que atingiram 15%. As NDLCs apresentaram estabilidade satisfatória relacionado a estes parâmetros físico-químicos avaliados, bem como manutenção de fase líquido-cristalina.
- A padronização da avaliação *in vitro* para as NDLCs em queratinócitos e fibroblastos elegeu parâmetros adequados de tratamento relacionados à densidade celular, ao tempo de tratamento e à diluição da formulação para serem aplicados nas células, evidenciando que o tratamento não promoveu diminuição da viabilidade celular.
- O pré-tratamento de queratinócitos e fibroblastos com AL foi capaz de protegê-las contra o estresse oxidativo induzido por H_2O_2.
- A microscopia confocal a laser evidenciou a entrada das NDLCs contendo AL pela demonstração da localização das nanopartículas nos citoplasmas de queratinócitos e fibroblastos cultivados em cocultura *in vitro.* A citometria de fluxo para as NDLCs funcionalizadas com DOPE-PEG_{3400}-peptídeo D4 evidenciaram

internalização celular aumentada em queratinócitos em função da concentração e tempo de incubação, caracterizando a funcionalização específica. Para as NDLCs funcionalizadas com DOPE-PEG_{2000}-peptídeo TAT ou associada ao peptídeo TAT houve internalização aumentada em queratinócitos para todas as NDLCs, caracterizando a inespecificidade da funcionalização.

- Em ensaios de permeação cutânea *in vitro*, as NDLCs tiveram seu perfil evidenciado de aumento de penetração cutânea do fármaco por microscopia de fluorescência e pela extração de quantidades aumentadas de AL da pele e da solução receptora.
- A avaliação *in vivo* em modelo agudo de exposição à radiação UVB com camundongos *hairless* demonstrou a eficácia do tratamento com as NDLCs contendo AL pelas diminuições significativas de marcadores biológicos relacionados com a inflamação e estresse oxidativo cutâneos.

Dessa forma, pode-se concluir que foram desenvolvidas NDLCs contendo AL com variada composição de superfície com PPCs, as quais estão dentro de parâmetros físico-químicos adequados para a via tópica e são capazes de promover entrada aumentada de AL na pele. A funcionalização das NDLCs com os peptídeos D4 e TAT associada às características intrínsecas das NDLCs como tamanho nanométrico e composição de promotores de penetração constitui estratégia inovadora e específica para entrega cutânea de AL. Tal estratégia é alternativa eficaz para terapia antioxidante tópica de patologias cutâneas que envolvem estresse oxidativo e inflamação com aplicação na prevenção do envelhecimento cutâneo e tratamento de patologias inflamatórias de pele.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M. Dissolution, bioavailability and bioequivalence. Easton: Mack, 544 p, 1989.

ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: mechanism and opportunity for drug development, **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, p. 189 – 212, 2013.

ALFONS, K.; ENGSTROM, S. Drug compatibility with the sponge phases formed in monoolein, water and propyleneglycol or poly(ethyleneglycol), **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, 1998.

ALLEN, L. V. J.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 8ª edição, Editora Artmed, Porto Alegre, p. 324 – 336, 2007.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G., ANSEL, H. C. Dosage Form Design: Pharmaceutical and Formulation Considerations. In: **Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**, 9ª edição, Editora Lippincott Williams & Williams, 2011.

ALVAREZ, S., BOVERIS, A. Antioxidant adaptive response of human mononuclear cells to UV-B: effect of lipoic acid, **Journal of Biochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 55, p. 113 – 119, 2000.

AMAR-YULI, I.; GARTI, N. Transitions induced by solubilized fat into reverse hexagonal mesophases, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 43, p. 72 – 82, 2005.

AMAR-YULI, I.; WATCHTEL, SHOSHAN, E. B.; DANINO, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Hexosome and hexagonal phases mediated by hydration and polymeric stabilizer, **Langmuir,** v. 23, p. 3637-3645, 2007.

AMAR-YULI, I.; WACHTEL, E.; SHALEV, D.E.; ASERIN, A.; GARTI, A. Low viscosity reversed hexagonal mesophases induced by hydrophilic additives, **The Journal of Physical Chemistry B,** v. 112, p. 3971 – 3982, 2008.

AMRI, A.; LE CLANCHE, S.; THÉROND, P.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; BORDERIE, D.; LAI-KUEN, R.; CHAUMEIL, J. C.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. Resveratrol self-emulsifying system increases the uptake by endothelial cells and improves protection against oxidative stress-mediated death, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, p. 418 – 426, 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 de março, 2012.

ARUNMETHA, S.; MANIVASAKAN, P.; KARTHIK, A.; DHINESH BABU, N. R.; SRITHER, S. R.; RAJENDRAN, V. Effect of processing methods on physicochemical properties of titania nanoparticles produced from natural rutile sand, **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 356, p. 375-386, 2013.

AVACHAT, A. M.; PARPANI, S. S. Formulation and development of bicontinuous nanostructured liquid crystalline particles of efavirenz, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 87 – 97, 2015.

BANERJEE, S.; LEPTIN, M. Systemic response to ultraviolet radiation involves induction of leukocytic IL-1β and inflammation in zebrafish, **The Journal of Immunology**, v. 193, p. 1408 – 1415, 2014.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.14, p.102 – 14, 2001.

BARRY, B. W. Penetration enhancer classification. In: SMITH, E. W., MAIBACH, H. I. (Eds.), **Percutaneous Penetration Enhancers**, 2ª edição, Taylor & Francis Group Press, Boca Raton, p. 3 – 14, 2006.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? **Biochemical Pharmacology,** v. 77, p. 1303 – 1315, 2009.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; REICH-ROHWIG, E.; MARSCHÜTZ, M.; SCHUHBAUER, H.; KRATZEL, M. Development of a sustained release dosage form for α-lipoic acid. II. Evaluation in human volunteers, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, p. 35 – 42, 2004.

BHALEKAR, M. R., POKHARKAR, V., MADGULKAR, A., PATIL, N. Preparation and Evaluation of Miconazole Nitrate-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Topical Delivery, **AAPS PharmSciTech,** v.10, p. 289 – 296, 2009.

BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease, **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 2565 – 2575, 2006.

BITO, T.; NISHIGORI, C., Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways, **Journal of Dermatological Science**, v. 68, p. 3 – 8, 2012.

BLUME-PEYTAVI, U.; MASSOUDY, L.; PATZELT, A.; LADEMANN, J.; DIETZ, E.; RASULEV, U.; BARTELS, N. G. Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 450 – 453, 2010.

BOLZINGER, M. A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-limiting membrane, **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 156 – 165, 2012.

BORGHETI-CARDOSO, L. N.; DEPIERI, L. V.; KOOJIMANS, S. A. A.; DINIZ, H.; CALZZANI, R. A. J.; VICENTINI, F. T. M. C.; VAN DER MEEL, R.; FANTINI, M. C. A.; IYOMASA, M. M.; SCHIFFELERS, R. M.; BENTLEY, M. V. L. B. An *in situ* gelling liquid crystalline system based on monoglycerides and polyethilenimine for local delivery of siRNAs, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 103 – 107, 2015.

BORNÉ, J.; NYLANDER, T.; KHAN, A. Phase behaviour and aggregate formation for the aqueous monoolein system mixed with sodium oleate and oleic acid, **Langmuir**, v. 17, p. 7742-7751, 2001.

BOYD, B. J.; WHITTAKER, D. V.; KHOO, S. M.; DAVEY, G. Hexosomes formed from glycerol surfactants – formulation as a colloidal carrier for irinotecan, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, p. 154 – 162, 2006.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology,** v.78, n.3, p.206-209, 1982.

BRUGNANO, J.; WARD, B. C.; PANITCH, A. Cell penetrating peptides can exert biological activity: a review, **BioMol Concepts**, v. 1, p. 109 – 116, 2010.

CABOI, F.; AMICO, G. S.; PITZALIS, P.; MONDUZZI, M.; NYLANDER, T.; LARSSON, K. Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein:water system. I. Phase behavior, **Chemistry and Physics Lipids,** v. 109, p. 47 – 62, 2001.

CAI, X.; CHEN, X.; WANG, X.; XU, C.; GUO, Q.; ZHU, L.; ZHU, S.; XU, J. Pre-protective effect of lipoic acid on injury induced by H_2O_2 in IPEC-J2 cells, **Mollecular and Cellular Biochemistry**, v. 378, p. 73 – 81, 2013.

CAMPANINI, M. Z.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; IVAN, A. L. M.; FERREIRA, V. S.; VILELA, F. M. P.; VICENTINI, F. T. M. C.; MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; FONSECA, M. J. V.; FARIA, T. J.; BARACAT, M. M.; VERRI JR, W. A.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 127, p. 153 – 160, 2013.

CAMPOS, P. M.; PRAÇA, F. S. G.; BENTLEY, M. V. L. B. Quantification of lipoic acid from skin samples by HPLC using ultraviolet , electrochemical and evaporative light scattering detectors, **Journal of Chromatography B**, *no prelo*, 2015.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia *in vivo*.** 2005. 229f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR, W. A.; DORTA, D. J.; SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 21 – 27, 2006.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion, **Journal of Chromatography B,** v. 689, p. 175-189, 1997.

CEVIN, C.; VANDOOLAEGHE, P.; NISTOR, C.; TIBERG, F.; JOHNSSON, M. A combined *in vitro* and *in vivo* study on the interactions between somatostatin and lipid-based liquid crystalline drug carriers and bilayers, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p. 377 – 385, 2009.

CHAMORRO, L.; GARCÍA-CANO, A.; BUSTO, R.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.; ALBILLOS, A.; LASUNCIÓN, M.A.; PASTOR, O. Quantitative profile of lipid classes in blood by normal phase chromatography with evaporative light scattering detector: application in the detection of lipid class abnormalities in liver cirrhosis, **Clinica Chimica Acta**, v. 421, p. 132 - 139, 2013.

CHEN, Y.; MA, P.; GUI, S. Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems, **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1 – 12, 2014.

CHONG, J. Y. T.; MULET, X.; KEDDIE, D. J.; WADDINGTON, L.; MUDIE, S. T.; BOYD, B. J.; DRUMMOND, C. J. Novel steric stabilizers for lyotropic liquid crystalline nanoparticles: PEGylated-phytanyl copolymers, **Langmuir**, v. 31, p. 2615 – 2629, 2015.

CHU, D., Development and structure of skin. In: WOLF, K. *et al.* **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.** New York: McGraw-Hill, 2008, p. 57-73.

CHRISTIE, W. W. Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection, **Journal of Lipid Research**, v. 26, p.507 – 512, 1985.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine,** v. 48, p. 749 – 762, 2010.

CLAXTON, N. S.; FELLERS, T. J.; DAVIDSON, M. W. Laser scanning confocal microscopy. In: **Microscopy confocal. Encyclopedia of medical devices and instrumentation**, Editora Wiley, p. 1 – 37, 2006.

COPOLOVICI, D. M.; LANGEL, K.; ERISTE, E.; LANGEL, U. Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications, **ACS Nano**, v. 8, p. 1972 – 1994, 2014.

CULLITY, B. D. **Elements of X-Ray Diffraction,** EUA: Editora Adison-Wesley, 1956.

DAHNIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, **Journal of Controlled Release**, v. 148, p. 135 – 146, 2010.

DAL PIZZOL, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; RESTREPO, J. A. S.; PITTELLA, F.; SILVA, A. H.; SOUZA, P. A.; CAMPOS, A. M.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Influence of surfactant and lipid type on the physicochemical properties and biocompatibility of solid lipid nanoparticles, **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 8581 – 8596, 2014.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R.F. Immune functions of the skin, **Clinical Dermatology**, v. 19, p. 573 – 585, 2001.

DELAVARY, B. M.; VAN DER VEER, W. M.; VAN EGMOND, M.; NIESSEN, F. B.; BEELEN, R. H. J. Macrophages in skin injury and repair, **Immunobiology,** v. 216, p. 753 – 762, 2011.

DEPIERI, L. V.; PRAÇA, F. G. S.; CAMPOS, P. M.; BENTLEY, M. V. L. B. Advances in the bioanalytical study of drug delivery across the skin, **Therapeutic Delivery**, v. 6, p. 571 – 594, 2015.

DESAI, P.; PATOLLA, R. R.; SINGH, M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal delivery, **Molecular Membrane Biology**, v. 27, p. 247 – 259, 2010.

DESAI, P.; SHAH, P. P.; PATLOLLA, R. R.; SINGH, M. Dermal microdialysis technique to evaluate the trafficking of surface-modified lipid nanoparticle upon topical application. **Pharmaceutical Research,** v. 29, p. 2587 – 2600, 2012.

DONG, Y.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science, **International Journal of Pharmaceutics,** v. 417, p. 101 – 111, 2011.

DOZIO, E.; RUSCICA, M.; PASSAFARO, L.; DOGLIOTTI, G.; STEFFANI, L.; PAGANI, A.; DEMARTINI, G.; ESPOSTI, D.; FRASCHINI, F.; MAGNI, P. The natural antioxidante alpha-lipoic acid induces $p27^{Kip1}$-dependent cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells, **European Journal of Pharmacology**, v. 641, p. 29 – 34, 2010.

DUCAT, E.; EVRARD, B.; PEULEN, O.; PIEL, G. Cellular uptake of liposomes monitored by confocal microscopy and flow cytometry, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, p. 469 – 477, 2011.

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J.M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms, **Journal of Investigative Dermatology,** v. 127, p. 514–525, 2007.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; RODRÍGUEZ-CRUZ, I. M.; DOMÍNGUEZ-DELGADO, C. L. Chemical and physical enhancers for transdermal drug delivery. In: GALLELLI, L. (Ed.), **Pharmacology**, InTech, p. 397 – 434, 2012.

EWBIEWENGA, G. P., HAENEN, G.R.M.M., BAST, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. **General Pharmacology,** v. 29, p. 315 – 337, 1997.

FASANO, E.; SERINI, S.; MONDELLA, N.; TROMBINO, S.; CELLENO, L.; LANZA, P.; CITTADINI, A.; CALVIELLO, G. Antioxidant and anti-inflamatory effects of selected natural compounds contained in a dietary supplement on two human immortalized keratinocyte lines, **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1 – 12, 2014.

FERREIRA, D. A.; BENTLEY, M. V. L. B.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K. Cryo-TEM investigation of phase behaviour and aggregate structure in dilute dispersions of monoolein and oleic acid, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, p. 203 – 212, 2006.

FIGUEIREDO, S. A.; VILELA, F. M. P.; SILVA, C. A.; CUNHA, T. M.; SANTOS, M. H.; FONSECA, M. J. V. *In vitro* and *in vivo* photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 65 – 74, 2014.

FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates, **Pharmaceutical Research,** v. 27, p. 796-810, 2010.

FONG, W. K.; HANLEY, T.; BOYD, B. J. Stimuli responsive liquid crystals provide "on-demand" drug delivery *in vitro* and *in vivo*, **Journal of Controlled Release**, v. 135, p. 218 – 226, 2009.

FRANKEL, A. D.; PABO, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus, **Cell**, v. 55, p. 1189 – 1193, 1988.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2ª edição, p. 265–276, 2001.

GIAMPIERI, F.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; MAZZONI, L.; FORBES-HERNANDEZ, T. Y.; GASPARRINI, M.; GONZÀLEZ-PARAMÁS, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; QUILES, J. L.; BOMPADRE, S.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality, **Molecules**, v. 19, p. 7798 – 7816, 2014.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **J Leukoc Biol,** v. 69, p. 513-21, 2001.

GODIC, A.; POLJSAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1 – 6, 2014.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo, ex vivo* and animal models, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1152 – 1161, 2007.

GOUGH, D. R.; COTTER, T. G. Hydrogen peroxide: a Jekyll and hyde signalling molecule, **Cell Death and Disease**, v. 2, p. 1 – 8, 2011.

GORACA, A.; HUK-KOLEGA, H.; PIECHOTA, A.; KLENIEWSKA, P.; CIEJKA, E.; SKIBSKA, B. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential, **Pharmacological Reports**, v. 63, p. 849 – 858, 2011.

GULER, E.; BARLAS, F. B.; YAVUZ, M.; DEMIR, B.; GUMUS, Z. P.; BASPINAR, Y.; COSKUNOL, H.; TIMUR, S. Bio-active nanoemulsions enriched with gold nanoparticle, marigold extract and lipoic acid: in vitro investigations, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 299 – 306, 2014.

GUO, C.; WANG, J.; CAO, F.; LEE, R. J.; ZHAI, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 1032 – 1040, 2010.

GUMUSTAS, M.; OZKAN, S. A., The role of and the place of method validation in drug analysis using electroanalytical techniques, **The Open Analytical Chemistry Journal**, v. 5, p. 1 – 21, 2011.

GUPTA, B.; LEVCHENKO, T. S.; TORCHILIN, V. P. TAT peptide-modified liposomes provide enhanced gene delivery to intracranial human brain tumor xenografts in nude mice, **Oncology Research**, v. 16, p. 351 – 359, 2007.

GUSTAFSSON, J.; LJUSBERG-WAHREN, H.; ALMGREN, M.; LARSSON, K. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by nonionic amphiphilic polymer, **Langmuir**, v. 13, p. 6964 – 6971, 1997.

GUY, R. H.; HADGRAFT, J. Transdermal drug delivery: a simplified pharmacokinetic approach, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 24, 267 – 274, 1985.

GRUNER, S. M., Stability of lyotropic phases wlth curved interfaces, **The Journal of Physical Chemistry**, v. 93, p. 7562 – 7570, 1989.

GRUNWALD, J.; REJTAR, T.; SAWANT, R.; WANG, Z.; TORCHILIN, V. P. TAT peptide and its conjugates: proteolytic stability, **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, p. 1531 – 1537, 2009.

HAN, C. Y.; YUE, L. L.; TAI, L. Y.; ZHOU, L.; LI, X. Y.; XING, G. H.; YANG, X. G.; SUN, M. S.; PAN, W. S. A novel small peptide as an epidermal growth factor receptor targeting ligand for nanodelivery in vitro, **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 1541 – 1549, 2013.

HAN, D.; HANDELMAN, G. E.; PACKER, L. Analysis of reduced and oxidized lipoic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography, **Methods Enzymological**., n. 251, p. 315–325, 1995.

HECK, D. E.; VETRANO, A. M.; MARIANO, T. M.; LASKIN, J. D. UVB light stimulates production of reactive oxygen species unexpected role for catalase, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 22432 – 22436, 2003.

HEITZ, F.; MORRIS, M. C.; DIVITA, G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeuticas, **British Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 195 – 206, 2009.

HERAI, H.; GRATIERI, T.; THOMAZINE, J. A.; BENTLEY, M. V. L. B.; LOPEZ, R. F. V. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations, **International Journal of Pharmaceutics,** v. 329, p. 88 – 93, 2007.

HERMANN, R., NIEBCH, G., BORBE, H.O., FIEGER, H., RUUS, P., NOWAK, H., RIETHMULLER-WINZEN, H., PEUKERT, M. Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic alpha-lipoic acid formulations in healthy volunteers, **European Journal of Pharmaceutical Science**, v.4, p.167–174, 1996.

HO, Y. S.; LAI, C. S.; LIU, H. I.; HO, S. Y.; TAI, C.; PAN, M. H.; WANG, Y. J. Dihydrolipoic acid inhibits skin tumor promotion through anti-inflammation and anti-oxidation, **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 1786 – 1795, 2007.

HOWARD, S. C.; McCORMICK, D. B. High-performance liquid chromatography of lipoic acid and analogues, **Journal of Chromatography A**, v. 208, p. 129 – 131, 1981.

HUSSEIN, M. R. Ultraviolet radiation and skin cancer, **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 32, p. 191 – 205, 2005.

ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH harmonized tripartite guideline). Validation of analytical procedures: methodology, November, 1996.

INOUE, T.; SUDO, M.; YOSHIDA, H.; TODOROKI, K.; NOHTA, H.; YAMAGUCHI, M. Liquid chromatographic determination of polythiols based on pre-column excimer fluorescence derivatization and its application to α-lipoic acid analysis, **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7564 – 7569, 2009.

IVAN, A. L. M.; CAMPANINI, M. Z.; MARTINEZ, R. M.; FERREIRA, V. S.; STEFFEN, V. S.; VICENTINI, F. T. M. C.; VILELA, F. M. P.; MARTINS, F. S.; ZARPELON, A. C.; CUNHA, T. M.; FONSECA, M. J. V.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR, W. A.; CASAGRANDE, R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity *in vitro*, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 124 – 133, 2014.

JAMEEL, N. M.; SHEKHAR, M. A.; VISHWANATH, B. S. α-Lipoic acid: an inhibitor of secretory phospholipase A2 with anti-inflamatory activity, **Life Sciences**, v. 80, p. 146 – 153, 2006.

JEPPS, O. G.; DANCIK, Y.; ANISSIMOV, Y. G.; ROBERTS, M. S. Modeling the human skin barrier – towards a better understanding of dermal absorption, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 152 – 168, 2013.

JORIS, F.; MANSHIAN, B. B.; PEYNSHAERT, K.; DE SMEDT, S. C.; BRAECKMANS, K.; SOENEN, S. J. Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the *in vitro-in vivo* gap, **Chemical Society Reviewes**, v. 42, p. 8339 – 8359, 2013.

KALE, A. A.; TORCHILIN, V. P. Enhanced transfection of tumor cells *in vivo* using "smart" pH-sensitive TAT-modified pegylated liposomes, **Journal of Drug Target**, v. 15, p. 538 – 545, 2007.

KANG, K. C.; JEONG, N. J.; LEE, C. I.; PYO, H. B. Preparation and characterization of SLNs (w/o/w type) contained lipoic acid PEG ester by variation lipid, **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, p. 529 – 536, 2009.

KARADZOVSKA, D.; BROOKS, J. D.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; RIVIERE, J. E. Predicting skin permeability from complex vehicles, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 265 – 277, 2013.

KATAOKA, H. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds, **Journal of Chromatography B**, v. 717, p. 247 – 262, 1998.

KEITH, D. J.; BUTLER, J. A.; BEMER, B.; DIXON, B.; JOHNSON, S.; GARRARD, M.; SUDAKIN, D. L.; CHRISTENSEN, J. M.; PEREIRA, C.; HAGEN, T. M. Age and gender dependent bioavailability of R- and R,S-α-lipoic acid: a pilot study, **Pharmacological Research**, v. 66, p. 199 – 206, 2012.

KHAN, A. Q.; KHAN, R.; QAMAR, W.; LATEEF, A.; ALI, F.; TAHIR, M.; REHMAN, M.; SULTANA, S. Caffeic acid attenuates 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-induced NF-kB and COX-2 expression in mouse skin: Abrogation of oxidative stress, inflammatory responses and proinflammatory cytokine production. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 175–183, 2012.

KHAN, A.; KHAN, M.; IQBAL, Z.; AHMAD, L.; SHAH, Y.; WATSON, D. G. Determination of lipoic acid in human plasma by HPLC-EC using liquid-liquid and solid-phase extraction: method development, validation and optimization of experimental parameters, **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2782 – 2788, 2010.

KHAN, A.; IQBAL, Z.; WATSON, D. G.; KHAN, A.; KHAN, I.; MUHAMMAD, N.; MUHAMMAD, S.; NASIB, H. A.; IQBAL, N.; REHMAN, F. U.; KASHIF, M. Simultaneous determination of lipoic acid (LA) and dihydrolipoic acid (DHLA) in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection, **Journal of Chromatography B,** v. 879, p. 1725-1731, 2011.

KHANBEIGI, R. A.; KUMAR, A.; SADOUKI, F.; LORENZ, C.; FORBES, B.; DAILEY, L. A.; COLLINS, H. The delivered dose: applying particokinetics to *in vitro* investigations of nanoparticles investigations by macrophages, **Journal of Controlled Release**, v. 162, p. 259 – 266, 2012.

KIM, D. H.; JAHN, A.; CHO, S. J.; KIM, J. S.; KI, M. H.; KIM, D. D. Lyotropic liquid crystals systems in drug delivery: a review, **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 45, p. 1 – 11, 2015.

KIM, J. H.; SIM, G. B.; BAE, J. T.; OH, J. Y.; LEE, G. S.; LEE, D. H.; LEE, B. C.; PYO, H. B. Synthesis and anti-melanogenic effects of lipoic acid-polyethylene glycol ester, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 863 – 870, 2008.

KOFUJI, K.; NAKAMURA, M.; ISOBE, T.; MURATA, Y.; KAWASHIMA, S. Stabilization of α-lipoic acid by complex formation with chitosan. **Food Chemistry,** v. 109, p. 167 – 171, 2008.

KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and oxidative stress, **Toxicology**, v. 148, p. 149 – 157.

KOREN, E.; APTE, A.; SAWANT, R. R.; GRUNWALD, J.; TORCHILIN, V. P. Cell-penetrating TAT peptide in drug delivery systems: proteolytic stability requirements, **Drug Delivery**, v. 18, p. 377 – 384, 2011.

KOREN, E.; APTE, A.; JANI, A.; TORCHILIN, V. P. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, v. 160, p. 264 – 273, 2012.

KOREN, E.; TORCHILIN, V. P. Cell penetrating peptides: breaking through to the other side, **Cell Press**, v. 18, p. 385 – 393, 2012.

KÜLKAMP, I. C.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea, **Química Nova,** v. 32, p. 2078 – 2084, 2009.

KROLL, A.; PILLUKAT, M. H.; HAHN, D.; SCHNEKENBURGER, J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. **European Jounal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 370 – 377, 2009.

KRUK, J.; DUCHNIK, E. Oxidative stress and skin diseases: possible role of physical activity, **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p. 561 – 568, 2014.

LADEMANN, J.; PATZELT, A.; RICHTER, H.; SCHANZER, S.; STERRY, W.; FILBRY, A.; BOHNSACK, K.; RIPPKE, F.; MEINKE, M. Comparison of two in vitro models for the analysis of follicular penetration and its prevention by barriers emulsions, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 600 – 604, 2009.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; SCHANZER, S.; KNORR, F.; MEINKE, M.; STERRY, W.; PATZELT, A. Penetration and storage of particles in human skin: perpspectives and safety aspects, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, p. 465 – 468, 2011.

LAGINHA, K. M.; MOASE, E. H.; YU, N.; HUANG, A.; ALLEN, T. M. Bioavailability and therapeutic efficacy of HER2 scFv-targeted liposomal doxorubicin in murine model of HER2-overexpressing breast cancer, **Journal of Drug Targeting**, v. 16, p. 605 – 610, 2008.

LAMBERS, H.; PIESSENS, S.; BLOEM, A.; PRONK, H.; FINKEL, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora, **International Journal of Cosmetic Sciences,** v. 28, p. 359 – 370, 2006.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, p. 12 – 21, 2013.

LARA, M. G.; BENTLEY, M. V. L. B.; COLLETT, J. H. In vitro drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 241–250, 2005.

LARSSON, K. Cubic lipid-water phases – structures and biomembrane aspects, **Journal of Physical Chemistry**, v. 93, p. 7304 – 7314, 1989.

LEBLEU, B.; MOULTON, H. M.; ABES, R.; IVANOVA, G. D.; ABES, S.; STEIN, D. A.; IVERSEN, P. L.; ARZUMANOV, A. A.; GAIT, M. J. Cell penetrating peptides conjugates of steric block conjugates oligonucleotides, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 517 – 529, 2008.

LI, G.; FU, J.; ZHAO, Y.; JI, K.; LUAN, T.; ZANG, B. Alpha-lipoic acid exerts anti-inflamatory effects on lipopolysaccharide-stimulated rat mesangial cells via inhibition of nuclear factor kappa B (NF-κβ) signaling pathway, **Inflammation**, v. 38, p. 510 – 519, 2015.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; WACHTEL, E.; SHOHAM, G.; GARTI, N. An HII liquid crystal-based delivery system for cyclosporin A: physical characterization, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 308, p. 514 – 524, 2007.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: Drug delivery and crystallization applications. **Journal of Colloid Interface Sciences,** v. 356, p. 375-386, 2011.

LINDBLOM, G.; RILFORS, L. Cubic phase and isotropic structures formed by membrane lipids-possible biological relevance, **Biochimica Biophysica Acta,** v. 988, p. 221 – 256, 1989.

LIU, X.; TESTA, B.; FAHR, A. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation, **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 962 – 977, 2011.

LOHAN, S. B.; BAUERSACHS, S.; AHLBERG, S.; BAISAENG, N.; KECK, C. M.; MÜLLER, R. H.; WITTE, E.; WOLK, K.; HACKBARTH, S.; RÖDER, B.; LADEMANN, J.; MEINKE, M. C. Ultra-small lipid nanoparticles promote the penetration of coenzyme Q10 in skin cells and counteract oxidative stress, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 89, p. 201 – 207, 2015.

LOO, A. E. K.; HALLIWELL, B. Effects of hydrogen peroxide in a keratinocyte-fibroblast co-culture model of wound healing, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 423, p. 253 – 258, 2012.

LOPES, L. B.; LOPES, J. L. C.; OLIVEIRA, D. C. R.; THOMAZINE, J. A.; FANTINI, M. C. A.; COLLETT, J. H.; BENTLEY, M.V.L.B. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: characterization and study of in vitro and in vivo delivery, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 146-155, 2006a.

LOPES, L. B.; FERREIRA, D. A.; PAULA, D.; GARCIA, M. T. J.; THOMAZINI, J. A.; FANTINI, M. C. A.; BENTLEY, M. V. L. B. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: in vitro and in vivo skin penetration of cyclosporin A, **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 1332 – 1342, 2006b.

LOPES, L. B.; FURNISH, E.; KOMALAVILAS, P.; SEAL, B. L.; PANITCH, A.; BENTLEY, M. V. L. B.; BROPHY, C. M. Enhanced skin penetration of P20 phosphopeptide using protein transduction domains, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 441 – 445, 2008.

LOPES, L. B.; SPERETTA, F. F. F.; BENTLEY, M. V. L. B. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 209 – 215, 2007.

LUNDBERG, P.; LANGEL U. A brief introduction to cell-penetrating peptides, **Journal of Molecular Recognition**, v. 16, p. 227 – 233, 2003.

MAI, J. C.; SHEN, H.; WATKINS, S. C.; CHENG, T.; ROBBINS, P. D. Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 30208 – 30218, 2002.

MARDER, S. R.; ARMITAGE, B.; YANG, D. Cubic liquid-crystalline nanoparticles, **Angewandte Chemie International Edition in English,** v. 43, p. 4402 – 4409, 2004.

MARTÍN, I.; TEIXIDÓ, M.; GIRALT, E. Building cell selectivity into CPP-mediated strategies, **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 1456 – 1490, 2010.

MARUYAMA, K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, p. 161 – 169, 2011.

MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects, **Journal of Dermatological Science**, v. 58, p. 85 – 90, 2010.

MASUI, H.; CASTRO, L.; MENDELSON, J. Consumption of EGF by A431 cells; evidence for receptor recycling, **The Journal of Cell Biology**, v. 120, p. 85 – 93, 1993.

MATSUGO, S.; BITO, T.; KONISHI, T. Photochemical stability of lipoic acid and its impact on skin ageing, **Free Radical Research,** v. 45, p. 918 – 924, 2011.

MCGRATH, J. A.; EADY, R. A. J.; POPE, F. M. Anatomy and organization of human skin. In: BURNS, T. *et al.* **Rook's Textbook of Dermatology.** Massachussets: Blackwell Science, 2004, p. 47 – 52.

MENDOZA, A.E.H.; RAYO, M.; MOLLINEDO, F.; BLANCO-PRIETO, M.J. Lipid nanoparticles for alkyl lysophospholipid edelfosine encapsulation: development and in vitro characterization, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 68, p. 207-213, 2008.

MICHNIAK-KOHN, B. B.; WERTZ, P. W.; AL-KHALILI, M.; MEIDAN, V. M. Skin: Physiology and Penetration Pathways. In: ROSEN, M. R. (Ed.), **Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products.** William Andrew Publishing Inc., 2005, p. 77 – 100.

MILAK, S.; ZIMMER, A. Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, p. 569 – 587, 2015.

MILLER, C. A.; GHOSH, O. Possible mechanism for the origin of lamellar liquid crystalline phases of low surfactant content and their breakup to form isotropic phases, **Langmuir**, v. 2, p. 321 – 329, 1986.

MOJSIEWICZ-PIENKOWSKA, K. On the issue of characteristic evaporative light scattering detector response, **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 89 – 94, 2009.

MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumours: Old stories and new ideas, **European Journal of Cancer,** v. 46, p. 235 – 244, 2006.

MUNYENDO, W. L. L.; LV, H.; BENZA-INGOULA, H.; BARAZA, L. D.; ZHOU, J. Cell penetrating peptides in the delivery of biopharmaceuticals, **Biomolecules**, v. 2, p. 187 – 202, 2012.

MUSTAFA, T.; WATANABE, F.; MONROE, W.; MAHMOOD, M.; XU, Y.; SAEED, L. M.; KARMAKAR, A.; CASCIANO, D.; ALI, S.; BIRIS, A. S. Impacto of gold nanoparticle concentration on their cellular uptake by MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells as analyzed by transmission electron microscopy, **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology,** v. 2, p. 1 – 7, 2011.

NAKANO, M.; TESHIGAWARA, T.; SUGITA, A.; LEESAJAKUL, W.; TANIGUCHI, A.; KAMO, T.; MATSUOKA, H.; HANDA, T. Dispersions of liquid crystalline phases of the monoolein/oleic acid/pluronic F127 system, **Langmuir**, v. 18, p. 9283 – 9288, 2002.

NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function, **Pharmaceutical Science Technology Today**, v. 3, p. 318 – 326, 2000.

NASROLLAHI, S. A.; TAGHIBIGLOU, C.; AZIZI, E.; FARBOUD, E. S. Cell-penetrating peptides as a novel transdermal drug delivery system, **Chemical Biology & Drug Design**, v. 80, p. 639 – 646, 2012.

N`DA, D. D. Prodrugs strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs. **Molecules**, v. 19, p. 20780 – 20807, 2014.

NEL, A. E.; MÄDLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E. M. V.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESSIG, F.; CASTRANOVA, V.; THOMPSON, M.; Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, **Nature Biomaterials**, v. 8, p. 543 – 557, 2009.

NG, K. W.; LAU, W. M. Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration. In: DRAGICEVIC-CURIC, N.; MAIBACH, H. I. (Ed.), **Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects**. Editora Springer, 2015, p. 3 – 10.

NICOLAOU, A.; PILKINGTON, S. M.; RHODES, L. E. Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids, **Chemistry and Physics Lipids**, v. 164, p. 535 – 543, 2011.

NILSSON, C.; OSTERGAARD, J.; LARSEN, S. W.; LARSEN, C.; URTTI, A.; YAGHMUR, A. PEGylation of phylantriol-based lyotropic liquid crystalline particles – the effect of lipid composition, PEG chain length, and temperature on the internal nanostructure, **Langmuir**, v. 30, p. 6398 – 6407, 2014.

PACKER, L.; CADENAS, E. Lipoic acid: energy metabolismo and redox regulation of transcription and cell signaling, **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, p. 26 – 32, 2011.

PARK, K.K.; PARK, J.K.; JUNG, Y.J.; CHUNG, W.Y. Inhibitory effects of chlorophyllin, hemin and tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin on oxidative DNA damage and mouse skin inflammation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate as a possible anti-tumor promoting mechanism, **Mutation Research,** v. 542, p. 89 – 97, 2003.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170 – 184, 2009.

PAUDEL, K. S.; MILEWSKI, M.; SWADLEY, C. L.; BRODGEN, N. K.; GHOSH, P.; STINCHCOMB, A. L. Challenges and opportunities in dermal/ transdermal delivery, **Therapeutic Delivery**, v. 1, p. 109 – 131, 2010.

PERCHE, F.; TORCHILIN, V. P. Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting, **Journal of Drug Delivery**, v. 2013, p. 1 – 32, 2013.

PETRILLI, R.; PRAÇA, F. S. G.; CAROLLO, A. R. H.; MEDINA, W. S. G.; OLIVEIRA, K. T.; FANTINI, M. C. A.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y.; BENTLEY, M. V. L. B.; Nanoparticles of lyotropic liquid crystals: a novel strategy for the topical delivery of a chlorin derivative for photodynamic therapy of skin cancer, **Current Nanoscience**, v. 9, p. 434 – 441, 2013.

PHELPS, J.; BENTLEY, M. V. L. B.; LOPES, L. B. *In situ* gelling hexagonal phases for sustained release of an addiction drug, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, p. 391 – 398, 2011.

PODDA, M.; TRITSCHLER, H. J.; ULRICH, H.; PACKER, L. α-Lipoic acid supplementation prevents symptoms of vitamin E deficiency, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 204, p. 98 – 104, 1994.

PODDA, M.; RALLIS, M.; TRABER, M.G.; PACKER, L.; MAIBACH, H.I. Kinetic study of cutaneous and subcutaneous distribution following topical application of [7,8-^{14}C]rac-α-lipoic acid onto hairless mice, **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 627 – 633,1996.

POTTS, R. O.; GUY, R. H. Predicting skin permeability, **Pharmaceutical Research**, v. 9, 663 – 669, 1992.

POZZI, D.; COLAPICCHIONI, V.; CARACCIOLO, G.; PIOVESANA, S.; CAPRIOTTI, A. L.; PALCHETTI, S.; DE GROSSI, S.; RICCIOLI, A.; AMENITSCH, H.; LAGANA, A. Effect of polyethileneglycol (PEG) chain length on the bio-nano interactions between PEGylated lipid nanoparticles and lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells, **Nanoscale**, v. 6, p. 2782 – 2792, 2014.

PRAÇA, F. S. G., BENTLEY, M. V. L. B., LARA, M. G., PIERRE, M. B. R. Celecoxib determination in different layers of skin by a newly developed and validated HPLC - UV method, **Biomedical Chromatography,** v. 25, p. 1237 – 1244, 2011.

PRAÇA, F. S. G.; MEDINA, W. S. G.; PETRILLI, R.; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid Crystal nanodispersions enable the cutaneous delivery of photosensitizer for topical PDT: fluorescence microscopy study of skin penetration, **Current Nanoscience**, v. 8, p. 535 – 540, 2012.

REISSMANN, S. Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides, **Journal of Peptide Science**, v. 20, p.760 – 784, 2014.

ROCHETTE, L.; GHIBU, S.; RICHARD, C.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Direct and indirect antioxidant properties of α-lipoic acid and therapeutic potential, **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, p. 114 – 125, 2013.

ROSSETTI, F. C.; FANTINI, M. C. A. ; CAROLLO, A. R. H.; TEDESCO, A. C.; BENTLEY, M.V. L. B. Analysis of liquid crystalline nanoparticles by small angle X-ray diffraction: Evaluation of drug and pharmaceutical additives influence on the internal structure. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 2849-2857, 2011.

ROSSETTI, F. C.; DEPIERI, L. V.; BENTLEY, M. V. L. B. Confocal laser scanning microscopy as a tool for the investigation of skin drug delivery systems and diagnosis of skin disorders. In: LAGALI, N. (Ed.), Confocal laser microscopy – principles and applications in medicine, biology and the food sicences, Editora INTECH, 2013, p. 99 – 140.

ROTHBARD, J. B.; GARLINGTON, S.; LIN, Q.; KIRSHBERG, T.; KREIDER, E.; MCGRANE, P. L.; WENDER, P. A.; KHAVARI, P. A. Conjugation of arginine oligomers to cyclosporine A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation, **Nature Medicine**, v. 6, p. 1253 – 1257, 2000.

RYU, B.; AHN , B. N.; KANG, K. H.; KIM, Y. S.; LI, Y. X.; KONG, C. S.; KIM, S. K.; KIM, D. G. Dioxinodehydroeckol protects humam keratinocyte cells from UVB-induced apoptosis modulated by related genes Bax/Bcl-2 and caspase pathway, **Journal of photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, p. 352 – 357, 2015.

SAPTARSHI, S. R.; DUSCHL, A.; LOPATA, A. L. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. **Journal of Nanobiotechnology,** v. 11, p. 11-26, 2013.

SARTOR, M. **Dynamic Light Scattering.** Disponível em: <http://physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics_173_273/dynamic_light_scattering_03.pdf>. Acesso em: 12 de janeiro, 2014.

SAULNIER, P.; ANTON, N.; HEURTAULT, B.; BENOIT, J. P. Liquid crystals and emulsions in the formulation of drug carriers, **Comptes Rendus Chimie,** v. 11, p. 221 – 228, 2008.

SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Design and synthesis of novel functional lipid-based bionconjugates for drug delivery and other applications. In: Sonny S. Mark (ed.), Bioconjugation protocols: strategies and methods, Methods in molecular biology, v. 751, Editora Springer, p. 357 – 378, 2011.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHAEFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 427 – 443, 2007.

SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Physics Reports, Amsterdam**, v. 324, p.107-269, 2000.

SONG, S.; LIU, D.; PENG, J.; DENG, H.; GUO, Y.; XU, L. X.; MILLER, A. D.; XU, Y. Novel peptide ligand directs liposomes toward EGF-R high expressing cancer cells *in vitro* and *in vivo*, **The FASEB Journal**, v. 23, p. 1396 – 1404, 2009.

STOJILJKOVIC, D.; PAVLOVIC, D.; ARSIC, I. Oxidative stress, skin aging and antioxidant therapy, **Acta Facultatis Medicae Naissensis**, v. 31, p. 207 – 217, 2014.

STOLYWHO, A.; COLIN, H.; MARTIN, M.; GUIOCHON, G. Study of the qualitative and quantitative properties of the light-scattering detector, **Journal of Chromatography**, v. 288, p. 253-275, 1984.

SUBRIZI, A.; TUOMINEN, E.; BUNKER, A.; RÓG, T.; ANTOPOLSKY, M.; URTTI, A. TAT(48-60) peptide amino acid sequence is not unique in its cell penetrating properties and cell-surface glycosaminoglycans inhibit its cellular uptake, **Journal of Controlled Release,** v. 158, p. 277-285, 2012.

SUK, J. S.; XU, Q.; KIM, N.; HANES, J.; ENSIGN, L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery, **Advanced Drug Delivery Reviews**, *in press*, 2015.

SWARNAKAR, N. K.; THANKI, K.; JAIN, S. Enhanced antitumor efficacy and counterfeited cardiotoxicity of combinatorial oral therapy using Doxorubicin- and Coenzyme Q10-liquid crystalline nanoparticles in comparison with intravenous Adriamycin, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, p. 1231 – 1241, 2014.

TANAKA, K.; ASAMITSU, K.; URANISHI, H.; IDDAMALGODA, A.; ITO, K.; KOJIMA, H.; OKAMOTO, T. Protecting skin photoaging by NF-κβ inhibitor, **Current Drug Metabolism**, v. 11, p. 431 – 435, 2010.

TEICHERT, J.; PREISS, R. Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications,** v. 672, p. 277-281, 1995.

TEICHERT, J.; PREISS, R. High-performance liquid chromatography assay for α-lipoic acid and five of its metabolites in human plasma and urine. **Journal of Chromatography B,** v. 769, p. 269-281, 2002.

TEICHERT, J.; TUEMMERS, T.; ACHENBACH, H.; PREISS, C.; HERMANN, R.; RUUS, P.; PREISS, R. Pharmacokinetics of alfa -lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease**. J. Clin. Pharmacol**., v. 45, p. 313–328, 2005.

TERRA, V. A.; SOUZA-NETO, F. P.; PEREIRA, R. C.; SILVA, T. N. X.; COSTA, A. C. C.; LUIZ, R. C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. Time-dependent reactive species formation and oxidative stress damage in the skin after UVB irradiation, **Journal of photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 109, p. 34 – 41, 2012.

THE MERCK INDEX, 12ª edição, New Jersey: Merck Research Laboratories - Merck & Co, 1996.

THOMAS, S.; VIEIRA, C. S.; HASS, M. A.; LOPES, L. B. Stability, cutaneous delivery, and antioxidant potential of lipoic acid and α-tocopherol codrug incorporated in microemulsions, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 2530 – 2538, 2014.

TORCHILIN, V. P.; LEVCHENKO, T. S.; LUKYANOV, A. N.; KHAW, B. A.; KLIBANOV, A. L.; RAMMOHAN, R.; SAMOKHIN, G. P.; WHITEMAN, K. R. pNitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylgroups, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1511, p. 397 – 411, 2001.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 431 – 444, 2009.

TORCHILIN, V. P. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 131 – 135, 2011.

TRAUER, S.; RICHTER, H.; KUNTSCHE, J.; BÜTTEMEYER, R.; LIEBSCH, M.; LINSCHEID, M.; FAHR, A.; SCHÄFER-KORTING, M.; LADEMANN, J.; PATZELT, A. Influence of massage and occlusion on the ex vivo skin penetration of rigid liposomes and invasomes, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, p. 301 – 306, 2014.

TRATHNIGG, B.; KOLLROSER, M. Liquid chromatography of polyethers using universal detectors V. Quantitative aspects in the analysis of low-molecular-mass poly(ethylene glycol)s and their derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector, **Journal of Chromatography A**, v. 768, p. 223 – 238, 1997.

TRESSET, G. The multiple faces of self-assembled lipidic systems, **PMC Biophysics**, v. 2, p. 1 – 25, 2009.

TSAI, F. J.; WANG, Y. D.; CHEN, C. C.; HSIEH, C.; CHENG, Z. J.; WU, Y. J. Evaluation of the antioxidative capability of commonly used antioxidants in dermocosmetics by *in vivo* detection of protein carbonylation in human stratum corneum, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 112, p. 7 – 15, 2012.

TSUJI-NAITO, K.; ISHIKURA, S.; AKAGAWA, M.; SAEKI, H. α-Lipoic acid induces collagen biosynthesis involving prolyl hydroxylase expression via activation of TGF-β-Smad signaling in human dermal fibroblasts, **Connective Tissue Research**, v. 51, p. 378 – 387, 2010.

TYLE, P. Liquid Crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: Polymer and aggregate systems**, New York: VCH Publishers, p.125 – 162, 1989.

URIBE, P.; GONZALEZ, S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-therapy, **Pathology – Research and Practice**, v. 207, p. 337 – 342, 2011.

VAN SMEDEN, J.; JANSSENS, M.; GOORIS, G. S.; BOUWSTRA, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1841, p. 295 – 313, 2014.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions, **Small**, v. 6, p. 12 – 21, 2009.

VICENTINI, F. T. M. C.; DEPIERI, L. V.; POLIZELLO, A. C. M.; DEL CIAMPO, J. O.; SPADARO, A. C. C.; FANTINI, M. C. A.; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, p. 16 – 24, 2013.

VICENTINI, F. T. M. C.; SIMI, T. R. M.; DEL CIAMPO, J. O.; WOLGA, N. O.; PITOL, D. L.; IYOMASA, M. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; FONSECA, M. J. V. Quercetin in w/o microemulsion: *in vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 948 – 957, 2008.

VILELA, F. M. P.; FONSECA, Y. M.; VICENTINI, F. T. M. C.; FONSECA, M. J. V. Sunscreen protection against ultraviolet-indiced oxidative stress: evaluation of reduced glutathione levels, metalloproteinases secretion, and myeloperoxidase activity, **Pharmazie**, v. 68, p. 1 – 5, 2013.

VIVÈS, E.; SCHMIDT, J.; PÈLEGRIN, A. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1786, p. 126 – 138, 2008.

WADIA, J. S.; STAN, R. V.; DOWDY, S. F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis, **Nature Medicine**, v. 10, p. 310–315, 2004.

WAGENER, F. A. D. T. G.; CARELS, C. E.; LUNDVIG, D. M. S. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 9126 – 9167, 2013.

WALTERSCHEID, J. P.; NIGHIEM, D. X.; ULLRICH, S. E. Determining the role of cytokines in UV-induced immunomodulation, **Methods**, v. 28, p. 71 – 78, 2002.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control**, v. 34, p. S98 – S110, 2006.

WILLIAMS, A. C. Transdermal and topical drug delivery. London: Pharmaceutical Press, 242p, 2003.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Chemical Permeation Enhacement. In: TOUITOU, E.; BARRY,B. W. **Enhancement in Drug Delivery.** Nova Iorque: CRC Press, p. 233 – 254, 2007.

WOLK, K.; WITTE, K.; SABAT, R. Interleukin-28 and interleukin-29: novel regulators of skin biology, **Journal of Interferon & Citokine Research**, v. 30, p. 617 – 628, 2010.

WU, H.; ZHU, L.; TORCHILIN, V. P. pH-sensitive poly(histidine)-PEG/DSPE-PEG co-polymer micelles for cytosolic delivery, **Biomaterials**, v. 34, p. 1213 – 1222, 2013.

XIA, Y.; ZWEIER, J.L. Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. **Analytical Biochemistry,** v. 245, v.1, p. 93 – 96, 1997.

YAGHMUR, A.; GLATTER, O. Characterization and potential applicattions of nanostructured aqueous dispersions, **Advances in Colloidand Interface Science**, v. 147 – 148, p. 333 – 342, 2009.

YAMADA, T.; HASHIDA, K.; TAKARADA-IEMATA, M.; MATSUGO, S.; HORI, O. α-Lipoic acid (LA) enantiomers protect SH-SY5Y cells against glutathione depletion, **Neurochemistry International**, v. 59, p. 1003 – 1009, 2011.

YANG, Y.; KALLURI, H.; BANGA, A. K. Effects of chemical and physical enhancement techniques on transdermal delivery of cyanocobalamin (vitamin B12) *in vitro*, **Pharmaceutics**, v. 3, p. 474 – 484, 2011.

ZENG, N.; HU, Q.; LIU, Z.; GAO, X.; HU, R.; SONG, Q.; GU, G.; XIA, H.; YAO, L.; PANG, Z.; JIANG, X.; CHEN, J.; FANG, L. Preparation and characterization of paclitaxel-loaded DSPE-PEG-liquid crystalline nanoparticles (LCNPs) for improved bioavailability, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 424, p. 58 – 66, 2012.

ZHAI, J.; WADDINGTON, L.; WOOSTER, T. J.; AGUILAR, M. I.; BOYD, B. J. Revisiting β-casein as a stabilizer for liquid crystalline nanostructured particles, **Langmuir**, v. 27, p. 14757 – 14766, 2011.

ZIEGLER, A. Thermodynamic studies and binding mechanism of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans, **Advanced Drug Delivery,** v. 60, p. 580-597, 2008.