

Mariana Borges de Araújo dos Santos

**Avaliação da eficácia e segurança de formulações tópicas
contendo ativos moduladores das enzimas LOX**

Orientador: Prof. Doutor Nuno Ricardo de Almeida Saraiva

Coorientadora: Prof^a. Doutora Catarina Fialho Rosado

UNIVERSIDADE LÚSOFONA CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

LISBOA

2023

Mariana Borges de Araújo dos Santos

**Avaliação da eficácia e segurança de formulações tópicas
contendo ativos moduladores das enzimas LOX**

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona no dia 19 de Outubro de 2023, perante o
júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº. 355/2021, de 15 de
dezembro de 2021, com a seguinte composição:
Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof^ª. Doutora Ana Sofia Fernandes

Orientador:

Prof. Doutor Nuno Ricardo de Almeida Saraiva

UNIVERSIDADE LÚSOFONA CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

LISBOA

2023

Agradecimentos

O meu trajeto académico começou quando optei por fazer um curso de ensino superior um país diferente da minha origem, portanto, envolveu uma mudança de país, diferença cultural e, embora pouca, uma diferença na língua e o dialeto.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para a minha formação durante o curso. Ao Professor Doutor Nuno Saraiva agradeço pelo apoio fornecido, por demonstrar-se sempre disponível, e pelas palavras de motivação. À Professora Doutora Catarina Rosado e à Professora Doutora Catarina Leite agradeço pelo apoio em laboratório, profissionalismo e palavras de incentivo.

Aos meus companheiros de curso, agradeço pela receção e integração. Dentre estes 5 anos destacaram-se a Carlota, Vanessa, Inês, Marta e Pedros, obrigada pela vossa amizade, pelos anos de associativismo e pelo convívio além da faculdade.

Aos meus pais, obrigada pela confiança em mim depositada, pela motivação fornecida por realizar faculdade longe de casa, e também pelo acolhimento quando eu regressava. Espero ter dado orgulho aos senhores por ser a primeira da família a ter um diploma. As minhas irmãs Sara e Rebeca, agradeço pela confiança e vosso apoio e votos de muito sucesso, espero terem a possibilidade de uma experiência académica excecional como eu tive.

A minha pessoa preferida de sempre, João, eu agradeço por surgir na minha vida no momento certo, por ter se tornado a minha fortaleza, a minha fonte de inspiração, por todos os momentos de descontração, motivação e assertividade. Agradeço por me lembrar que eu tinha todos os requisitos necessários para realizar este percurso com sucesso, mesmo eu duvidando de mim. Assim como você foi tudo e mais um pouco para mim nesta jornada académica, profissional e pessoal, eu quero ser para a sua.

A Cleidiane, a minha amiga que surgiu durante esta jornada, eu agradeço pelos conselhos e motivação, o seu positivismo e garra me encorajaram de uma forma inesquecível, a sua amizade é valiosa.

Agradeço a todos que fizeram parte deste percurso e que contribuíram o mínimo que seja.

Resumo

A lysyl oxidase (LOX) e as lysyl oxidase like (LOXL), são enzimas participantes no processo de regeneração cutânea. A nanotecnologia permite formular sistemas de veiculação eficientes para aplicação tópica como os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLCs). O presente estudo teve como objetivo explorar a aplicação de compostos moduladores das enzimas LOXL2 para o controlo da regeneração cutânea.

Para tal, foi avaliado o impacto de compostos inibidores da LOXL2 identificados pelo grupo CBIOS (8 α ,9 α -epoxycoleon-U-quinone - EPCU e Pimarane 7, 15-isopimaradien-19-ol – PN1) na viabilidade de queratinócitos humanos. Foi testado o impacto de PN1, EPCU e BAPN na viabilidade de queratinócitos humanos (células HaCaT), recorrendo ao método de Cristal Violeta. O IC₅₀ de inibição da LOXL2 de EPCU é de 58,3 μ M, e no presente estudo os queratinócitos submetidos a concentração de 50 nM sofreram uma redução significativa da sua viabilidade. Relativamente ao PN1, o seu IC₅₀ de inibição da LOXL2 é de 104,4 μ M, e a partir dos resultados obtidos neste estudo com a concentração máxima de 200 nM, o composto não impacta a viabilidade celular, sendo este promissor para estudos futuros. Adicionalmente, foi verificada a possibilidade de veiculação um composto inibidor das LOXL2 comercialmente disponível, o β -aminopropionitrilo (BAPN) através de NLCs. Relativamente à caracterização das NLCs com e sem BAPN, o diâmetro hidrodinâmico (D_h) das NLCs sem BAPN foram menores do que das NLCs com ativo, o seu índice de polidispersão (PDI) não ultrapassou 0,3 em ambos os casos, e o potencial zeta situou-se entre -18 e -22 mV. As NLCs com BAPN apresentaram um valor de pH mais alto em relação às sem BAPN. Os testes de avaliação da estabilidade demonstraram que as formulações se mantiveram inalteradas. A segurança e eficácia das NLCs sem BAPN foi testada num grupo de voluntários humanos. No que diz respeito às medições de parâmetros cutâneos após aplicação tópica, os parâmetros perda transépidermica de água (PTEA), eritema e hidratação revelaram que as NLCs têm boa compatibilidade, mas o aumento da hidratação foi pequeno. O trabalho permitiu concluir que as concentrações máximas dos inibidores testados que não induzem alterações na viabilidade das células são respetivamente: 500 nM para BAPN, 20 nM para EPCU e 200 nM para PN1. O BAPN foi incorporado em NLC, mas por ser ionizado reduziu o seu potencial zeta que poderá condicionar a estabilidade ao longo do tempo. As NLCs podem ser consideradas compatíveis com a pele. Estes dados evidenciam o potencial destes compostos como possíveis moduladores do processo de cicatrização, que poderão ser veiculados por NLCs.

Palavras-chave: células HaCat, BAPN, viabilidade celular, NLC, regeneração cutânea

Abstract

Lysyl oxidase (LOX) and lysyl oxidase like (LOXL) are enzymes involved in the skin regeneration process. Nanotechnology makes it possible to formulate efficient delivery systems for topical application such as nanostructured lipid carriers (NLC). The present study aimed to explore the application of compounds that modulate LOXL2 enzymes to control skin regeneration. For this purpose, the impact of LOXL2 inhibitor compounds identified by the CBIOS group (8 α ,9 α -epoxycoleon-U-quinone - EPCU and Pimarane 7, 15-isopimaradien-19-ol - PN1) on the viability of human keratinocytes was evaluated. The impact of PN1, EPCU and BAPN on the viability of human keratinocytes (HaCaT cells) was tested using the Crystal Violet method. The IC₅₀ of LOXL2 inhibition of EPCU is 58.3 μ M, and in the present study, keratinocytes subjected to a concentration of 50 nM suffered a significant reduction in their viability. Regarding PN1, its LOXL2 inhibition IC₅₀ is 104.4 μ M, and from the results obtained in this study, with a maximum concentration of 200 nM, the compound does not impact cell viability, which is promising for future studies. In addition, the carrier compatibility of a commercially available LOXL2 inhibitor compound, β -aminopropionitrile (BAPN) was verified by NLC. Regarding the characterization of nanoparticles (NPs) with and without BAPN, the hydrodynamic diameter (Dh) indicates that the NPs without BAPN were smaller, their polydispersion index (PDI) did not exceed 0.3 in both, and the zeta potential was situated between -18 and -22 mV. NPs with BAPN have a higher pH value compared to NPs without BAPN, and this value slightly increased with storage time. Stability evaluation tests demonstrated that the formulations remained unchanged. The safety and efficacy of NPs without BAPN was tested in a group of human volunteers. With regard to the measurements of skin parameters after topical application, the parameters transepidermal water loss (TEWL), erythema and hydration revealed that the NPs have good compatibility, but the increase in hydration was small. The work led to the conclusion that the maximum concentrations of the tested inhibitors that do not induce changes in cell viability are respectively: 500 nM for BAPN, 20 nM for EPCU and 200 nM for PN1. BAPN was successfully incorporated in NLC formulation, but because it is ionized it reduces its zeta potential, which may have an impact in stability over time. NPs can be considered compatible with the skin. These data show the potential of these compounds as possible modulators of the healing process, which may be conveyed by NPs.

Keywords: HaCat cells, BAPN, cell viability, NLC, skin regeneration

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

BAPN - β -aminopropionitrilo
CV – Cristal Violeta
 D_h - Diâmetro Hidrodinâmico
DMEM - Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO - Dimethyl Sulfoxide
EPCU - 8 α ,9 α -epoxycoleon-U-quinone
FBS - Soro Fetal Bovino
FGF - *Fibroblast Growth Factor*
HaCaT - Células de Queratinócitos Humanos
HLB - Hydrophilic–Lipophilic Balance
LOX - *Lysyl Oxidase*
LOXL - *Lysyl Oxidase Like*
MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NLC - Transportadores Lipídicos Nanoestruturados
NP – Nanopartícula
PBS - Tampão Fosfato-Salino
PDGF - *Platelet-Derived Growth Factor*
PDI – Índice de Polidispersão
pH – Potencial Hidrogeniônico
PN1 - Pimarane 7, 15-isopimaradien-19-ol
PTEA - Perda Transépidermica da Água
rhLOXL2 - *Post-translational modifications of recombinant human lysyl oxidase-like 2*
RNA - Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
RPM – Rotações por Minuto
SA – Substância Ativa
SARS-CoV-2 - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
SC - *Stratum Corneum*
SLN - Solid Lipid Nanoparticle
TGF - *Transforming Growth Factor*
UV - Ultravioleta
VC - Viabilidade Celular
VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*
XTT - 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida)

Índice Geral

Capítulo 1: Introdução Geral	11
1 A pele	12
1.1 Caracterização estrutural e funcional da pele	12
1.1.1 Processo de cicatrização de feridas e o papel das enzimas LOX	15
1.2 Compostos moduladores da enzima LOXL2	18
1.3 Bioatividade dos compostos inibidores das enzimas LOXL2	18
1.4 Modelo de estudo da estrutura dérmica	19
1.5 Estratégias nanotecnológicas aplicadas a formulações tópicas	19
1.5.1 Vantagens e desvantagens da veiculação tópica	21
1.5.2 Características físico-químicas para formular um sistema de veiculação tópica	21
1.5.3 Tipos de sistemas de veiculação que envolvem nanopartículas	22
1.5.4 Transportadores Lipídicos Nanoestruturados	23
1.6. Objetivo	24
Capítulo 2: Materiais e Métodos	26
2.1 Cultura de células HaCat	27
2.2 Método de Avaliação da viabilidade celular com o Cristal Violeta	28
2.3 Processo de produção de NLC e veiculação de BAPN	29
2.4 Caracterização da NLC	29
2.4.1 Características organoléticas e determinação do pH	29
2.4.2 Determinação do D_h , PDI e Potencial Zeta	30
2.4.3 Testes de estabilidade das NLC	30
2.5 Avaliação do impacto da aplicação de NLC na pele	30
2.5.1 Avaliação de segurança da NLC	31
2.5.2 Avaliação de eficácia da NLC	31
Capítulo 3: Resultados e Discussão	33
3.1 Avaliação do Impacto na Viabilidade celular com o Cristal Violeta nos compostos inibitórios das LOX	34

3.2 Avaliação das características organoléticas, D_h , PDI, pH e Potencial Zeta	37
3.3 Ensaios de estabilidade acelerada	40
3.4 Avaliação da segurança e eficácia das NLC	42
Conclusão	48
Referências Bibliográficas	50

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura da pele e seus anexos.....	14
Figura 2 - Estratos da epiderme e papila dérmica	15
Figura 3 - Placa de 96 poços com compostos a testar e os controlos positivo e negativo.....	27
Figura 4 - Impacto do BAPN na viabilidade de células HaCaT	33
Figura 5 - Impacto do EPCU na viabilidade de células HaCaT	34
Figura 6 - Impacto do PN1 na viabilidade células HaCaT	35
Figura 7 - Evolução do D_h das NLCs ao longo do tempo.....	37
Figura 8 - Evolução do PDI das NLCs ao longo do tempo	38
Figura 9 - Evolução do pH das NLCs ao longo do tempo.....	38
Figura 10 - Evolução do potencial zeta das NLCS ao longo do tempo.	39
Figura 11 - Teste de estabilidade acelerada com aplicação de teste mecânico. (A) NLC sem BAPN antes da aplicação de stress mecânico. (B) NLC sem BAPN depois da aplicação de stress mecânico. (C) NLC com BAPN antes da aplicação de stress mecânico. (D) NLC com BAPN depois da aplicação de stress mecânico.....	40
Figura 12 - NLC sem BAPN depois da aplicação do teste de stress térmico	41
Figura 13 - Avaliação do impacto na PTEA das NLC	42
Figura 14 - Avaliação do impacto na hidratação das NLC	43
Figura 15 - Avaliação do impacto no eritema das NLC.....	43
Figura 16 - Avaliação do impacto da PTEA no estudo de eficácia de NLC.....	44
Figura 17 - Avaliação do impacto da hidratação no estudo de eficácia de NLC.....	45
Figura 18 - Avaliação do impacto do eritema no estudo de eficácia de NLC.....	45

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens da veiculação tópica	21
Tabela 2 - Composição quantitativa dos componentes da NLC.....	29
Tabela 3 - Caracterização de D_h , PDI e pH das NLCs com e sem BAPN, antes e após a aplicação do teste de estabilidade térmica	41

Capítulo 1: Introdução Geral

1 A pele

A pele é uma evidência da evolução humana em milhares de anos. A melanina é o fator significativo para a variação de cor da pele, toda via, outros fatores externos também são responsáveis pela sua produção como a incidência de raios ultravioleta (UV) (Juzeniene et al., 2010; Naik & Farrukh, 2022). As pessoas que residem perto da linha do equador têm tendência a ter pele de cor escura, pois assim o organismo tem uma defesa natural contra as radiações UV, enquanto que indivíduos residentes em zonas mais distantes da linha do equador possuem pele mais clara, para que não interfira na produção de vitamina D (Brenner & Hearing, 2008; Hart et al., 2011).

O desenvolvimento da autoestima do ser humano é adquirido em conjunto com o desenvolvimento da sua personalidade. Neste contexto, os distúrbios dermatológicos crônicos podem afetar a aparência física, prejudicar a autoestima do indivíduo e consequentemente alteração da sua personalidade. As doenças dermatológicas mais comuns são acne, psoríase e eczema com início normalmente na infância e adolescência (Charalambos Costeris, Maria Petridou, 2021; Urpe et al., 2005). Um estudo realizado em Singapura na população asiática teve como objetivo avaliar a carga psicossocial de distúrbios dermatológicos. Os resultados apresentados demonstraram que os participantes com este tipo de patologias apresentaram maior probabilidade de desenvolver sintomas depressivos, isolamento social e menor qualidade de vida (Yew YW, Kuan AHY, Ge L, Yap CW & BH, 2020).

Uma pele saudável reflete qualidade de vida, autoapreciação, saúde mental, e essencialmente, representa o perfil de uma pessoa. Um bom perfil pode influenciar em acontecimentos da sua vida como aquando de uma entrevista de emprego para um novo cargo ou iniciar uma relação afetiva (Humphrey et al., 2021; Rhodes, 2006). O médico dermatologista pode desempenhar um importante papel nas situações em que a saúde da pele esta afetada fornecendo um tratamento. Consequentemente, leva a melhoras dos sinais físicos e sintomas psicológicos, podendo fornecer uma possibilidade de melhor qualidade de vida (Tuckman, 2017).

1.1 Caracterização estrutural e funcional da pele

A pele possui uma extensa área, com cerca de 2 m² e uma massa de 15% do peso corporal humano, e por essa razão é considerada o maior órgão do corpo (Dąbrowska et al., 2018). A sua principal função é barreira, representando a primeira linha de defesa contra os xenobióticos presentes no meio ambiente (Chambers & Vukmanovic-Stejic, 2020; Juliet M.

Pullar, Anitra C. Carr, 2017). Paralelamente a pele também desempenha outras funções importantes, como participar em processos metabólicos como a síntese de vitamina D, protege contra os diversos tipos de radiação, participa na autorregulação do organismo, evita a perda de água e eletrólitos essenciais ao seu bom funcionamento, protege contra traumatismos e tem poder de percepção de estímulos sensoriais (Chambers & Vukmanovic-Stejic, 2020; Roger et al., 2019). É colonizada por diferentes espécies de bactérias, fungos e vírus que em conjunto formam um ecossistema, que também ajudam na defesa (Byrd et al., 2018). Em predominância no ecossistema encontram-se as bactérias da família *Staphylococcus* e *Cutibacterium*, porém, existe uma grande variação na sua distribuição de acordo com a região anatômica. Por exemplo, a espécie de *Staphylococcus epidermidis* predomina em regiões de maior humidade, enquanto a espécie de *Cutibacterium Acnes*, é facilmente encontrada em zonas com maior abundância de glândulas sebáceas. Estudos indicam que uma desregulação do ecossistema da pele combinada com um menor desempenho protetor do sistema imunitário pode ocasionar proliferação das infecções oportunistas (Ahle et al., 2022).

A espessura da pele varia consoante a região anatômica e a quantidade de camadas subjacentes. A estrutura da pele é complexa, mas de modo simplificado pode ser dividida em epiderme e derme (Figura 1) (Boer et al., 2016). A epiderme é a camada mais externa da pele, sendo constituída por tecido estratificado pavimentoso queratinizado, e organizada em estratos que são designadamente os *Stratum Basalis* (camada celular basal), *Stratum Spinosum* (camada celular espinhosa), *Stratum granulosum* (camada celular granular), *Stratum Lucidum*, *Stratum Corneum* (SC) (camada celular de queratina) (Figura 2). Neles estão distribuídas as células presentes na epiderme como os queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (Hani Yousef; Mandy Alhajj; Sandeep Sharma, 2020; Rodrigues et al., 2019; Roger et al., 2019). Na epiderme são de destacar os queratinócitos, que exercem função estrutural e passam por processos de diferenciação, cornificação e descamação em ciclos de 28 dias (Piipponen et al., 2020; Rikken et al., 2020; Wickett & Visscher, 2006).

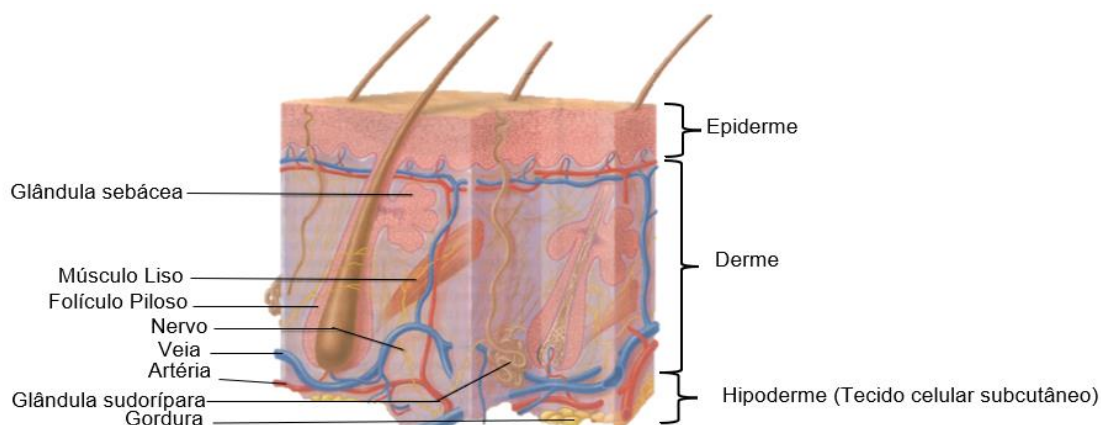


Figura 1 - Estrutura da pele e seus anexos. Adaptado de (Seeley, Rod R. Stephens D., Trent, 2005)

As células presentes no SC em maior quantidade são os corneócitos, sendo estas células o produto final dos queratinócitos basais que sofreram maturação. A maturação é um processo em que os queratinócitos se diferenciam e migram desde a camada basal até a camada mais externa. É uma etapa importante, pois confere resistência mecânica e a função barreira do SC (Évora et al., 2021). A maturação inicia-se no *Stratum Basalis*, onde os queratinócitos apresentam um núcleo e permanecem em constante processo de mitose. É um processo controlado, pois depende de outras células como as proteases, o pH do meio, e a hidratação regulada (Évora et al., 2021; Hani Yousef; Mandy Alhaji; Sandeep Sharma, 2020).

No *Stratum Spinosum*, os queratinócitos assumem a forma poliédrica e a presença de desmossomas promove a junção celular. Desta forma conferem resistência quando aplicado um stress mecânico (Garrod & Chidgey, 2008; Roger et al., 2019). Ao migrarem para o *Stratum Granulosum* as células apresentam grânulos constituídos por querato-hialina e anucleados. Os grânulos são insolúveis em água e a principal função é reticular os filamentos de queratina, sendo este processo chamado de queratinização (Freeman SC, 2022; Roger et al., 2019). O *Stratum Lucidum* está presente apenas em regiões do corpo onde a pele não contém folículos pilosos como, por exemplo, a pele da palma das mãos (Hani Yousef; Mandy Alhaji; Sandeep Sharma, 2020).

O SC é a camada celular que tem como principal função regular a perda transépidermica de água. É a última etapa da maturação dos queratinócitos, agora com a designação de corneócitos, apresentando-se anucleados e com maior permeabilidade na membrana celular, facilitando a entrada de cálcio. A filagrina é uma proteína resultante desta etapa e tem como função agregar a queratina dos corneócitos, sendo depois degradada em aminoácidos que ficam na superfície da pele promovendo a hidratação cutânea, e também originando péptidos com ação antimicrobiana. Os corneodesmossomas são estruturas intermoleculares que unem os corneócitos entre si (Goleva et al., 2019; Johansen, 2017;

Murphrey MB, Miao JH, 2021; Nunes et al., 2018).

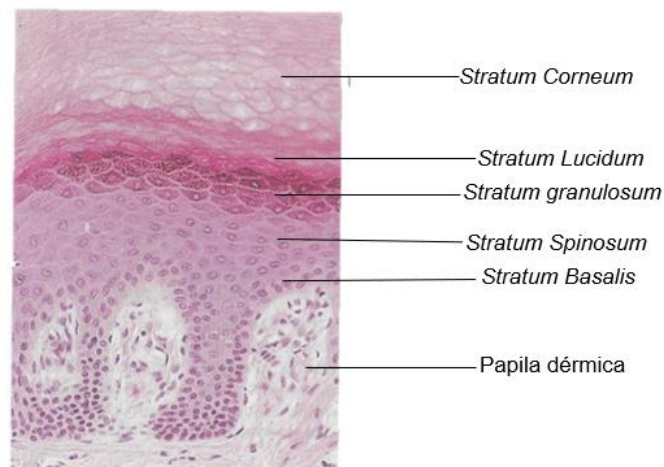


Figura 2 - Estratos da epiderme e papila dérmica. Adaptada de (Seeley, Rod R. Stephens D., Trent, 2005)

A derme é a camada subjacente à epiderme, sendo constituída pelas zonas papilar e reticular. A zona papilar está localizada na junção com a epiderme e contém terminações nervosas e vasos sanguíneos.

A camada reticular é composta por tecido conjuntivo onde as células estão inseridas na própria matriz extracelular. Esta é composta de fibras de colagénio e elastina e macromoléculas como o ácido hialurónico. Também existe vasculatura e mecanorreceptores, assim os nutrientes chegam ao tecido e há receção dos estímulos externos. A principal função da derme é conferir elasticidade e forma à pele além de nela também estarem inseridas as glândulas sudoríparas e folículos pilosos (Hani Yousef; Mandy Alhajj; Sandeep Sharma., 2020; Rippa et al., 2019; Rodrigues et al., 2019).

1.1.1 Processo de cicatrização de feridas e o papel das enzimas LOX

Como explicado anteriormente, a pele exerce função barreira contra agentes agressores físicos, químicos e radiações. Quando a sua integridade se encontra afetada, esses agressores externos podem atravessar a barreira, e desta forma comprometem a saúde do organismo. A pele tem mecanismos reparadores para sua proteção. Os mecanismos podem ter a sua eficácia influenciada por fatores como a idade e patologias agudas ou crónicas (Wilkinson & Hardman, 2020). Com o passar do tempo a matriz dérmica torna-se mais fina, perde alguma quantidade de colagénio e a sua rigidez aumenta. (Blair et al., 2020). No caso de indivíduos com uma patologia crónica, como por exemplo diabetes, a recuperação das feridas é lenta, e quando não devidamente tratadas podem evoluir. Em casos mais

extremos, a resolução do problema pode passar pela amputação do membro, aumentando a probabilidade de morte (Rodrigues et al., 2019).

A cicatrização de feridas depende de vários aspectos, como a sua localização, profundidade, tamanho, contaminação microbiana, a genética e epigenética do indivíduo. Adicionalmente, a ferida pode ou não deixar cicatriz (Sorg et al., 2017; Woodley, 2017). A recuperação de uma lesão na pele é um processo complexo, depende da atividade de várias células presentes na matriz extracelular e pertencentes ao sistema imunitário, níveis de oxigênio, quimiocinas, e a síntese de fatores de crescimento que estão diretamente relacionados com a ativação celular (Rodrigues et al., 2019). Existem células responsáveis por restaurar a estrutura da pele, sendo os fibroblastos, queratinócitos e outras responsáveis por mediar a fibrose. Estes participam no desencadeamento da cadeia inflamatória, síntese da matriz extracelular e no recrutamento de células imunológicas. Neste processo são também necessários íons metálicos como cálcio, zinco e magnésio. O cálcio tem capacidades de modular a proliferação, diferenciação e maturação dos queratinócitos (Subramaniam et al., 2021).

O processo de cicatrização da pele pode ser dividido nas fases de hemostase, inflamação, proliferação e remodelação, que ocorrem em sequência (Rippa et al., 2019; P.-H. Wang et al., 2018). Na fase de hemostase há formação de coágulo. Primeiramente forma-se o tampão plaquetário a partir do endotélio vascular. Após o dano, o fator de Von Willibrand com o *platelet-derived growth factor* (PDGF), o *transforming growth factor* (TGF), *fibroblast growth factor* (FGF) e *vascular endothelial growth factor* (VEGF) são libertados para a corrente sanguínea pelas células endoteliais e megacariócitos, aumentando assim a afinidade entre as plaquetas e proporcionando a agregação plaquetária. Desta forma, dá-se o início das vias extrínseca e intrínseca para estabilizar o coágulo (Moretti et al., 2022; Reinke & Sorg, 2012). O íon cálcio demonstrou ser um fator importante na formação do coágulo nesta fase, sendo uma espécie sinalizadora extracelular e segundo mensageiro intracelular dos queratinócitos e fibroblastos (Magee et al., 1987; Subramaniam et al., 2021).

A fase de inflamação inicia-se após 2 horas da lesão e pode perdurar até 2 semanas ou mais e resume-se na migração de leucócitos. Há secreção de enzimas, citocinas pró-inflamatórias das plaquetas e células do sistema imune residentes no tecido resultantes nos sinais típicos da inflamação: dor, inchaço, calor e vermelhidão. Os vasos e capilares sanguíneos aumentam a sua permeabilidade para promover a passagem de células do sistema imunitário para o local da ferida, nomeadamente os neutrófilos, macrófagos e linfócitos T (Moretti et al., 2022; Wallace HA, Basehore BM, 2020; P.-H. Wang et al., 2018).

As feridas superficiais, de pequenas dimensões e não contaminadas por microrganismos, são associadas a curta duração na fase de hemostase de inflamação. Devido

à produção de coágulos sanguíneos, o processo de cicatrização é mais rápido. Feridas profundas, de grande dimensão e infectadas necessitam de mais tempo para cicatrizar. Nestas, a fase de hemostase leva mais tempo para ocorrer devido à necessidade de remover os xenobióticos antes do início da formação do novo tecido (Sorg et al., 2017).

A fase de proliferação resume-se à migração dos fibroblastos para o local da ferida onde vão exercer a sua função de sintetizar proteínas estruturais perdidas no ato da lesão. Nesta altura, estão presentes na matriz dérmica, proteoglicanos, mediadores inflamatórios, colagénio dentre outras células estruturais. Os queratinócitos movem-se desde o *Stratum Basal* até a matriz provisória e proliferam-se para a reepitelização (Reinke & Sorg, 2012). Inicia-se a angiogénese para substituir os vasos lesados e a migração de células da periferia para o local da ferida visando estabilizar a ferida (Guo & DiPietro, 2010; Moretti et al., 2022).

Por último, a fase de remodelagem ou maturação é um processo que começa por volta da terceira semana e pode durar até doze meses e não acontece nas pequenas feridas dérmicas. Neste passo há a degradação do excesso de proteínas produzidas pelos fibroblastos, e a formação de ligações cruzadas. Este processo varia consoante a idade do indivíduo (Guo & DiPietro, 2010; Moretti et al., 2022; Wallace HA, Basehore BM, 2020).

A LOX e as quatro LOX-like 1, 2, 3 e 4 (LOXL 1-4) estão localizadas na derme, mas também na placenta, diafragma, rim e pavimento pélvico, e ainda com menor expressão no cérebro e fígado (Cai et al., 2017; W. Wang et al., 2022). São enzimas que participam diretamente na síntese de fibras de colagénio e elastina. Mais detalhadamente, as LOX e LOXL são catalisadoras de ligações cruzadas, especificamente as reações de desaminação oxidativa que ocorrem na terminação amino dos resíduos lisil das células de colagénio e elastina e no resíduo de hidroxilisil no colagénio. Desta forma, auxiliam na estabilização dos componentes estruturais da matriz extracelular (Dreaden et al., 2012; KOBAYASHI et al., 1994; Noblesse et al., 2004).

A atividade deste conjunto de enzimas confere resistência biomecânica e integridade estrutural à matriz extracelular. Estas enzimas, também estão fisiologicamente relacionadas na supressão tumoral, motilidade celular, regulação da transcrição gênica, na transdução de sinal e adesão tumoral (Cox et al., 2016; Kim et al., 2011; Ramos et al., 2022; Siddikuzzaman et al., 2011; Teppo et al., 2013). A primeira vez que se observou atividade direta das enzimas LOX no processo de cicatrização de feridas foi em 1974 (Chvapil et al., 1974). No organismo humano, o colagénio tipo I é o componente da matriz extracelular dérmica que existe em maior quantidade, e os restantes tipos de colagénio estão representados em pequenas porções. Aquando de uma lesão, este cenário inverte-se: o colagénio tipo I diminui e o colagénio tipo III aumenta significativamente, assim como a expressão da enzima LOX (Cai et al., 2017; Li et al., 2007). Alterações extracelulares como hipoxia ou hiperglicemia também

podem induzir o aumento ou diminuição da expressão das LOX (N. Yang et al., 2020). O aumento da expressão gera patologias como aterosclerose e esclerodermia e a diminuição leva a evolução de patologias como queratose (Barker et al., 2012).

Atualmente o papel das enzimas LOX e LOXL tem sido explorada para auxiliar na terapia de reparação de tecidos. As enzimas LOX e LOXL são um grupo de enzimas promissoras para estudos futuros, pois são um alvo com potencial na terapêutica de patologias como doença coronária, terapia contra vários gêneros de cancro e processos de cicatrização (Ferreira et al., 2021; Laczko & Csiszar, 2020; Xiao & Ge, 2012).

1.2 Compostos moduladores da enzima LOXL2

Entre os vários estudos publicados sobre a enzima LOXL2, surgiram estudos sobre os compostos inibitórios da mesma. As pesquisas científicas em contextos de inibição testam maneiras de acelerar o processo de cicatrização, inibir a progressão de um cancro, impedir progressão de doenças inflamatórias, dentre outros (Ferreira et al., 2021; Ribeiro et al., 2014). Os compostos inibitórios podem ser classificados como quelantes de íão cobre, nomeadamente, tetratiomolibdato ou a D-penicilamina, que são exemplos desta classe. O mecanismo é fixar o íão de cobre, dessa maneira diminui a possibilidade de ser utilizado pelas LOX e a LOXL-2 e conseqüentemente diminui a expressão das mesmas (Chopra et al., 2020). No entanto, a utilização sistemática destes compostos pode interferir com outros processos biológicos que dependem do íão cobre (Cox et al., 2016; Ferreira et al., 2021; Niu et al., 2020). Outra classe de compostos inibitórios existente são os inibidores seletivos da LOX e LOXL2. Estes compostos ligam-se as enzimas e têm capacidade de alterar a sua estrutura podendo inibi-las (Chang et al., 2017). Compostos pertencentes a esta classe são PXS-S1A, PXS-S2A, PAT-1251, entre outros (Chang et al., 2017; Setargew et al., 2021). O Simtuzumab, um anticorpo também pode inibir as enzimas de forma não competitiva, principalmente a LOXL-2 (Ikenaga et al., 2017). O anticorpo pode conter variações (Ferreira et al., 2021; Umscheid et al., 2011). Por fim, os inibidores duplos de LOX/LOXL, são moléculas inovadoras, cujo mecanismo é uma inibição de forma irreversível para as LOXL2 e LOXL3, o que se apresenta como uma vantagem, pois inibe dois sítios alvos em simultâneo (Ferreira et al., 2021; Schilter et al., 2019).

1.3 Bioatividade dos compostos inibidores das enzimas LOXL2

Num estudo foi testada a bioatividade de três compostos inibitórios das enzimas LOXL2, nomeadamente o BAPN (beta-aminopropionitrile fumarate - Acros Organics [New

Jersey, USA]) (Sherif, 2010), EPCU e PN1 (Pimarane 7, 15-isopimaradien-19-ol) (compostos não divulgados). O BAPN é um composto presente em plantas do género *Lathyrus*, nomeadamente em maior quantidade nas sementes. O mecanismo de ação passa por inibir de forma irreversível a enzima LOX e da LOXL (1-4), consequentemente interfere na síntese de colagéneo e elastina (Hajdú et al., 2018; Nelson et al., 1988; Plumlee, 2004). Atualmente o BAPN é estudado em contexto de prevenção de patologias como, por exemplo, aneurisma aórtico abdominal, fibrose, e outras patologias em que há produção exagerada dos componentes da matriz extracelular (Cullen et al., 2019) (Plumlee, 2004)(Giampuzzi et al., 2000).

Os compostos EPCU e PN1 pertencem à classe dos diterpenos tricíclicos, ou seja, são compostos que possuem em torno de 20 carbonos na sua constituição química. São obtidos em várias plantas, mas principalmente nas famílias *Lamiaceae* e *Asteraceae*. São considerados compostos bioativos que exercem atividades variadas como anti-inflamatória, analgésica, anticancerígena e ação antibacteriana (Isca et al., 2020).

Para verificar a toxicidade dos compostos foi utilizado um modelo *in vitro*.

1.4 Modelo de estudo da estrutura dérmica

As fases dos estudos de um novo fármaco são divididas em pré-clínicos e clínicos, em que na fase pré-clínica se fazem estudos *in silico*, *in vitro* e/ou modelos animais, e a fase clínica está subdividida de I a IV e envolve estudos em humanos (Infarmed, 2023). Para estudos da estrutura dérmica, nenhum modelo *in vitro* se assemelha exatamente à pele humana, devido aos processos de cicatrização serem complexos e ocorrerem em simultâneo. No entanto, o modelo comumente utilizado para estes estudos, é a pele de porco (Harunari et al., 2006; Simon & Maibach, 2000). A utilização de um modelo *in vitro* permite obter resultados sobre poucos componentes de cada vez, em comparação com o modelo *in vivo* (Mathes et al., 2014). Contudo, os estudos *in vitro* implementam o ideal dos “4R”, nomeadamente *Reduction*, *Replacement*, *Refinement* e *Rehabilitation* (Redução, Substituição, Refinamento e Reabilitação), especialmente para a determinação da segurança de um composto, sendo uma alternativa aos modelos animais, que são modelos dispendiosos e envolvem questões éticas e morais na sua utilização (Jaroch et al., 2018; Ud-Din & Bayat, 2017).

1.5 Estratégias nanotecnológicas aplicadas a formulações tópicas

A palavra nanotecnologia tem prefixo “nano” que no latim significa “anão”, e baseia-se no uso de matérias numa escala numérica de 10^{-9} m (Bayda et al., 2019). Um dos primeiros

vestígios de nanotecnologia é proveniente do século IV, o artefacto designado por *Taça de Lycurgus* que atualmente se encontra no Museu Britânico. A taça foi fabricada com nanomateriais, nomeadamente partículas de ouro coloidal, que ao interagirem com a luz resultam num fenómeno físico denominado de contenção do plasmão superficial. Assim, visualmente a taça muda de cor consoante o ângulo da luz que a incide (Karmakar, 2016). Em 1959 o físico americano Richard Feynman introduziu o conceito de nanotecnologia durante uma palestra. Nesta apresentação ele questiona: *“Por que não podemos escrever os 24 volumes da Enciclopédia Britânica na cabeça de um alfinete?”*. Esta palestra gerou novos modos de pensar, proporcionando infinitas possibilidades de aplicação da nanotecnologia. Por este motivo, Richard Feynman é considerado por muitos o pai da nanotecnologia moderna (Bayda et al., 2019).

Algumas décadas depois a nanociência tornou-se fundamental em diversas áreas importantes da sociedade, como a Medicina, Física, Ciência dos materiais, Engenharias, Matemática, Ciências Computacionais, Indústrias de Alimentação, de Produção de Têxteis, Indústrias Farmacêuticas, entre outras.

No âmbito da indústria alimentícia a nanotecnologia tem desenvolvido novos nanomateriais para melhorar a qualidade e a segurança dos alimentos, como por exemplo o potencial de tornar os alimentos mais saborosos, torná-los mais saudáveis reduzindo o teor de gordura ou torná-los mais nutritivos ao encapsular vitaminas e proporcionar boas condições de armazenamento (Bayda et al., 2019; Thiruvengadam et al., 2018). Na indústria de produção de têxteis, encontramos uma busca pelas roupas duráveis e funcionais, numa produção sustentável. A inclusão de nanomateriais no fabrico destas peças ajuda esta causa. Por exemplo, a utilização de *nanomaterials* podem prevenir a ocorrência de nódoas e vincos, e eliminar a eletricidade estática (Yetisen et al., 2016).

Na área da saúde, a nanotecnologia tem vindo a ser utilizada em medicamentos e dispositivos médicos fundamentais para a prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças como diabetes mellitus, síndrome da imunodeficiência adquirida, cancro, etc. (Dessale et al., 2022; Mamo et al., 2010; Sakamoto et al., 2010). Relatos recentes demonstram a importância da utilização da nanotecnologia numa crise de saúde mundial, já que cientistas do mundo inteiro trabalharam em prol da vacina contra o vírus SARS-CoV-2 baseada em nanopartículas (Anjum et al., 2021; Hasanzadeh et al., 2021).

O avanço da nanotecnologia também permitiu desenvolver novos sistemas de veiculação eficientes. Comumente utilizados para a aplicação cutânea podemos encontrar as nanoformulações baseadas em lípidos como os lipossomas, etossomas, transferossomas, nanopartículas (NP) lipídicas sólidas, transportadores lipídicos nanoestruturados, cubossomas entre outros (Sguizzato et al., 2021).

1.5.1 Vantagens e desvantagens da veiculação tópica

A via de administração tópica é considerada uma via de administração simples e não invasiva, permite veicular uma quantidade de substância ativa ideal para o local de ação, melhora a adesão e limita os efeitos secundários comparativamente à via de administração sistêmica (Calderon-Jacinto et al., 2022). A veiculação tópica possui outras vantagens e desvantagens, como exposto na seguinte tabela:

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens da veiculação tópica. Adaptado de (Archer et al., 2004; Bos & Meinardi, 2000; Brown et al., 2006; Frei et al., 2003; Gavhane & Yadav, 2012; Larsen et al., 2003; Murphy & Carmichael, 2000; Steinsträsser & Merkle, 1995; S.-I. Yang et al., 2004)

Vantagens	Desvantagens
Evitar o metabolismo de primeira passagem e outras questões relacionadas com o sistema digestório	A massa molecular das partículas necessita ser inferior a 500 Da para melhor penetração através do SC
Diminui as reações adversas da substância ativa e as variações de concentração da mesma na corrente sanguínea	Inter-variabilidade associada a permeabilidade cutânea
Maior adesão à terapêutica pelo fato de ser conveniente, não invasiva e indolor	Enzimas que podem metabolizar a substância ativa e inativá-la
Fácil de interromper a terapêutica em caso de toxicidade ou reação adversa	Reação de hipersensibilidade a resposta excessiva do sistema imunológico resultando em eritema cutâneo
Diminuição de despesas no setor de saúde de um país devido à boa adesão ao tratamento por parte dos utentes	Fabrico em grande escala dispendioso.

1.5.2 Características físico-químicas para formular um sistema de veiculação tópica

A pele restringe a penetração de agentes químicos, físicos e biológicos. Para realizar a permeação de forma passiva através da pele e chegar ao sítio alvo, uma NP necessita de ter determinadas propriedades físico-químicas. A dimensão é um fator determinante para o direcionamento da partícula. Na pele normalmente utiliza-se NPs com dimensões entre 10 e

300 nm. Esta gama de dimensões impede que as NPs bloqueiem os vasos sanguíneos ou que sejam facilmente eliminadas (Letchford & Burt, 2007) (Souto et al., 2022). O pH do estrato córneo varia entre 4,5 e 5,5, enquanto que na interface entre o estrato granuloso e córneo pode variar entre 6,8 e 7,0. Consoante o direcionamento da NP, é necessário considerar estas gamas de valores, como também definir se as partículas estarão ionizadas ou não ionizadas (Souto et al., 2022). O equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) adequado à fisiologia e anatomia da pele humana, influencia uma maior biodisponibilidade da partícula (Souto et al., 2022). Por fim, o potencial zeta é uma medida do potencial eletrostático na dupla camada elétrica ao redor da NP em solução. As NPs são consideradas com carga neutra quando o potencial zeta tem valores entre -10 e +10 mV, enquanto se forem maiores de +30 e menores de -30 mV são denominadas de catiónicas ou aniónicas, respetivamente. As NPs catiónicas são geralmente tóxicas para as paredes celulares e as aniónicas têm maior facilidade de permeiar a membrana celular (Clogston & Patri, 2011).

1.5.3 Tipos de sistemas de veiculação que envolvem nanopartículas

As NPs podem ser classificadas consoante a sua morfologia, tamanho e propriedades físico-químicas. As NP à base de carbono são de interesse devido a sua condutividade elétrica, alta resistência e afinidade eletrónica (Astefanei et al., 2015; Khan et al., 2019).

Os nanotubos de carbono são estruturas alongadas com 1 a 2 nm de diâmetro, a sua estrutura tem paredes simples, duplas ou múltiplas que se entrelaçam entre si (Saeed & Khan, 2014). Existem também NPs de origem metálica, em que os seus precursores são metais alcalinos ou nobres como, por exemplo, cobre, prata e ouro. Este género de NP tem propriedades optoeletrónicas (Dreaden et al., 2012).

As NPs de cerâmica são sólidas e inorgânicas, não metálicas, obtidas por calor e refrigeração de forma excessiva. A estrutura pode variar entre amorfas, policristalinas, densas, porosas ou ocas (Khan et al., 2019; Sigmund et al., 2006).

As NPs semicondutoras possuem propriedades de metais e não metais. São importantes em processos de foto-catálise e foto-óptica (Sun et al., 2000). As NPs poliméricas podem diferenciar-se em nanoeferas e nanocápsulas. As nanoesferas têm uma matriz sólida e as outras moléculas são adsorvidas na sua superfície esférica. As nanocápsulas têm um invólucro polimérico a rodear uma matriz interna que pode ser sólida ou líquida (Khan et al., 2019; Rao & Geckeler, 2011).

As NPs lipídicas, contêm lípidos sólidos, lípidos líquidos ou os dois em simultâneo. Normalmente o diâmetro destas NPs está na ordem dos 10 a 1000 nm. O núcleo contém uma matéria sólida e os surfactantes estabilizam a suspensão. Esta classe destina-se

principalmente à veiculação de fármacos em terapias especializadas, como por exemplo no tratamento de cancro (Khan et al., 2019; Rawat et al., 2011).

1.5.4 Transportadores Lipídicos Nanoestruturados

Os Transportadores Lipídicos Nanoestruturados (NLCs) são sistemas de veiculação lipídicos, com as mesmas vantagens das NPs lipídicas coloidais e das NPs de matrizes sólidas (Sguizzato et al., 2021). Na sua composição estão presentes lípidos sólidos, líquidos e surfactantes, estando as partículas suspensas em meio aquoso. A utilização de lípidos sólidos nas NLCs permite que à temperatura ambiente e à temperatura corporal a matriz da NP permaneça sólida. O surfactante tem a função de evitar o agrupamento e o depósito das partículas. Os lípidos líquidos são utilizados para impedir o fenómeno de recristalização quando armazenados e permitem um sistema termodinamicamente estável (Souto et al., 2020). A inclusão de lípidos líquidos em lípidos sólidos resulta em falhas na rede cristalina das NPs, o que aumenta a sua capacidade de carregar a substância a veicular e permite uma libertação controlada da substância (Sguizzato et al., 2021).

A utilização de NPs lipídicas, especificamente, as NLCs, permite maior adesão ao estrato córneo e consequentemente facilita a penetração do conteúdo da NP (Lademann et al., 2011; Sguizzato et al., 2021). Os nanossistemas baseados em lípidos são caracterizados pelas propriedades oclusivas na pele, assim, potencializam a penetração da substância a veicular, diminuem a perda transépidermica da água e aumentam a hidratação no estrato córneo (Araujo et al., 2021). Na literatura, encontram-se muitos estudos realizados com NLCs como sistemas de veiculação para diversas classes de medicamentos, como antifúngicos, anti-inflamatórios não esteróides, glucocorticóides, anti-hipertensivos, anti-histamínicos (Neubert, 2011; Sguizzato et al., 2021).

Para a formulação deste tipo de sistema de veiculação, é necessário ter em consideração que as NLCs devem ser biocompatíveis com o organismo humano e biodegradáveis, e que o seu fabrico deve ser o mais sustentável possível (Iqbal et al., 2012; Lakhani et al., 2018; Mofazzal Jahromi et al., 2018).

Atualmente existem muitas técnicas de obtenção de NLC, sendo a homogeneização de alta pressão, o principal método utilizado. As vantagens desta técnica são a obtenção de NPs num curto período, permite uma produção em escala laboratorial e em grande escala, e evita a utilização de solventes orgânicos. No entanto, é necessário grande fornecimento de energia, havendo consequentemente, um aumento de temperatura no produto (Ganesan & Narayanasamy, 2017; Souto et al., 2020). Além desta, a técnica de microemulsão também permite obtenção de NLC, sendo baseada na agitação suave, e obtenção de NLC a

temperatura inferior a 0 °C por precipitação. Este método é considerado simples e reproduzível, no entanto o passo limitante desta técnica é a grande quantidade de água utilizada no processo, sendo necessário o passo de liofilização para obtenção da concentração desejada de NLC (Duong et al., 2020; Muchow et al., 2008; Souto et al., 2020). A técnica de difusão e emulsificação do solvente é uma técnica baseada na miscibilidade entre a água e a mistura de lípidos. O processo é realizado a partir da agitação contínua e resulta numa troca de fases, sendo necessário retirar o excesso de solvente da mistura por evaporação com pressão reduzida (Quintanar-Guerrero et al., 2005; Souto et al., 2020; Trotta et al., 2003). Na emulsificação com evaporação do solvente, a matriz lipídica é envolvida por um solvente miscível orgânico emulsificado pela fase aquosa. Antes da obtenção da NLC, o solvente é evaporado por pressão reduzida, desta forma não há utilização de fontes de calor. (Duong et al., 2020; Souto et al., 2020; Trotta et al., 2003). A técnica de injeção de solvente (ou deslocamento de solvente), consiste em utilizar um solvente orgânico miscível em água e injetar rapidamente com uma agulha a mistura de lípidos na solução aquosa com surfactante. É uma técnica fácil e versátil, no entanto, também utiliza solventes orgânicos (Schubert, 2003; Souto et al., 2020). A inversão de fases, é uma técnica que não utiliza solventes orgânicos, mas necessita de agitação magnética e ciclos de temperaturas específicas por um curto tempo para atingir a inversão e fases, seguida da aplicação de choque térmico e, por fim, da diluição da mistura em água destilada. É um processo moroso, com várias etapas, e a estabilidade das NLCs obtidas é baixa (Duong et al., 2020; Heurtault et al., 2002; Souto et al., 2020). O *membrane contactor technique* é um método utilizado em produções de grande escala. A mistura é pressurizada através de uma membrana porosa, no entanto, o passo limitante desta técnica é o possível entupimento dos poros da membrana, interferindo na uniformidade de diâmetro das NLCs (Duong et al., 2020; Gordillo-Galeano & Mora-Huertas, 2018; Souto et al., 2020). A sonicação é um método que permite reprodução a um nível laboratorial. Consiste na fusão da fase oleosa e da substância a veicular numa temperatura ligeiramente acima do ponto de fusão da substância, seguido da dispersão em fase aquosa com surfactante na mesma temperatura. Por fim, a mistura é posta em agitação de alta intensidade para emulsificar. Após a sonicação a mistura tem de regressar à temperatura ambiente para evitar depósitos (Duong et al., 2020; Silva et al., 2011).

1.6. Objetivo

O presente estudo teve como objetivo explorar a aplicação de compostos moduladores da enzima LOXL2 para o controlo da regeneração cutânea- PN1, EPCU, BAPN. Foi avaliado o impacto dos compostos BAPN, PN1 e EPCU na viabilidade de queratinócitos humanos. Seguidamente, foram preparadas NPs (NLC) para veicular BAPN. Adicionalmente, foi

verificada a segurança e eficácia da aplicação das NLC sobre a pele humana.

Capítulo 2: Materiais e Métodos

Neste estudo foi testado o impacto de diferentes concentrações de compostos, (nomeadamente PN1 a 50, 100, 150, 200 nM, BAPN a 200 e 500 nM, e EPCU a 5, 10, 20, 50 nM) na viabilidade de queratinócitos humanos para definição de concentrações não citotóxicas a utilizar em ensaios futuros de análise do impacto destes compostos na migração celular e em outros processos relacionados com a cicatrização. Num ensaio bioquímico o EPCU apresentou IC50 de inibição da LOXL2 de 58,33 μ M e o PN1 apresentou 104,4 μ M (Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde, 2023) (dados não publicados) .

2.1 Cultura de células HaCat

Para este estudo foi utilizado um modelo *in vitro* de queratinócitos humanos, as células HaCaT. As células HaCaT são morfogénicas, ou seja, têm a capacidade de diferenciação e expressam os mesmos marcadores que se encontram a superfície de queratinócitos. Para o seu crescimento não é necessário fornecer fatores de crescimento, apenas o meio e nutrientes adequados. O cálcio é um ião presente na camada basal da epiderme e influencia a diferenciação do queratinócito presente na camada basal para a camada granular. Assim, na cultura destas células utiliza-se o cálcio para a diferenciação das células (Colombo et al., 2017; Wilson, 2013). Para o presente estudo utilizaram-se células HaCaT cultivadas em meio de cultura composto por: Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM [Biowest]) com 10% de soro fetal bovino (FBS [Biowest]) e uma mistura de pen/strep (Biowest). As células foram mantidas a 37 °C numa atmosfera húmida e com 5% de CO₂.

Neste estudo as células HaCat foram cultivadas em placas de 96 poços. No dia do ensaio, confirmou-se a confluência e a ausência de contaminação. Não havendo contaminação, e se a confluência fosse a desejada, foi removido o meio e de seguida procedeu-se a tripsinização. A tripsinização é o processo no qual é adicionado ao meio de cultura a enzima proteolítica tripsina, que é responsável por gerar quebra nas ligações intercelulares e entre o substrato (Kaur & Singh, 2022). Após tripsinização foi adicionado o meio de cultura, e por fim as células foram contadas através da câmara de contagem de Neubauer (Zhang et al., 2020). Para cada condição foram preparados 4 poços (Figura 16). Uma diluição à suspensão de células foi aplicada para obter a quantidade de 2×10^4 de células HaCaT por poço em 200 μ L de meio de cultura. As células permaneceram em estufa a 37° C durante 3 dias para terem uma confluência de aproximadamente 30% no dia do ensaio.

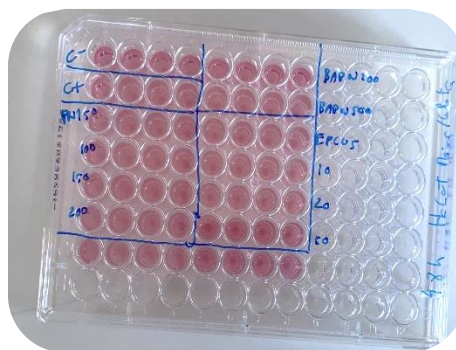


Figura 3. Placa de 96 poços com compostos a testar e os controles positivo e negativo

2.2 Método de Avaliação da viabilidade celular com o Cristal Violeta

As células HaCaT quando cultivadas em placas têm a capacidade de aderir à superfície da mesma, mas as células mortas não aderem. O método de avaliação da viabilidade celular por coloração das células aderentes com Cristal Violeta utiliza esta característica de aderência das células. Com o auxílio de um *Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments)*, a leitura de absorvância permite determinar a quantidade de cristal violeta em cada poço, sendo esta proporcional ao número de células aderidas ao poço. Portanto, quanto menor a intensidade de cor medida pelo aparelho, menor será a viabilidade celular (Feoktistova et al., 2016).

Neste estudo foram realizados dois ensaios independentes para visualizar o impacto dos compostos na viabilidade celular, nos dois ensaios foi testada a viabilidade celular às 24 e às 48 horas após a adição dos compostos ao meio de cultura das células. Foi confirmado a presença e a confluência adequada das células no dia da adição dos compostos com recurso a um microscópio invertido Olympus CKX41SF. Para cada condição, foram adicionados 10 μ L de compostos com as respetivas concentrações iniciais: dimethyl sulfoxide (DMSO) a 100% (composto de indução de toxicidade), DMSO 10% (veículo de EPCU e PN1 - controlo negativo), tampão fosfato-salino (PBS) (veículo do BAPN), BAPN as concentrações de 200 e 500 nM, PN1 as concentrações de 50, 100, 150, 200 nM e EPCU as concentrações de 5, 10, 20, 50 nM. Após a aplicação dos compostos e controlos, a concentração final dos poços com controlos foi alterada para as seguintes: DMSO 5% (composto de indução de toxicidade) e DMSO 0,5% (veículo de EPCU e PN1 – controlo negativo). Após 24 h a aplicação dos compostos foi removido o meio da placa. De seguida esta foi lavada com 10 μ L de uma solução de PBS. A cada poço foram adicionados 100 μ L de uma solução composta por Cristal Violeta à 1% e etanol a 90% e a placa permaneceu em incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Os poços foram lavados com água e por fim, foram adicionados 200 μ L de uma solução de Acido Acético (Biowest) à 0,1%. A absorvância foi lida a 595 nm. O ensaio de 48 h foi realizado com os mesmos procedimentos após a aplicação dos compostos

e controlos.

Para o tratamento de resultados foi realizada a subtração do valor de absorvância referente ao branco a todos os resultados obtidos. De seguida, foi calculada a média dos valores de veículo. Após a obtenção do valor da média, esta foi dividida por cada valor de absorvância e multiplicada por 100 para obter os valores em percentagem de viabilidade celular. Para cada quatro condições foi calculada a média e o desvio padrão. A análise estatística dos dados foi feita com recurso ao software graphpad (PRISM). O teste usado foi o teste t de Student.

2.3 Processo de produção de NLC e veiculação de BAPN

Foi desenvolvido um sistema de veiculação para o composto de interesse para este estudo (BAPN) baseado em NLC. Foram formuladas três réplicas de NLC com BAPN e três sem o composto, com intuito de avaliar a estabilidade das mesmas ao longo do tempo e quando sujeitadas ao stress térmico e mecânico.

As substâncias necessárias para a formulação de NLC foram Gelucire 43/01 (Gattefossé, Saint-Priest, França), Labrafac PG (Gattefossé, Saint-Priest, França), Tween-80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), água e o BAPN. O Gelucire 43/01 é um lípido sólido, e o Labrafac PG é um lípido líquido, e estes em conjunto formam a fase interna. A água foi utilizada como fase externa e, para impedir depósito e garantir a suspensão das partículas foi utilizado o Tween-80 como surfactante.

Foram pesadas as seguintes quantidades dos componentes:

Tabela 2 – Composição quantitativa dos componentes da NLC

Gelucire 43/01	Labrafac PG	Tween-80	Água Bidestilada	BAPN
416,7 mg	83,3 mg	300 mg	10 ml	10 mg

Após pesagem, a mistura dos lípidos e surfactante foi aquecida a 60 °C em banho de aquecimento, foi acrescentada água bidestilada à fase lipídica e de seguida, o preparado foi sonificado com amplitude de 70% durante 5 minutos no sonicador Q125 (QSonica Sonicators, Newtown, CT, USA). A mistura permaneceu em repouso até atingir a temperatura ambiente.

2.4 Caracterização da NLC

2.4.1 Características organoléticas e determinação do pH

A análise das características organoléticas foi realizada, com base na avaliação da

cor, cheiro e o aspeto do produto obtido. A medição de pH foi realizada com um potenciômetro 744 pH Meter (Metrohm, São Paulo, Brasil).

2.4.2 Determinação do D_h, PDI e Potencial Zeta

Para a caracterização das NPs com e sem BAPN foram utilizados os parâmetros diâmetro hidrodinâmico (D_h) e índice de Polidispersão (PDI), ambos medidos no aparelho *Delsa™ Nano C* (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Para realizar as medições foi utilizada uma diluição de 1:50 da formulação original com água destilada. Cada medição de D_h e PDI foi realizada três vezes. Esta caracterização foi realizada aos dias 0, 7, 15, 30, sendo o dia 0 correspondente ao dia que as NLC foram produzidas. O potencial zeta foi determinado recorrendo ao NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, USA), sendo os valores de referência entre -30 mV e +30 mV. A caracterização do potencial zeta foi realizada em dois momentos no dia 0 e após 7 dias.

2.4.3 Testes de estabilidade das NLC

Teste de stress mecânico: Neste teste o objetivo foi verificar a estabilidade da NLC com e sem BAPN quando submetidas a stress mecânico, ou seja, centrifugação. As NLCs foram colocadas em *ependorf's* e posteriormente numa centrífuga Hermle Z 32 HK (Hermle LaborTechnik). Após centrifugação, durante 30 min a 3000 rpm, foi medido o D_h, PDI e o pH.

Teste de stress térmico: Neste teste o objetivo foi determinar a estabilidade das NLC sem BAPN quando submetidas a elevadas temperaturas. Inicialmente as NLCs foram levadas a banho aquecido com uma temperatura inicial de 40 °C, e a cada 5 minutos a temperatura foi elevada 10 °C até chegar aos 80 °C. Após aplicação do teste foi realizada nova leitura dos parâmetros D_h, PDI, e pH das 3 réplicas.

2.5 Avaliação do impacto da aplicação de NLC na pele

Idealmente, quando se formula um sistema de veiculação, este não deve causar qualquer reação de hipersensibilidade, e não deve comprometer a integridade da barreira cutânea (Brown et al., 2006). Para verificar estes aspetos são medidos parâmetros, como o eritema, hidratação e perda transépidermica de água. O eritema avalia o surgimento de vermelhidão na pele, tendo sido usado aparelho Chromameter CR-300 (Minolta, Osaka, Japão). A análise dos resultados passa por utilizar o sistema CIE L * a * b *, em que: L * corresponde a luminosidade e varia entre 0 (preto absoluto) e 100 (branco absoluto); a *

representa variações de cores entre verde - vermelho, numericamente variando de -100 a +100 respetivamente; b * representa variações de cores entre azul e amarelo, numericamente variando de -100 a +100 (Clarys et al., 2000). Para avaliar hidratação foi usado o Corneometer CM280 (C+K electronics, Colónia, Alemanha), que contém dois sensores capazes de medir a capacitância do SC em unidades arbitrárias. Um elevado valor reflete uma pele mais hidratada (Westermann et al., 2020). A barreira cutânea impede a passagem de agentes de fora para dentro, e vice-versa. Para avaliar a integridade desta barreira foi usado o aparelho Tewameter TM300 (C+K electronics, Colónia, Alemanha) que é composto de dois sensores capazes de medir a PTEA através do gradiente de evaporação de água. Quanto maior o valor mensurado, maior o comprometimento da barreira cutânea (Alanen et al., 2004).

2.5.1 Avaliação de segurança da NLC

Com um intuito de comprovar a segurança e eficácia da NLC, o presente estudo testou a compatibilidade cutânea das NLC num grupo de 15 voluntários saudáveis de ambos os sexos, com média de idades de 23,27 + 3,63 anos. O ensaio decorreu de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia e emendas posteriores.

Para a avaliação da segurança foi utilizado o *Patch Test* (Lazzarini et al., 2013). Duas zonas foram selecionadas no antebraço de cada um dos voluntários: sítio controlo, com aplicação de água destilada, sítio destinado à aplicação de NLC. Foram determinados a hidratação, PTEA e eritema basais com o equipamento descrito anteriormente. Foram depois usados adesivos (Finn Chambers® on Scanpor, Epitest Ltd Oy, Finlândia) para a aplicação da água ou NLC durante 24 h. Após esse tempo, mediram-se novamente os três parâmetros cutâneos.

2.5.2 Avaliação de eficácia da NLC

A avaliação da eficácia da NLC foi realizada no mesmo grupo de voluntários, tendo sido utilizada a metodologia *Tape Stripping*. Nesta avaliação, o objetivo é observar a alteração da barreira cutânea após remoção superficial de células do SC (Dickel et al., 2010). No antebraço de cada um dos voluntários foram delineadas duas zonas, uma zona de controlo, não tratada, e outra zona destinada à aplicação da nanoformulação composta por NLCs. O protocolo foi dividido em 2 dias, em que no primeiro foi feita a leitura basal nos dois sítios dos parâmetros hidratação, PTEA e eritema em cada um dos indivíduos com os equipamentos descritos acima e de seguida foi realizada a remoção do estrato córneo com o auxílio de fita adesiva de forma repetitiva (20 vezes). O voluntário repousou por 5 minutos, realizando-se

depois novas medições dos mesmos parâmetros. Por fim, foi aplicado um penso oclusivo com 200 mL de NLC por 24 horas. No segundo dia os indivíduos permanecem em repouso por 10 minutos para a ambientação da temperatura da sala de medições, após o qual todas leituras foram repetidas.

Capítulo 3: Resultados e Discussão

3.1 Avaliação do Impacto na Viabilidade celular com o Cristal Violeta nos compostos inibitórios das LOX

O presente estudo teve como objetivo explorar a aplicação de compostos moduladores da enzima LOXL2 para o controlo da regeneração cutânea. Para esse fim, foi verificado o efeito dos compostos inibidores da LOXL2 quando aplicados em queratinócitos humanos.

Dado que o BAPN é um inibidor das LOXL2 já validado, este foi utilizado como controlo. Para avaliar o impacto do BAPN na viabilidade celular das células HaCaT, foram testadas duas concentrações diferentes deste composto, e foi aplicado durante dois períodos de incubação diferentes com as células. Face ao PBS (controlo negativo) as duas concentrações de BAPN demonstraram após 24h de incubação que a viabilidade celular foi mantida acima de 100%, bem como após 48 h (Figura 4), ou seja, os queratinócitos não perderam viabilidade após incubação em nenhuma das condições. Um ligeiro aumento da viabilidade foi observado, possivelmente devido a um aumento da proliferação ou da capacidade de aderência das células ao plástico. De qualquer forma o ensaio foi apenas realizado uma vez, pelo que o significado estatístico não pode ser avaliado.

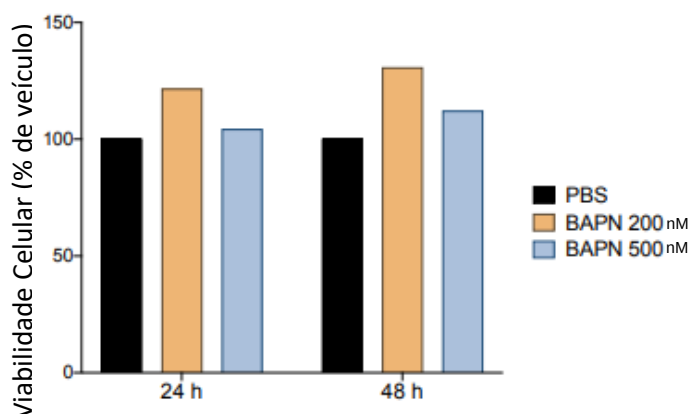


Figura 4 – Impacto do BAPN na viabilidade de células HaCaT. As células HaCaT foram cultivadas durante 24 e 48 horas na presença de diferentes concentrações de BAPN. A viabilidade celular foi avaliada por meio de um ensaio de CV. No gráfico estão representados os valores correspondentes à média dos valores de três poços. O ensaio foi realizado apenas uma vez.

Miana et al, realizaram um estudo referente a utilização de BAPN para inibir a LOX e evitar os distúrbios metabólicos associados a obesidade. Para tal foi utilizado células de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 que foram tratadas com 200 μ M de BAPN e TNF α . O ensaio 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) (XTT) de viabilidade celular demonstrou que não houve citotoxicidade celular (Miana et al., 2015).

No presente estudo, o BAPN obteve resultados relativos à integridade dos queratinócitos, as células HaCaT demonstraram resultados acima de 100% de viabilidade celular. Portanto nestas condições de estudo é um composto seguro para aplicação das células, sendo um composto de interesse, como também serviu de controle para comparar os resultados obtidos do EPCU e PN1.

A classe dos diterpenos tem sido explorada devido o efeito anticancerígeno, sendo um dos alvos terapêuticos a inibição da LOXL2 (Hasan et al., 2022).

O composto EPCU, é inibidor da LOXL2. Neste ensaio foi utilizado para avaliar o impacto na viabilidade celular das células HaCaT, foram testadas quatro concentrações diferentes do composto, e foi aplicado dois períodos de incubação diferentes com as células. Face ao veículo (controle negativo de DMSO 10%) as concentrações de 5 e 10 nM demonstraram resultados acima de 100% de viabilidade celular (Figura 5), em contrapartida, a concentração de 20 nM não permitiu atingir 100% de viabilidade celular e a concentração de 50 nM levou uma redução significativa da viabilidade celular de cerca de 75%, muito semelhante ao obtido para o DMSO 100%. Assim sendo, apenas os queratinócitos incubados com EPCU a concentrações de 5 e 10 nM não perderam viabilidade após incubação.

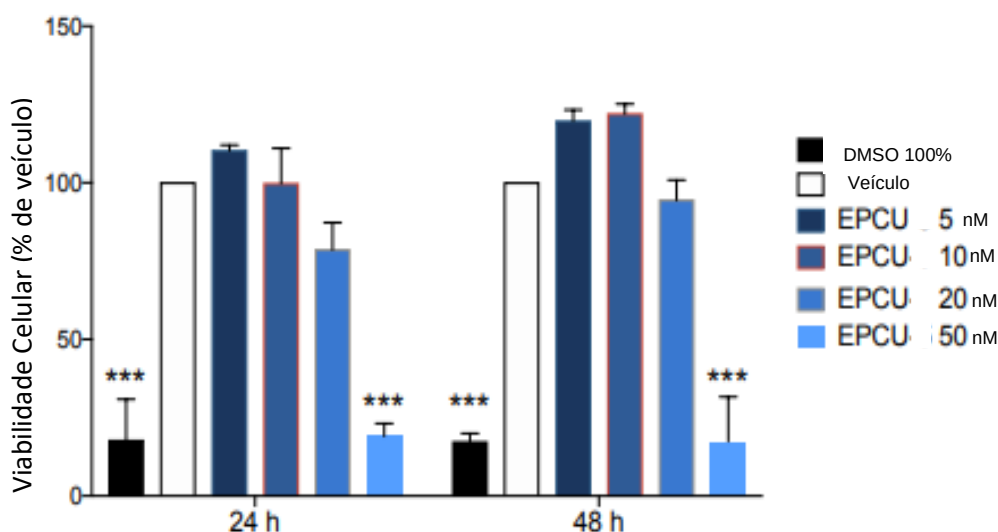


Figura 5 – Impacto do EPCU na viabilidade de células HaCaT. As células HaCaT foram cultivadas durante 24 e 48 horas na presença de diferentes concentrações de EPCU. A viabilidade celular foi avaliada por meio de um ensaio CV. No gráfico estão representados os valores correspondentes à média e o respectivo desvio padrão dos valores de dois ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com recurso a um teste t de Student. *** $p < 0,0001$ por comparação com o veículo (DMSO 10%).

As concentrações que o composto EPCU apresentou resultados de viabilidade celular semelhantes ao BAPN foi 5 e 10 nM. A concentração considerada ideal para a inibição de 50% da atividade da LOXL2 é 58,33 μ M, e o presente estudo demonstra que a concentração

de 50 nM o composto apresenta toxicidade em células HaCaT, sendo assim, o EPCU não demonstrou potencial de ser um composto de regeneração cutânea.

O composto PN1, como os compostos anteriores, também é inibidor das enzimas LOXL2. Neste ensaio foi utilizado para avaliar o impacto na viabilidade celular das células HaCaT, foram testadas quatro concentrações diferentes do composto, e foi aplicado dois períodos de incubação diferentes com as células. Face ao veículo, as quatro concentrações de PN1 demonstraram após 24 h e 48 h de incubação uma viabilidade celular acima de 100% (Figura 6). Nenhuma alteração significativa da viabilidade celular foi verificada com a gama de concentrações testada. Este estudo sugere que a gama de concentrações citotóxicas deste composto, estão acima os 200 nM.

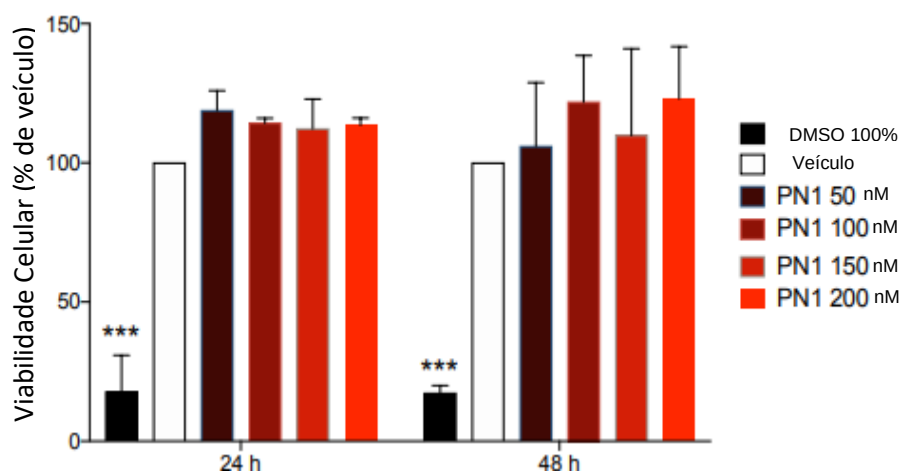


Figura. 6 – Impacto do PN1 na viabilidade de células HaCaT. As células HaCaT foram cultivadas durante 24 e 48 horas na presença de diferentes concentrações de PN1. A viabilidade celular foi avaliada por meio de um ensaio de CV. No gráfico estão representados os valores correspondentes à média e o respetivo desvio padrão dos valores de dois ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com recurso a um teste t de Student. *** $p < 0,0001$ por comparação com células tratadas com veículo (DMSO 10%).

O composto PN1 apresentou viabilidade celular igual ou superior a 100% em semelhança ao BAPN com todas as concentrações apresentadas no estudo. Relativamente a concentração de PN1 necessária para inibir 50% da atividade da LOXL2 é 104,4 μ M, portanto, a partir dos resultados obtidos, o PN1 é um composto promissor para estudos futuros para a regeneração cutânea. Com base nos resultados apresentados no estudo, estes sugerem que o PN1 é um candidato promissor para estudos futuros de inibição da LOXL2, nomeadamente em estudos de proliferação, migração e diferenciação celular com células HaCaT. No entanto, os resultados também são sugestivos de um novo ensaio de viabilidade

celular com maiores concentrações de PN1. A D-penicilina é um composto inibidor da LOXL2, pertencente a classe dos quelantes do íon cobre. Kandanapitiye et al, realizaram um estudo de biocompatibilidade do composto D-penicilina conjugada com nanopartículas de ouro, visando os íons de cobre intracelular livres para desintoxicação. Para verificar a citotoxicidade de diferentes concentrações de D-penicilina, realizaram um ensaio de viabilidade celular utilizando o método brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) durante 24 horas de incubação em células humanas HeLa. A concentração de D-penicilina correspondente a 80 por cento de viabilidade celular é de 600 μ M, a partir dessa concentração as células diminuíam a percentagem de viabilidade celular (Kandanapitiye et al., 2015). Barker et al, estudaram o efeito inibidor da D-penicilina no *post-translational modifications of recombinant human lysyl oxidase-like 2* (rhLOXL2), e definiram que a concentração necessária para inibir drasticamente a atividade é 10 μ M (Barker et al., 2011; Ferreira et al., 2021).

Comparativamente, concentrações superiores à 600 μ M a D-penicilina apresentaria toxicidade celular, assim como EPCU. A D-penicilina inibe o rhLOXL numa concentração não tóxica, relativamente a concentração necessária para o EPCU poder inibir IC50 da LOXL-2. No entanto, para uma comparação linear é de interesse verificar a viabilidade celular da D-penicilina em queratinócitos humanos, como também realizar um ensaio bioquímico para determinar o IC50 para inibir a LOXL2.

3.2 Avaliação das características organoléticas, D_n, PDI, pH e Potencial Zeta

As NLCs são um sistema de veiculação em que a matriz apresenta imperfeições, permitindo carregar uma substância ativa e proporcionar libertação controlada. São normalmente NPs estáveis ao longo do tempo e à temperatura ambiente (Sguizzato et al., 2021; Souto et al., 2020). A utilização de NLC pode proporcionar maior tempo de adesão ao estrato córneo, diminuir a PTEA, ou seja, melhorar a barreira cutânea, e aumentar a hidratação cutânea (Araujo et al., 2021).

Relativamente às características organoléticas, durante os 30 dias do estudo as NLC's não apresentaram separação de fase ou alteração de odor, tendo coloração branca com aspeto leitoso à temperatura ambiente (25 ° C).

Em relação ao diâmetro hidrodinâmico, as NLCs apresentaram resultados inferiores a 300 nm (Figura 7), tendo as NPs com BAPN dimensões ligeiramente menores. Foi notado um ligeiro aumento de diâmetro com o evoluir do tempo nas NLCs sem BAPN, enquanto nas NLCs com BAPN o diâmetro manteve-se estável ao longo do tempo. Assim, as NPs mantiveram-se com dimensões estáveis ao longo do tempo do estudo e a incorporação de

BAPN em NLC não provocou alterações significativas nesta propriedade das NPs.

Um trabalho de Ghasemiyeh et al, pretendeu definir o efeito do tamanho das NLCs na sua permeação através do estrato córneo. Determinaram que o tamanho igual ou inferior a 650 nm permite penetrar o estrato córneo de forma passiva, permitindo também à NP atravessar através da via folicular (Ghasemiyeh et al., 2019). No presente estudo verifica-se que o D_h obtido parece estar dentro das dimensões adequadas para assegurar uma boa permeação.

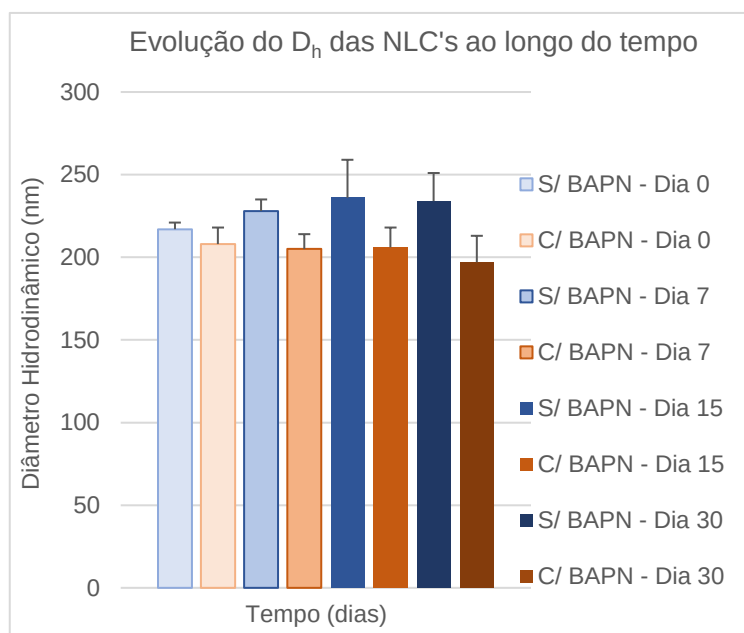


Figura 7 – Evolução do D_h das NLCs ao longo do tempo. A caracterização foi realizada num período de 30 dias nas NLCs com e sem BAPN ($n=3$, média + DP).

A adição de surfactantes influencia a dispersão das nanopartículas, consequentemente o PDI. Danaei et al, investigaram o comportamento das nanopartículas com a adição de diferentes concentrações de surfactante. Determinaram que o valor de PDI ideal para um sistema homogéneo é igual ou menor a 0,3 (Danaei et al., 2018; Rahmasari et al., 2022).

Relativamente ao PDI obtido neste estudo, todas as NLCs apresentaram resultados inferiores a 0,3, o resultado desejável. Tanto as NLCs vazias como as com BAPN mantiveram-se estáveis ao longo do tempo do estudo. As NLCs sem BAPN tiveram valores relativamente superiores às NLCs com BAPN, ou seja, a partir destes resultados entende-se que a veiculação de BAPN em NLC favorece a uniformidade das NPs em termos de tamanho de partícula (Figura 8).

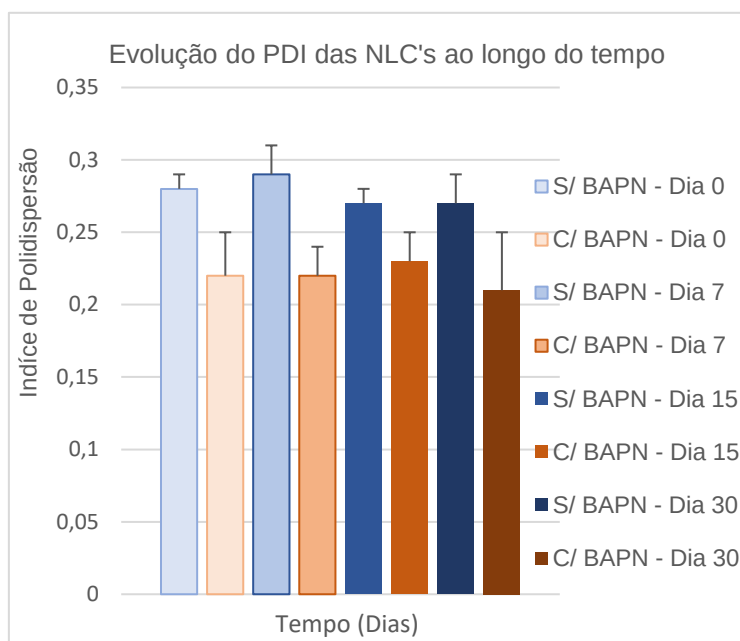


Figura 8 – Evolução do PDI das NLCs ao longo do tempo. A caracterização foi realizada num período de 30 dias nas NLCs com e sem BAPN ($n=3$, média + DP)

O pH do sistema de veiculação determina o direcionamento da partícula através das camadas cutâneas. O pH varia entre 4,5 e 5,5 à superfície do SC e entre 6,8 e 7,0 nas camadas subjacentes (Souto et al., 2022).

No que diz respeito ao pH das NLCs com e sem BAPN, houve um ligeiro aumento no decorrer do tempo (Figura 9). A veiculação deste composto poderá ter contribuído para aumentar o valor de pH, uma vez que o BAPN é um composto alcalino (PubChem, 2023).

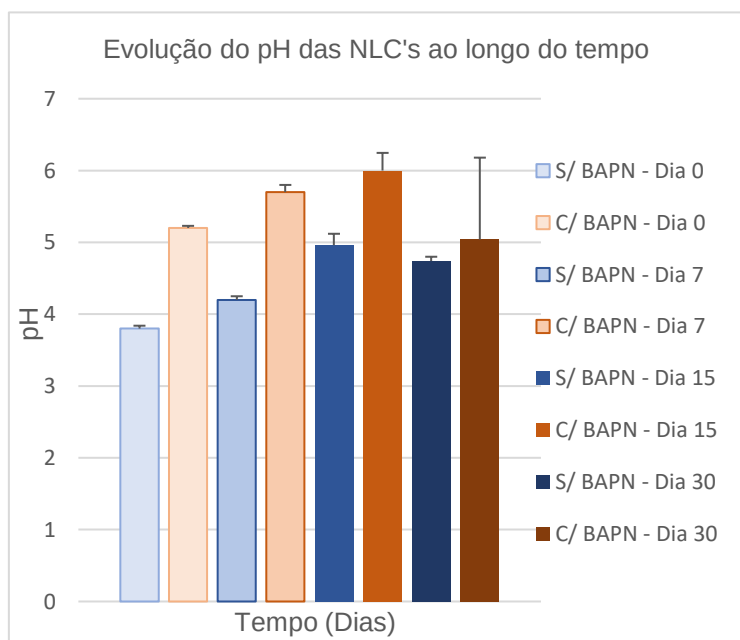


Figura 9 – Evolução do pH das NLCs ao longo do tempo. A caracterização foi realizada num período de 30 dias nas NLCs com e sem BAPN ($n=3$, média + DP).

O potencial zeta é um parâmetro utilizado para medir a carga e a repulsão eletrostática das nanopartículas. O sistema é considerado estável quando o potencial zeta apresentar valores maiores que + 30 e menores que -30 mV, pois desta forma as nanopartículas repelem-se e não formam aglomerados ou depósitos (Loo et al., 2012).

No presente estudo todas as NLCs apresentaram valores superiores a -25 mV de potencial zeta. As NLCs com e sem BAPN permaneceram estáveis ao longo do estudo, com ligeiro aumento de potencial zeta após os 7 dias no caso das NLCs com BAPN (Figura 10). Em estudos futuros seria importante realizar a medição do potencial zeta nas NLCs durante 30 dias para averiguar a possibilidade de formação de aglomerados e verificar a necessidade aumentar a quantidade de surfactante. A variação de potencial zeta após os 7 dias pode ser explicada pelo estado ionização do BAPN ser positivo (PubChem, 2023). Em concordância com o resultado obtido neste estudo, Makoni et al. realizaram um estudo de estabilidade com a utilização do parâmetro potencial zeta em NLC durante 8 semanas a 25° C e 60% de humidade. Os resultados indicaram que as NLC se mantiveram estáveis ao longo de todo o tempo de estudo (Makoni et al., 2019).

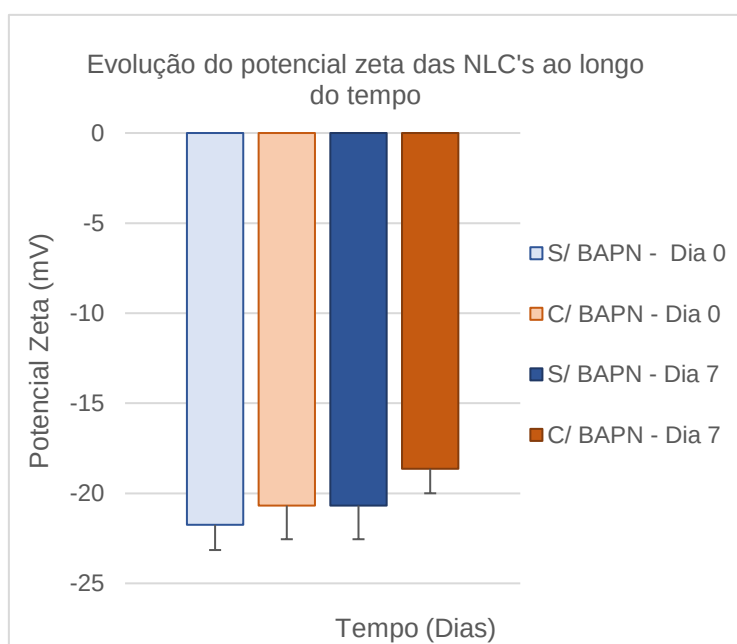


Figura 10 – Evolução do potencial zeta das NLCs ao longo do tempo. A caracterização foi realizada num período de 7 dias nas NLCs com e sem BAPN ($n=3$, média + DP).

3.3 Ensaios de estabilidade acelerada

Os testes de estabilidade são utilizados com finalidade de obter informações sobre o comportamento do produto a testar em relação à variação de temperatura, humidade e luz, e a partir dos resultados estipular uma data de validade e informações sobre o armazenamento

(Abdulkarim et al., 2010).

No presente estudo, foi feita uma comparação entre as NLCs com e sem BAPN, antes e depois da aplicação de stress mecânico. Após o stress as NLCs não apresentaram separação de fase ou qualquer depósito no fundo dos eppendorf's. As características organoléticas das NLCs também não se alteraram (Figura 11). A partir do teste de centrifugação é possível obter informações sobre a interação entre as nanopartículas. Ondracek et al. concluíram que as preparações que resistem a uma elevada carga mecânica, demonstraram uma maior estabilidade ao longo do tempo (ONDRACEK, J.; BOLLER, F.H.; ZULLIGER, H.W.; NIEDERER, 1985).

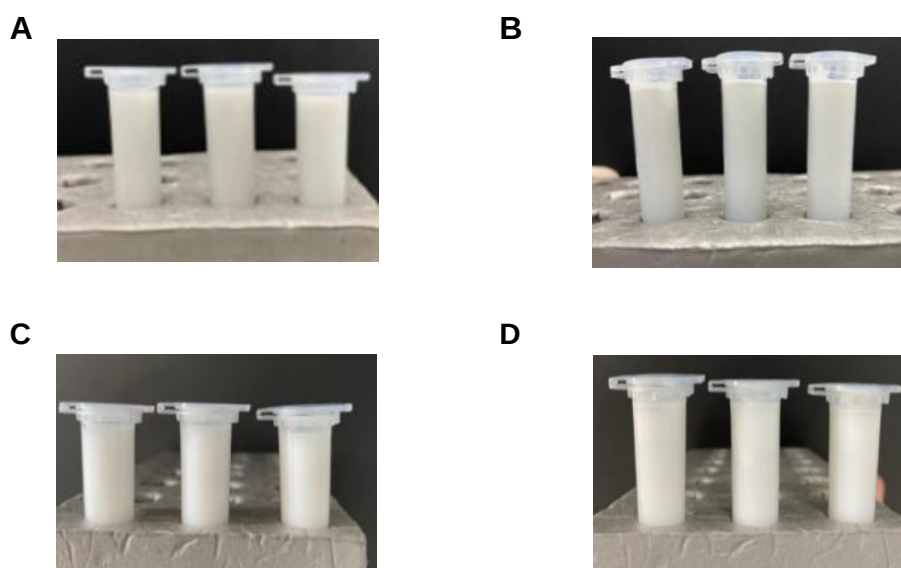


Figura 11. Teste de estabilidade acelerada com aplicação de teste mecânico. (A) NLC sem BAPN antes da aplicação de stress mecânico. (B) NLC sem BAPN depois da aplicação de stress mecânico. (C) NLC com BAPN antes da aplicação de stress mecânico. (D) NLC com BAPN depois da aplicação de stress mecânico.

O teste de stress térmico, também é considerado relevante como teste de estabilidade acelerada. Neste, submete-se o produto a diferentes temperaturas, sendo dessa forma obtida informações preditivas sobre o comportamento em armazenamento prolongado (Park et al., 2022).

No presente estudo, após a aplicação do stress térmico, não houve qualquer depósito visível no fundo do tubo de *falcon* ou qualquer indicativo de separação de fases, nas NLC com e sem BAPN. As características organoléticas também permaneceram iguais (Figura 12). Makoni et al, realizaram um estudo de estabilidade de NLC com recurso ao método de homogeneização de alta pressão e temperatura. Os resultados demonstraram que os lípidos presentes nas NLC apresentavam características polimórficas (Makoni et al., 2019; Weems et al., 2017). De acordo com estes resultados, as NLCs podem ser consideradas estáveis,

mas em estudos futuros seria importante acrescentar o método de calorimetria para verificar a formação de polimorfismo.

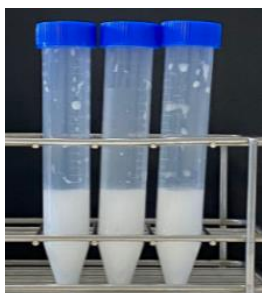


Figura 12. NLC sem BAPN depois da aplicação do teste de estabilidade térmica.

Após a aplicação do teste de estabilidade térmica, os parâmetros D_h , PDI e pH foram novamente medidos (Tabela 3). Ambas as NLCS mantiveram o D_h abaixo de 300 nm. As NLCs sem BAPN após o teste demonstraram um ligeiro aumento de tamanho e as NLCs com BAPN permaneceram iguais. O PDI das NLCs não sofreu alterações significativas quando o BAPN estava presente, mas reduziu na ausência do ativo. O pH de ambas NLCs foi manteve-se inalterado.

Portanto, a partir destes resultados é verificada a estabilidade da NLC com BAPN, em relação à grande carga mecânica aplicada e a elevada temperaturas.

Tabela 3 – Caracterização de D_h , PDI e pH das NLCs com e sem BAPN, antes e após a aplicação do teste de estabilidade térmica. Na Tabela estão apresentados os valores correspondentes a média dos três valores medidos.

	NLC sem BAPN		NLC com BAPN	
	Antes do teste	Depois do teste	Antes do teste	Depois do teste
D_h (nm)	228 ± 7	245 ± 7	208 ± 10	209 ± 24
PDI (nm)	$0,29 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,03$
pH	$4,2 \pm 0,05$	$4,19 \pm 0,05$	$5,2 \pm 0,03$	$5,13 \pm 0,02$

3.4 Avaliação da segurança e eficácia das NLC

A avaliação da segurança pretendeu determinar se a aplicação na pele das NPs causará alteração da barreira cutânea, vermelhidão ou diminuição da hidratação da pele. De modo a diminuir o impacto da variação interindividual, os resultados foram analisados como o rácio de valor final sobre o basal.

No que diz respeito aos valores de PTEA, após as 24 h de contacto os valores foram superiores a 1, tanto na zona controlo, como na zona de aplicação de NLC (Figura 13), resultado este diferente do esperado, pois um aumento de PTEA poderia ser indicativo de impacto negativo na barreira cutânea.

Estes valores podem ser justificados pelas condições climáticas na altura que foram realizadas as medições, e pela água que ainda permanecia na pele resultante da oclusão causada pelo *patch*. Wolf et al estudaram o efeito de NLC na pele de um grupo de voluntários, tendo os resultados mostrado um aumento de PTEA que também foi atribuído à oclusão ocasionada pelo *patch*, usado na metodologia. Como foi observada recuperação da PTEA após alguns minutos, os autores concluíram que as NLC não foram causa de perturbação da barreira cutânea (Wolf et al., 2018).

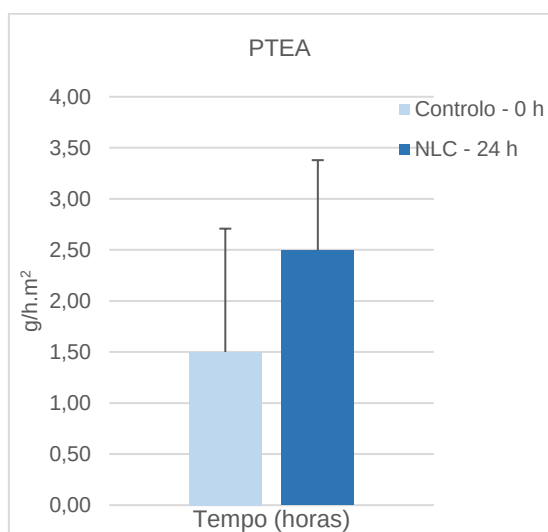


Figura 13 – Avaliação do impacto na PTEA das NLC. No gráfico estão representados os valores correspondentes a médias obtidas a partir do rácio controlo e rácio NLC. (n=15, média + DP).

No contexto de avaliação da segurança, a medição do valor de hidratação estar próximo de 1 indica que não houve impacto negativo na pele ao aplicar a formulação (Figura 14). Loo et al, estudaram diferentes composições de NLC e o seu efeito hidratante, e nenhuma das composições causou desidratação na pele (Loo et al., 2012).

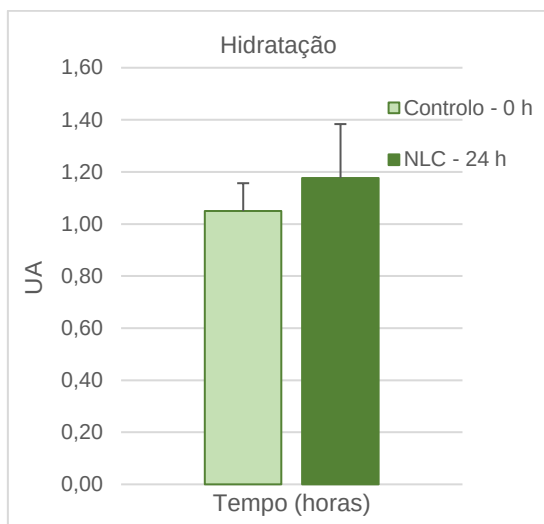


Figura 14 - Avaliação do impacto na hidratação das NLC. No gráfico estão representados os valores correspondentes a médias obtidas a partir do rácio controlo e rácio NLC. (n=15, média + DP).

A aplicação das NLC não deve causar eritema ou sensibilidade na pele. Os resultados da Figura 15 mostram que o controlo e NLC estão próximos de 1, portanto, a NLC não gerou alterações significativas na pele. Fang et al, estudaram o efeito de NLC sem composto ativo na pele de ratinhos e utilizaram a colorimetria para verificar o eritema (a^*), tendo também obtido bons resultados (Fang, 2010).

Em resumo, após os resultados obtidos baseados nos parâmetros de PTEA, hidratação e eritema, as NLC podem ser consideradas seguras para a aplicação cutânea.

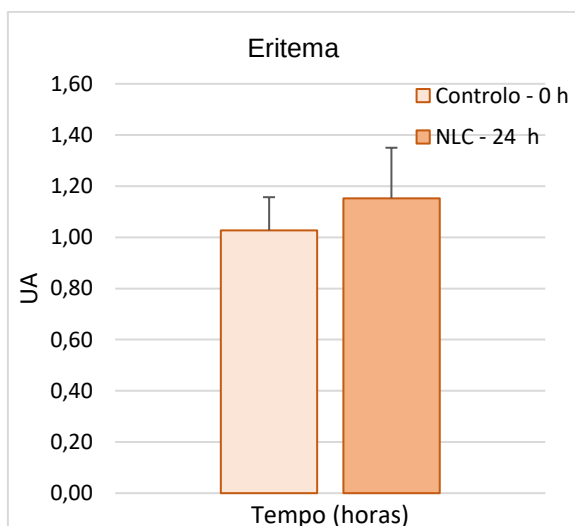


Figura 15 - Avaliação do impacto no eritema das NLC. No gráfico estão representados os valores correspondentes as médias obtidas a partir do rácio controlo e rácio NLC. (n=15, média + DP).

A metodologia usada para avaliação da eficácia destina-se a verificar se a utilização

das formulações com NLC irá proporcionar regeneração cutânea, diminuir a vermelhidão causada pelo *tape-stripping* e proporcionar hidratação. Os resultados do estudo sugerem que o procedimento provocou um aumento da PTEA em ambos os locais a testar, como esperado. Depois da aplicação do *Patch* com NLC, observou-se maior valor de PTEA em relação ao local onde não houve qualquer aplicação, não tendo havido, então, uma melhor recuperação na função de barreira (Figura 16). No entanto, é de destacar que neste protocolo as NLC foram aplicadas através de um *patch* oclusivo. Esta oclusão pode ter levado a uma acumulação de água no estrato córneo, o que explica os resultados. Outro fator que pode explicar estes resultados foi o baixo número de voluntários que participaram no estudo. No estudo realizado por Loo et al, foi verificado que todas as formulações de NLC reduziram a perda de água transepidérmica de água em 7 dias (Loo et al., 2012).

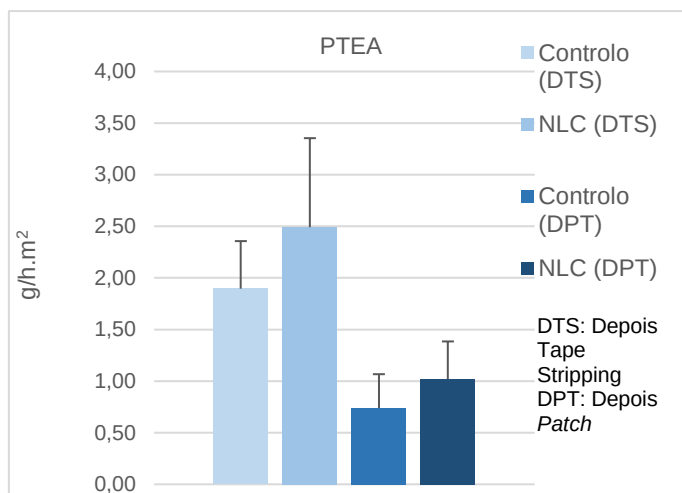


Figura 16 – Avaliação do impacto da PTEA no estudo de eficácia de NLC. No gráfico estão representados os valores correspondentes as médias obtidas a partir do rácio controlo (antes e depois da aplicação do método *tape stripping*) e rácio NLC (antes e depois do método *tape stripping*), como também as médias obtidas a partir do rácio controlo (depois do *tape stripping* e depois da aplicação do método *Patch Test*) e rácio NLC (depois do *tape stripping* e depois da aplicação do método *Patch Test*)

Os resultados da Figura 17 sugerem um ligeiro aumento na hidratação após *tape-stripping*, que pode ser explicado pelo fato de a medição ter sido realizada nas camadas subjacentes ao SC, onde as células têm maior quantidade de água na sua constituição. Após o período de 24 h, os valores de controlo e NLC voltaram a valores próximos de 1, portanto a aplicação de NLC na pele não gerou melhorias significativas. Pardeike et al, estudaram o efeito da inclusão de NLC em produtos cosméticos devido à propriedade hidratante, e o efeito hidratante foi verificado após aplicação durante 42 dias num grupo de 30 mulheres. (Pardeike et al., 2009). Portanto, caso a aplicação da NLC fosse feita constantemente por um maior

número de dias, o resultado de hidratação poderia ser maior.

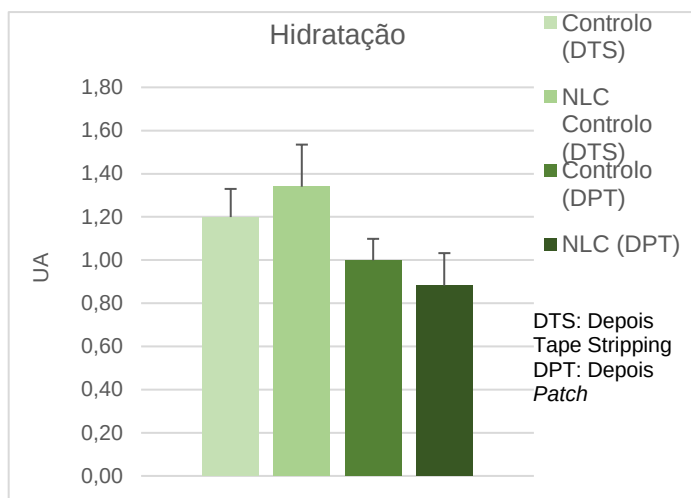


Figura 17 - Avaliação do impacto da hidratação no estudo de eficácia de NLC. No gráfico estão representados os valores correspondentes às médias obtidas a partir do rácio controlo (antes e depois da aplicação do método tape stripping) e rácio NLC (antes e depois do método tape stripping), como também as médias obtidas a partir do rácio controlo (depois do tape stripping e depois da aplicação do método Patch Test) e rácio NLC (depois do tape stripping e depois da aplicação do método Patch Test)

No que diz respeito ao eritema, os resultados sugerem que houve um aumento considerável após *tape-stripping*, como previsto. Porém, notou-se uma diminuição clara após as 24 h deste parâmetro, podendo significar que existiu uma recuperação da barreira cutânea no final do estudo nas duas zonas (Figura 18). Keck et al, estudaram o efeito da aplicação da NLC associada com nanopartículas de prata em pele sensibilizada, os resultados demonstraram que a NLC é eficaz na redução do eritema produzido (Keck et al., 2014).

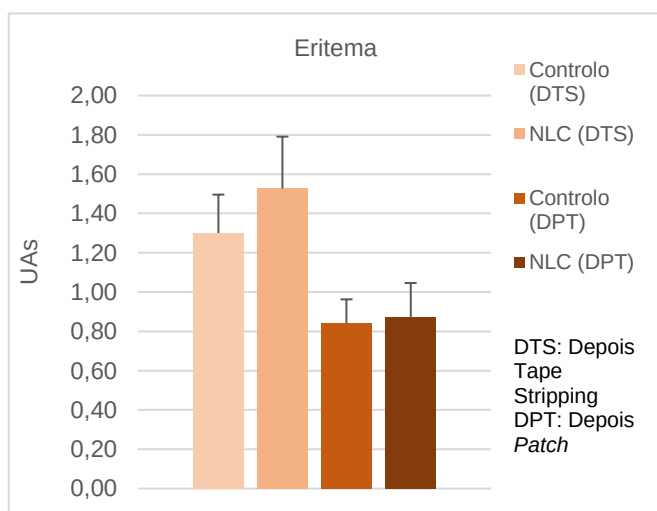


Figura 18 - Avaliação do impacto do eritema no estudo de eficácia de NLC. No gráfico estão representados os valores correspondentes às médias obtidas a partir do rácio controlo (antes e depois

da aplicação do método tape stripping) e rácio NLC (antes e depois do método tape stripping), como também as médias obtidas a partir do rácio controlo (depois do tape stripping e depois da aplicação do método Patch Test) e rácio NLC (depois do tape stripping e depois da aplicação do método Patch Test)

Conclusão

Na literatura, existem vários estudos focados na inibição da LOXL2, uma vez que este é um alvo promissor para modular processos relacionados com a inibição da progressão de cancro, com a redução do risco de fibrose ou com a aceleração do processo de cicatrização cutânea, entre outros.

Em um estudo bioquímico os compostos EPCU e PN1 demonstraram atividade inibitória da LOXL2. O inibidor da LOXL2 já descrito (BAPN), como também o EPCU e PN1 foram explorados no contexto da regeneração cutânea, em específico o impacto que estes têm na viabilidade de queratinócitos humanos. Adicionalmente, a compatibilidade do composto BAPN em NLC foi verificada, como também foi averiguada a eficácia e segurança da NLC num grupo de voluntários.

O composto PN1 demonstrou ser promissor para novos estudos de migração, proliferação e diferenciação uma vez que a sua toxicidade se revelou baixa no modelo usado de queratinócitos humanos. Neste modelo não se observou indução de toxicidade celular até uma concentração de 200 nM (acima de 100% de viabilidade detetada) e o seu IC₅₀ para inibição da LOXL2 é 104,4 µM. Comparativamente, num estudo realizado com a D-penicilina, esta não demonstrou toxicidade em células HeLa, e apresentou perfil inibitório de rhLOXL2, sendo necessário novos estudos para uma comparação linear. Por oposição, o IC₅₀ do composto EPCU capaz de inibir a atividade da LOXL2 é de 58,33 µM, os resultados do presente estudo sugerem que a concentração máxima em que não existe redução da viabilidade estatisticamente significativa é de 20 nM. Por esta razão o composto não poderá ser usado na modulação da LOXL2. No entanto, este composto poderá servir como molécula modelo, que uma vez sofrendo pequenas alterações, poderá originar uma molécula com um potencial inibidor da LOXL2 mais alto e/ou com uma toxicidade mais baixa.

As caracterizações da NLC sem BAPN obtidas neste estudo apresentaram resultados de D_h, PDI e pH estáveis e promissores para aplicação cutânea. Em relação às caracterizações das NLC com BAPN, os resultados de D_h, pH e potencial zeta mostram que a incorporação do composto altera as propriedades da nanopartícula. Os resultados obtidos nos testes de estabilidade física e térmica, as NLCs demonstraram resistir a uma elevada carga mecânica e foram razoavelmente estáveis durante 30 dias.

No estudo com os voluntários, e a partir dos resultados obtidos nos parâmetros analisados na pele, a NLC não demonstrou incompatibilidade cutânea, mas obtiveram-se resultados sem diferenças estatisticamente significativas na eficácia. Não foram observadas alterações na hidratação da pele, eritema e PTEA. Em estudos futuros a adição de NLC numa forma farmacêutica poderia ser testada, e o protocolo de avaliação do seu efeito sobre a regeneração cutânea deverá ser testado num maior número de voluntários.

Referências Bibliográficas

- Abdulkarim, M. F., Abdullah, G. Z., Chitneni, M., Mahdi, E. S., Yam, M. F., Faisal, A., Salman, I. M., Ameer, O. Z., Sahib, M. N., Abdulsattar, M. Z., Basri, M., & Noor, A. M. (2010). Stability studies of nano-cream containing piroxicam. *International Journal of Drug Delivery*, 2(4), 333–339. <https://doi.org/10.5138/ijdd.2010.0975.0215.02045>
- Ahle, C. M., Stødkilde, K., Poehlein, A., Bömeke, M., Streit, W. R., Wenck, H., Reuter, J. H., Hüpeden, J., & Brüggemann, H. (2022). Interference and co-existence of staphylococci and *Cutibacterium acnes* within the healthy human skin microbiome. *Communications Biology*, 5(1), 923. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03897-6>
- Alanen, E., Nuutinen, J., Nicklen, K., Lahtinen, T., & Monkkonen, J. (2004). Measurement of hydration in the stratum corneum with the MoistureMeter and comparison with the Corneometer. *Skin Research and Technology*, 10(1), 32–37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2004.00050.x>
- Anjum, S., Ishaque, S., Fatima, H., Farooq, W., Hano, C., Abbasi, B. H., & Anjum, I. (2021). Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare Systems: Grand Challenges and Perspectives. *Pharmaceuticals*, 14(8), 707. <https://doi.org/10.3390/ph14080707>
- Araujo, V. H. S., Delello Di Filippo, L., Duarte, J. L., Spósito, L., Camargo, B. A. F. de, da Silva, P. B., & Chorilli, M. (2021). Exploiting solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for drug delivery against cutaneous fungal infections. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(1), 79–90. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843399>
- Archer, D. F., Cullins, V., Creasy, G. W., & Fisher, A. C. (2004). The impact of improved compliance with a weekly contraceptive transdermal system (Ortho Evra®) on contraceptive efficacy. *Contraception*, 69(3), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2003.10.006>
- Astefanei, A., Núñez, O., & Galceran, M. T. (2015). Characterisation and determination of fullerenes: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 882, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.025>
- Barker, H. E., Chang, J., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Nicolau, M., Evans, H. R., Gartland, A., & Erler, J. T. (2011). LOXL2-Mediated Matrix Remodeling in Metastasis and Mammary Gland Involution. *Cancer Research*, 71(5), 1561–1572. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2868>
- Barker, H. E., Cox, T. R., & Erler, J. T. (2012). The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(8), 540–552. <https://doi.org/10.1038/nrc3319>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>

- Blair, M. J., Jones, J. D., Woessner, A. E., & Quinn, K. P. (2020). Skin Structure–Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging. *Advances in Wound Care*, 9(3), 127–143. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1021>
- Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R., & Marchlewicz, M. (2016). Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Advances in Dermatology and Allergology*, 1, 1–5. <https://doi.org/10.5114/pdia.2015.48037>
- Bos, J. D., & Meinardi, M. M. H. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology*, 9(3), 165–169. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>
- Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008). The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin†. *Photochemistry and Photobiology*, 84(3), 539–549. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x>
- Brown, M. B., Martin, G. P., Jones, S. A., & Akomeah, F. K. (2006). Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Delivery*, 13(3), 175–187. <https://doi.org/10.1080/10717540500455975>
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Cai, L., Xiong, X., Kong, X., & Xie, J. (2017). The Role of the Lysyl Oxidases in Tissue Repair and Remodeling: A Concise Review. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 14(1), 15–30. <https://doi.org/10.1007/s13770-016-0007-0>
- Calderon-Jacinto, R., Matricardi, P., Gueguen, V., Pavon-Djavid, G., Pauthe, E., & Rodriguez-Ruiz, V. (2022). Dual Nanostructured Lipid Carriers/Hydrogel System for Delivery of Curcumin for Topical Skin Applications. *Biomolecules*, 12(6), 780. <https://doi.org/10.3390/biom12060780>
- Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde. (2023). *CBIOS*.
- Chambers, E. S., & Vukmanovic-Stejcic, M. (2020). Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*, 160(2), 116–125. <https://doi.org/10.1111/imm.13152>
- Chang, J., Lucas, M. C., Leonte, L. E., Garcia-Montolio, M., Singh, L. B., Findlay, A. D., Deodhar, M., Foot, J. S., Jarolimek, W., Timpson, P., Erler, J. T., & Cox, T. R. (2017). Pre-clinical evaluation of small molecule LOXL2 inhibitors in breast cancer. *Oncotarget*, 8(16), 26066–26078. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15257>
- Charalambos Costeris, Maria Petridou, Y. I. (2021). Psychological Impact of Skin Disorders on Patients' Self-esteem and Perceived Social Support. *Journal of Dermatology and Skin Science*, 22. <https://www.dermatoljournal.com/articles/psychological-impact-of-skin-disorders-on-patients-self-esteem-and-perceived-social-support.html>
- Chopra, V., Sangarappillai, R. M., Romero-Canelón, I., & Jones, A. M. (2020). Lysyl Oxidase

- Like-2 (LOXL2): An Emerging Oncology Target. *Advanced Therapeutics*, 3(2), 1900119. <https://doi.org/10.1002/adtp.201900119>
- Chvapil, M., McCarthy, D. W., Misiorowski, R. L., Madden, J. W., & Peacock, E. E. (1974). Activity and Extractability of Lysyl Oxidase and Collagen Proteins in Developing Granuloma Tissue. *Experimental Biology and Medicine*, 146(3), 688–693. <https://doi.org/10.3181/00379727-146-38173>
- Clarys, P., Alewaeters, K., Lambrecht, R., & Barel, A. O. (2000). Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter®, the DermaSpectrometer® and the Mexameter®. *Skin Research and Technology*, 6(4), 230–238. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0846.2000.006004230.x>
- Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). *Zeta Potential Measurement* (pp. 63–70). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P. A., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D., & Dell'Agli, M. (2017). HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/7435621>
- Cox, T. R., Gartland, A., & Erler, J. T. (2016). Lysyl Oxidase, a Targetable Secreted Molecule Involved in Cancer Metastasis. *Cancer Research*, 76(2), 188–192. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2306>
- Cullen, J. M., Lu, G., Shannon, A. H., Su, G., Sharma, A., Salmon, M., Fashandi, A. Z., Spinoza, M. D., Montgomery, W. G., Johnston, W. F., Ailawadi, G., & Upchurch, G. R. (2019). A novel swine model of abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*, 70(1), 252-260.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2018.09.057>
- Dąbrowska, A. K., Spano, F., Derler, S., Adlhart, C., Spencer, N. D., & Rossi, R. M. (2018). The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Research and Technology*, 24(2), 165–174. <https://doi.org/10.1111/srt.12424>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Dessale, M., Mengistu, G., & Mengist, H. M. (2022). Nanotechnology: A Promising Approach for Cancer Diagnosis, Therapeutics and Theragnosis. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 17, 3735–3749. <https://doi.org/10.2147/IJN.S378074>
- Dickel, H., Goulioumis, A., Gambichler, T., Fluhr, J. W., Kamphowe, J., Altmeyer, P., & Kuss, O. (2010). Standardized Tape Stripping: A Practical and Reproducible Protocol to

- Uniformly Reduce the Stratum Corneum. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(5), 259–265. <https://doi.org/10.1159/000314700>
- Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J., & El-Sayed, M. A. (2012). The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, 41(7), 2740–2779. <https://doi.org/10.1039/C1CS15237H>
- Duong, V.-A., Nguyen, T.-T.-L., & Maeng, H.-J. (2020). Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method. *Molecules*, 25(20), 4781. <https://doi.org/10.3390/molecules25204781>
- Évora, A. S., Adams, M. J., Johnson, S. A., & Zhang, Z. (2021). Corneocytes: Relationship between Structural and Biomechanical Properties. *Skin Pharmacology and Physiology*, 34(3), 146–161. <https://doi.org/10.1159/000513054>
- Fang, J.-Y. (2010). Combination of calcipotriol and methotrexate in nanostructured lipid carriers for topical delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 117. <https://doi.org/10.2147/IJN.S9155>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Ferreira, S., Saraiva, N., Rijo, P., & Fernandes, A. S. (2021). LOXL2 Inhibitors and Breast Cancer Progression. *Antioxidants*, 10(2), 312. <https://doi.org/10.3390/antiox10020312>
- Freeman SC, S. S. H. (2022). Histology, Keratohyalin Granules. In *StatPearls [Internet]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537049/>
- Frei, A., Andersen, S., Hole, P., & Jensen, N.-H. (2003). A One Year Health Economic Model Comparing Transdermal Fentanyl with Sustained-Release Morphine in the Treatment of Chronic Noncancer Pain. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*, 17(2), 5–26. https://doi.org/10.1080/J354v17n02_02
- Ganesan, P., & Narayanasamy, D. (2017). Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 6, 37–56. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2017.07.002>
- Garrod, D., & Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 572–587. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.014>
- Gavhane, Y. N., & Yadav, A. V. (2012). Loss of orally administered drugs in GI tract. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 20(4), 331–344. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.03.005>
- Ghasemiyeh, P., Azadi, A., Daneshamouz, S., Heidari, R., Azarpira, N., & Mohammadi-

- Samani, S. (2019). Cyproterone acetate-loaded nanostructured lipid carriers: effect of particle size on skin penetration and follicular targeting. *Pharmaceutical Development and Technology*, 24(7), 812–823. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1596133>
- Giampuzzi, M., Botti, G., Di Duca, M., Arata, L., Ghiggeri, G., Gusmano, R., Ravazzolo, R., & Di Donato, A. (2000). Lysyl Oxidase Activates the Transcription Activity of Human Collagene III Promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 36341–36349. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003362200>
- Goleva, E., Berdyshev, E., & Leung, D. Y. M. (2019). Epithelial barrier repair and prevention of allergy. *Journal of Clinical Investigation*, 129(4), 1463–1474. <https://doi.org/10.1172/JCI124608>
- Gordillo-Galeano, A., & Mora-Huertas, C. E. (2018). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 133, 285–308. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.017>
- Guo, S., & DiPietro, L. A. (2010). Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219–229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
- Hajdú, I., Kardos, J., Major, B., Fabó, G., Lőrincz, Z., Cseh, S., & Dormán, G. (2018). Inhibition of the LOX enzyme family members with old and new ligands. Selectivity analysis revisited. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(18), 3113–3118. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.07.001>
- Hani Yousef; Mandy Alhajj; Sandeep Sharma. (2020). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In *StatPearls [Internet]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- Hani Yousef; Mandy Alhajj; Sandeep Sharma. (2020). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In *StatPearls [Internet]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- Hart, P. H., Gorman, S., & Finlay-Jones, J. J. (2011). Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nature Reviews Immunology*, 11(9), 584–596. <https://doi.org/10.1038/nri3045>
- Harunari, N., Zhu, K. Q., Armendariz, R. T., Deubner, H., Muangman, P., Carrougher, G. J., Isik, F. F., Gibran, N. S., & Engrav, L. H. (2006). Histology of the thick scar on the female, red Duroc pig: Final similarities to human hypertrophic scar. *Burns*, 32(6), 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.03.015>
- Hasan, M., Paul, N. C., Paul, S. K., Saikat, A. S. M., Akter, H., Mandal, M., & Lee, S.-S. (2022). Natural Product-Based Potential Therapeutic Interventions of Pulmonary Fibrosis. *Molecules*, 27(5), 1481. <https://doi.org/10.3390/molecules27051481>
- Hasanzadeh, A., Alamdaran, M., Ahmadi, S., Nourizadeh, H., Bagherzadeh, M. A., Mofazzal Jahromi, M. A., Simon, P., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2021). Nanotechnology against

- COVID-19: Immunization, diagnostic and therapeutic studies. *Journal of Controlled Release*, 336, 354–374. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.036>
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E., & Benoit, J.-P. (2002). A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharmaceutical Research*, 19(6), 875–880. <https://doi.org/10.1023/a:1016121319668>
- Humphrey, S., Manson Brown, S., Cross, S. J., & Mehta, R. (2021). Defining Skin Quality. *Dermatologic Surgery, Publish Ah*. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000003079>
- Ikenaga, N., Peng, Z.-W., Vaid, K. A., Liu, S. B., Yoshida, S., Sverdlov, D. Y., Mikels-Vigdal, A., Smith, V., Schuppan, D., & Popov, Y. V. (2017). Selective targeting of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) suppresses hepatic fibrosis progression and accelerates its reversal. *Gut*, 66(9), 1697–1708. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312473>
- Infarmed. (2023). *Avaliação Pré-Clínica*. https://www.infarmed.pt/pt_PT/web/infarmed/institucional/documentacao_e_informacao/informacao-tematica?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&_101_struts_action=%252Fasset_publisher%252Fview_content&_101_returnToFullPageURL=https%253A%252F%252
- Iqbal, M. A., Md, S., Sahni, J. K., Baboota, S., Dang, S., & Ali, J. (2012). Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 20(10), 813–830. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716845>
- Isca, V. M. S., Andrade, J., Fernandes, A. S., Paixão, P., Uriel, C., Gómez, A. M., Duarte, N., & Rijo, P. (2020). In Vitro Antimicrobial Activity of Isopimarane-Type Diterpenoids. *Molecules*, 25(18), 4250. <https://doi.org/10.3390/molecules25184250>
- Jaroch, K., Jaroch, A., & Bojko, B. (2018). Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 297–312. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.023>
- Johansen, C. (2017). Generation and culturing of primary human keratinocytes from adult skin. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(130). <https://doi.org/10.3791/56863>
- Juliet M. Pullar, Anitra C. Carr, and M. C. M. V. (2017). The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients*, 9(8), 866. <https://doi.org/10.3390/nu9080866>
- Juzeniene, A., Stokke, K. T., Thune, P., & Moan, J. (2010). Pilot study of folate status in healthy volunteers and in patients with psoriasis before and after UV exposure. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101(2), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.01.013>
- Kandanapitiye, M. S., Gunathilake, C., Jaroniec, M., & Huang, S. D. (2015). Biocompatible

- <scpd> -penicillamine conjugated Au nanoparticles: targeting intracellular free copper ions for detoxification. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(27), 5553–5559. <https://doi.org/10.1039/C5TB00189G>
- Karmakar, B. (2016). Fundamentals of Glass and Glass Nanocomposites. *Glass Nanocomposites: Synthesis, Properties and Applications*, 3–53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39309-6.00001-8>
- Kaur, J., & Singh, P. K. (2022). Trypsin Detection Strategies: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52(5), 949–967. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1846490>
- Keck, C. M., Anantaworasakul, P., Patel, M., Okonogi, S., Singh, K. K., Roessner, D., Scherrers, R., Schwabe, K., Rimpler, C., & Müller, R. H. (2014). A new concept for the treatment of atopic dermatitis: Silver–nanolipid complex (sNLC). *International Journal of Pharmaceutics*, 462(1–2), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.044>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Kim, Y.-M., Kim, E.-C., & Kim, Y. (2011). The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin. *Molecular Biology Reports*, 38(1), 145–149. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0088-0>
- KOBAYASHI, H., ISHII, M., CHANOKI, M., YASHIRO, N., FUSHIDA, H., FUKAI, K., KONO, T., HAMADA, T., WAKASAKI, H., & OOSHIMA, A. (1994). Immunohistochemical localization of lysyl oxidase in normal human skin. *British Journal of Dermatology*, 131(3), 325–330. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1994.tb08518.x>
- Laczko, R., & Csiszar, K. (2020). Lysyl Oxidase (LOX): Functional Contributions to Signaling Pathways. *Biomolecules*, 10(8), 1093. <https://doi.org/10.3390/biom10081093>
- Lademann, J., Richter, H., Schanzer, S., Knorr, F., Meinke, M., Sterry, W., & Patzelt, A. (2011). Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(3), 465–468. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.10.015>
- Lakhani, P., Patil, A., & Majumdar, S. (2018). Recent advances in topical nano drug-delivery systems for the anterior ocular segment. *Therapeutic Delivery*, 9(2), 137–153. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0088>
- Larsen, R. H., Nielsen, F., Sorensen, J. A., & Nielsen, J. B. (2003). Dermal Penetration of Fentanyl: Inter- and Intraindividual Variations. *Pharmacology and Toxicology*, 93(5), 244–248. <https://doi.org/10.1046/j.1600-0773.2003.pto930508.x>
- Lazzarini, R., Duarte, I., & Ferreira, A. L. (2013). Patch tests. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(6), 879–888. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20132323>

- Letchford, K., & Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(3), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.009>
- Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.007>
- Loo, Basri, M., Ismail, Lau, Tejo, B. A., Kanthimathi, M., Hassan, & Choo. (2012). Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. *International Journal of Nanomedicine*, 13. <https://doi.org/10.2147/IJN.S35648>
- Magee, A. I., Lytton, N. A., & Watt, F. M. (1987). Calcium-induced changes in cytoskeleton and motility of cultured human keratinocytes. *Experimental Cell Research*, 172(1), 43–53. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(87\)90091-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(87)90091-7)
- Makoni, P. A., Wa Kasongo, K., & Walker, R. B. (2019). Short Term Stability Testing of Efavirenz-Loaded Solid Lipid Nanoparticle (SLN) and Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Dispersions. *Pharmaceutics*, 11(8), 397. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080397>
- Mamo, T., Moseman, E. A., Kolishetti, N., Salvador-Morales, C., Shi, J., Kuritzkes, D. R., Langer, R., Andrian, U. von, & Farokhzad, O. C. (2010). Emerging nanotechnology approaches for HIV/AIDS treatment and prevention. *Nanomedicine*, 5(2), 269–285. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.1>
- Mathes, S. H., Ruffner, H., & Graf-Hausner, U. (2014). The use of skin models in drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69–70, 81–102. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.006>
- Miana, M., Galán, M., Martínez-Martínez, E., Varona, S., Jurado-López, R., Bausa-Miranda, B., Antequera, A., Luaces, M., Martínez-González, J., Rodríguez, C., & Cachofeiro, V. (2015). The lysyl oxidase inhibitor β -aminopropionitrile reduces body weight gain and improves the metabolic profile in diet-induced obesity in rats. *Disease Models & Mechanisms*, 8(6), 543–551. <https://doi.org/10.1242/dmm.020107>
- Mofazzal Jahromi, M. A., Sahandi Zangabad, P., Moosavi Basri, S. M., Sahandi Zangabad, K., Ghamarypour, A., Aref, A. R., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2018). Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 123, 33–64. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.08.001>
- Moretti, L., Stalfort, J., Barker, T. H., & Abeyayehu, D. (2022). The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation. *Journal of Biological Chemistry*, 298(2), 101530. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101530>
- Muchow, M., Maincent, P., & Müller, R. H. (2008). Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix

- (SLN®, NLC®, LDC®) for Oral Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34(12), 1394–1405. <https://doi.org/10.1080/03639040802130061>
- Murphrey MB, Miao JH, Z. P. (2021). Histology, Stratum Corneum. In *StatPearls [Internet]*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30020671/>
- Murphy, M., & Carmichael, A. J. (2000). Transdermal Drug Delivery Systems and Skin Sensitivity Reactions. *American Journal of Clinical Dermatology*, 1(6), 361–368. <https://doi.org/10.2165/00128071-200001060-00004>
- Naik, P. P., & Farrukh, S. N. (2022). Influence of Ethnicities and Skin Color Variations in Different Populations: A Review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 35(2), 65–76. <https://doi.org/10.1159/000518826>
- Nelson, J. M., Diegelmann, R. F., & Cohen, I. K. (1988). Effect of -Aminopropionitrile and Ascorbate on Fibroblast Migration. *Experimental Biology and Medicine*, 188(3), 346–352. <https://doi.org/10.3181/00379727-188-42745>
- Neubert, R. H. H. (2011). Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.003>
- Niu, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Zhang, X., Liu, X., Zhu, S., Song, Y., Jin, X., Lindholm, B., & Yu, C. (2020). Elevated intracellular copper contributes a unique role to kidney fibrosis by lysyl oxidase mediated matrix crosslinking. *Cell Death & Disease*, 11(3), 211. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2404-5>
- Noblesse, E., Cenizo, V., Bouez, C., Borel, A., Gleyzal, C., Peyrol, S., Jacob, M.-P., Sommer, P., & Damour, O. (2004). Lysyl Oxidase-Like and Lysyl Oxidase Are Present in the Dermis and Epidermis of a Skin Equivalent and in Human Skin and Are Associated to Elastic Fibers. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(3), 621–630. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22330.x>
- Nunes, S., Vieira, J. C., & Melo, C. S. A. (2018). Avaliação da atividade hidratante e protetora da barreira cutânea de produto para uso tópico contendo isomerato de sacarídeo e hidroxietil ureia. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, 10. <https://doi.org/10.5935/scd1984-8773.201810311039>
- ONDRACEK, J.; BOLLER, F.H.; ZULLIGER, H.W.; NIEDERER, R. . (1985). *Comparison among five methods for testing the physical stability of O/W emulsions* (s. n. Acta Pharm. Technol., v.31 (ed.)).
- Pardeike, J., Hommoss, A., & Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1–2), 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>
- Park, J. H., Wi, J. H., Kim, T. S., Kim, S. S., Jeong, C., Sohn, J. E., & Kim, R. (2022). An

- Accelerated Aging Test to Compare the Thermal Stability over Time between the Mint Lift® and the MEDI ROPE. *Applied Sciences*, 12(5), 2311. <https://doi.org/10.3390/app12052311>
- Piipponen, M., Li, D., & Landén, N. X. (2020). The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8790. <https://doi.org/10.3390/ijms21228790>
- Plumlee, K. H. (2004). Plants. In *Clinical Veterinary Toxicology* (pp. 337–442). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-32-301125-X/50028-5>
- PubChem. (2023). 3-Aminopropanenitrile. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Aminopropanenitrile#section=13C-NMR-Spectra>
- Quintanar-Guerrero, D., Tamayo-Esquivel, D., Ganem-Quintanar, A., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(2), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.06.001>
- Rahmasari, D., Rosita, N., & Soeratri, W. (2022). Physicochemical Characteristics, Stability, and Irritability of Nanostructured Lipid Carrier System Stabilized with Different Surfactant Ratios. *JURNAL FARMASI DAN ILMU KEFARMASIAN INDONESIA*, 9(1), 8–16. <https://doi.org/10.20473/jfiki.v9i12022.8-16>
- Ramos, S., Ferreira, S., Fernandes, A. S., & Saraiva, N. (2022). Lysyl Oxidases Expression and Breast Cancer Progression: A Bioinformatic Analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.883998>
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887–913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
- Rawat, M. K., Jain, A., & Singh, S. (2011). Studies on Binary Lipid Matrix Based Solid Lipid Nanoparticles of Repaglinide: in Vitro and in Vivo Evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(6), 2366–2378. <https://doi.org/10.1002/jps.22435>
- Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>
- Rhodes, G. (2006). The Evolutionary Psychology of Facial Beauty. *Annual Review of Psychology*, 57(1), 199–226. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.57.102904.190208>
- Ribeiro, D., Freitas, M., Tomé, S. M., Silva, A. M. S., Porto, G., Cabrita, E. J., Marques, M. M. B., & Fernandes, E. (2014). Inhibition of LOX by flavonoids: a structure–activity relationship study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 72, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.030>

- Rikken, G., Niehues, H., & van den Bogaard, E. H. (2020). *Organotypic 3D Skin Models: Human Epidermal Equivalent Cultures from Primary Keratinocytes and Immortalized Keratinocyte Cell Lines* (pp. 45–61). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0648-3_5
- Rippa, A. L., Kalabusheva, E. P., & Vorotelyak, E. A. (2019). Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells*, 8(6), 607. <https://doi.org/10.3390/cells8060607>
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*, 99(1), 665–706. <https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>
- Roger, M., Fullard, N., Costello, L., Bradbury, S., Markiewicz, E., O'Reilly, S., Darling, N., Ritchie, P., Määttä, A., Karakesisoglou, I., Nelson, G., von Zglinicki, T., Dicolandrea, T., Isfort, R., Bascom, C., & Przyborski, S. (2019). Bioengineering the microanatomy of human skin. *Journal of Anatomy*, 234(4), 438–455. <https://doi.org/10.1111/joa.12942>
- Saeed, K., & Khan, I. (2014). Preparation and properties of single-walled carbon nanotubes/poly(butylene terephthalate) nanocomposites. *Iranian Polymer Journal*, 23(1), 53–58. <https://doi.org/10.1007/s13726-013-0199-2>
- Sakamoto, J. H., van de Ven, A. L., Godin, B., Blanco, E., Serda, R. E., Grattoni, A., Ziemys, A., Bouamrani, A., Hu, T., Ranganathan, S. I., De Rosa, E., Martinez, J. O., Smid, C. A., Buchanan, R. M., Lee, S.-Y., Srinivasan, S., Landry, M., Meyn, A., Tasciotti, E., ... Ferrari, M. (2010). Enabling individualized therapy through nanotechnology. *Pharmacological Research*, 62(2), 57–89. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.12.011>
- Schilter, H., Findlay, A. D., Perryman, L., Yow, T. T., Moses, J., Zahoor, A., Turner, C. I., Deodhar, M., Foot, J. S., Zhou, W., Greco, A., Joshi, A., Rayner, B., Townsend, S., Buson, A., & Jarolimek, W. (2019). The lysyl oxidase like 2/3 enzymatic inhibitor, PXS-5153A, reduces crosslinks and ameliorates fibrosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(3), 1759–1770. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14074>
- Schubert, M. (2003). Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55(1), 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00130-3)
- Seeley, Rod R. Stephens D., Trent, T. P. (2005). *Anatomia & Fisiologia*. 6ª Edição.
- Setargew, Y. F. I., Wyllie, K., Grant, R. D., Chitty, J. L., & Cox, T. R. (2021). Targeting Lysyl Oxidase Family Mediated Matrix Cross-Linking as an Anti-Stromal Therapy in Solid Tumours. *Cancers*, 13(3), 491. <https://doi.org/10.3390/cancers13030491>
- Sguizzato, M., Esposito, E., & Cortesi, R. (2021). Lipid-Based Nanosystems as a Tool to Overcome Skin Barrier. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8319. <https://doi.org/10.3390/ijms22158319>
- Sherif, H. M. F. (2010). In search of a new therapeutic target for the treatment of genetically

- triggered thoracic aortic aneurysms and cardiovascular conditions: insights from human and animal lathyrism. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 11(3), 271–276. <https://doi.org/10.1510/icvts.2010.239681>
- Siddikuzzaman, Grace, V. M. B., & Guruvayoorappan, C. (2011). Lysyl oxidase: a potential target for cancer therapy. *Inflammopharmacology*, 19(3), 117–129. <https://doi.org/10.1007/s10787-010-0073-1>
- Sigmund, W., Yuh, J., Park, H., Maneeratana, V., Pyrgiotakis, G., Daga, A., Taylor, J., & Nino, J. C. (2006). Processing and Structure Relationships in Electrospinning of Ceramic Fiber Systems. *Journal of the American Ceramic Society*, 89(2), 395–407. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2005.00807.x>
- Silva, A. C., González-Mira, E., García, M. L., Egea, M. A., Fonseca, J., Silva, R., Santos, D., Souto, E. B., & Ferreira, D. (2011). Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(1), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.035>
- Simon, G. A., & Maibach, H. I. (2000). The Pig as an Experimental Animal Model of Percutaneous Permeation in Man: Qualitative and Quantitative Observations – An Overview. *Skin Pharmacology and Physiology*, 13(5), 229–234. <https://doi.org/10.1159/000029928>
- Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hager, S., Hauser, J., & Mirastschijski, U. (2017). Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, 58(1–2), 81–94. <https://doi.org/10.1159/000454919>
- Souto, E. B., Baldim, I., Oliveira, W. P., Rao, R., Yadav, N., Gama, F. M., & Mahant, S. (2020). SLN and NLC for topical, dermal, and transdermal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(3), 357–377. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1727883>
- Souto, E. B., Figueiro, J. F., Fernandes, A. R., Cano, A., Sanchez-Lopez, E., Garcia, M. L., Severino, P., Paganelli, M. O., Chaud, M. V., & Silva, A. M. (2022). Physicochemical and biopharmaceutical aspects influencing skin permeation and role of SLN and NLC for skin drug delivery. *Heliyon*, 8(2), e08938. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08938>
- Steinr  sser, I., & Merkle, H. P. (1995). Dermal metabolism of topically applied drugs: Pathways and models reconsidered. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70(1), 3–24. [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(94\)00047-Y](https://doi.org/10.1016/0031-6865(94)00047-Y)
- Subramaniam, T., Fauzi, M. B., Lokanathan, Y., & Law, J. X. (2021). The Role of Calcium in Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6486. <https://doi.org/10.3390/ijms22126486>
- Sun, S., Murray, C. B., Weller, D., Folks, L., & Moser, A. (2000). Monodisperse FePt

- Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices. *Science*, 287(5460), 1989–1992. <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.1989>
- Teppo, S., Sundquist, E., Vered, M., Holappa, H., Parkkisenniemi, J., Rinaldi, T., Lehenkari, P., Grenman, R., Dayan, D., Risteli, J., Salo, T., & Nyberg, P. (2013). The hypoxic tumor microenvironment regulates invasion of aggressive oral carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 319(4), 376–389. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.12.010>
- Thiruvengadam, M., Rajakumar, G., & Chung, I.-M. (2018). Nanotechnology: current uses and future applications in the food industry. 3 *Biotech*, 8(1), 74. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1104-7>
- Trotta, M., Debernardi, F., & Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 257(1–2), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00135-2)
- Tuckman, A. (2017). The Potential Psychological Impact of Skin Conditions. *Dermatology and Therapy*, 7(S1), 53–57. <https://doi.org/10.1007/s13555-016-0169-7>
- Ud-Din, S., & Bayat, A. (2017). Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair and Regeneration*, 25(2), 164–176. <https://doi.org/10.1111/wrr.12513>
- Umscheid, C. A., Margolis, D. J., & Grossman, C. E. (2011). Key Concepts of Clinical Trials: A Narrative Review. *Postgraduate Medicine*, 123(5), 194–204. <https://doi.org/10.3810/pgm.2011.09.2475>
- Urpe, M., Pallanti, S., & Lotti, T. (2005). Psychosomatic Factors in Dermatology. *Dermatologic Clinics*, 23(4), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.det.2005.05.021>
- Wallace HA, Basehore BM, Z. P. (2020). Wound Healing Phases. In *StatPearls [Internet]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/>
- Wang, P.-H., Huang, B.-S., Horng, H.-C., Yeh, C.-C., & Chen, Y.-J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>
- Wang, W., Wang, X., Yao, F., & Huang, C. (2022). Lysyl Oxidase Family Proteins: Prospective Therapeutic Targets in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12270. <https://doi.org/10.3390/ijms232012270>
- Weems, A. C., Boyle, A. J., & Maitland, D. J. (2017). Two-year performance study of porous, thermoset, shape memory polyurethanes intended for vascular medical devices. *Smart Materials and Structures*, 26(3), 035054. <https://doi.org/10.1088/1361-665X/aa59ec>
- Westermann, T. V. A., Viana, V. R., Berto Junior, C., Detoni da Silva, C. B., Carvalho, E. L. S., & Pupe, C. G. (2020). Measurement of skin hydration with a portable device (SkinUp® Beauty Device) and comparison with the Corneometer®. *Skin Research and Technology*,

- 26(4), 571–576. <https://doi.org/10.1111/srt.12833>
- Wickett, R. R., & Visscher, M. O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, 34(10), S98–S110. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.295>
- Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, 10(9), 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>
- Wilson, V. G. (2013). *Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes* (pp. 33–41). https://doi.org/10.1007/7651_2013_42
- Wolf, M., Klang, V., Stojcic, T., Fuchs, C., Wolzt, M., & Valenta, C. (2018). NLC versus nanoemulsions: Effect on physiological skin parameters during regular in vivo application and impact on drug penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, 549(1–2), 343–351. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.007>
- Woodley, D. T. (2017). Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis. *Dermatologic Clinics*, 35(1), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.det.2016.07.004>
- Xiao, Q., & Ge, G. (2012). Lysyl Oxidase, Extracellular Matrix Remodeling and Cancer Metastasis. *Cancer Microenvironment*, 5(3), 261–273. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0105-z>
- Yang, N., Cao, D.-F., Yin, X.-X., Zhou, H.-H., & Mao, X.-Y. (2020). Lysyl oxidases: Emerging biomarkers and therapeutic targets for various diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110791. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110791>
- Yang, S.-I., Park, H.-Y., Lee, S.-H., Lee, S.-J., Han, O.-Y., Lim, S.-C., Jang, C.-G., Lee, W.-S., Shin, Y.-H., Kim, J.-J., & Lee, S.-Y. (2004). Transdermal Eperisone Elicits more Potent and Longer-Lasting Muscle Relaxation than Oral Eperisone. *Pharmacology*, 71(3), 150–156. <https://doi.org/10.1159/000077449>
- Yetisen, A. K., Qu, H., Manbachi, A., Butt, H., Dokmeci, M. R., Hineostroza, J. P., Skorobogatiy, M., Khademhosseini, A., & Yun, S. H. (2016). Nanotechnology in Textiles. *ACS Nano*, 10(3), 3042–3068. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b08176>
- Yew YW, Kuan AHY, Ge L, Yap CW, H., & BH. (2020). Psychosocial impact of skin diseases: A population-based study. *Plus One*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244765>
- Zhang, M., Gu, L., Zheng, P., Chen, Z., Dou, X., Qin, Q., & Cai, X. (2020). Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(1). <https://doi.org/10.1002/jcla.23024>