

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

THAIS FRANCENI DE OLIVEIRA

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA A ENTREGA CONTROLADA DE
LUTEÍNA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E CITOTOXICIDADE

PONTA GROSSA

2024

THAIS FRANCENI DE OLIVEIRA

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA A ENTREGA CONTROLADA DE
LUTEÍNA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E CITOTOXICIDADE

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de
Concentração Atenção Interdisciplinar em
Saúde.

Orientadora: Prof^a Dra. Patrícia Mathias Döll
Boscardin

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA

2024

O48 Oliveira, Thais Franceni de
Nanocápsulas poliméricas para entrega controlada de luteína:
desenvolvimento, caracterização, atividade antioxidante e citotoxicidade / Thais
Franceni de Oliveira. Ponta Grossa, 2024.
94 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração:
Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Mathias Döll Boscardin.
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

1. Nanotecnologia. 2. Nanocápsulas. 3. Carotenoide. 4. Pele. 5.
Antienvhecimento. I. Boscardin, Patrícia Mathias Döll. II. Farago, Paulo Vitor. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

CDD: 616.5

THAIS FRANCENI DE OLIVEIRA

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA A ENTREGA CONTROLADA DE
LUTEÍNA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E CITOTOXICIDADE

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Ciências da
Saúde na Universidade Estadual de
Ponta Grossa, área de Concentração
Atenção Interdisciplinar em Saúde.

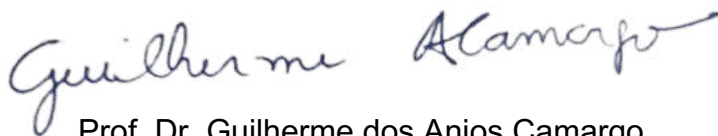
Ponta Grossa, 24 de junho de 2024.



Profa. Dra. Patrícia Mathias Döll Boscardin – Orientadora
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Documento assinado digitalmente
 CAMILA DELINSKI BET
Data: 22/07/2024 16:13:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Camila Delinski Bet
Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR)



Prof. Dr. Guilherme dos Anjos Camargo
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Dedico este trabalho à minha querida mãe Marineli (*in memoriam*), cujo empenho em me educar sempre veio em primeiro lugar. Aqui estão os resultados dos seus esforços. Com muita gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me reerguer diante das adversidades da vida, e permitir que eu tivesse saúde e determinação para a realização deste trabalho.

À minha família, que me incentivou nos momentos difíceis e compreendeu a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo este período.

Aos meus colegas de turma, por compartilharem comigo tantos momentos de descobertas e aprendizado e por todo o companheirismo ao longo deste percurso.

À minha querida orientadora prof^a Dr^a Patrícia Mathias Döll Boscardin, onde desde o início tivemos uma empatia muito grande uma pela outra. Sou grata pela oportunidade, pelo incentivo, pela paciência que teve comigo, por me encorajar a não desistir quando eu achava que não conseguiria, pelos conselhos, pelas tardes de experimentos e conversas à toa, por ter me permitido fazer parte do seu grupo de pesquisa e por abrir as portas do laboratório para mim. Por confiar no meu trabalho e por todo conhecimento que dividiu comigo. Pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como mestrandia. Me sinto orgulhosa por termos chegado até aqui, e ainda mais por tudo que conseguimos desenvolver. Muito obrigada por tudo profe, a levarei sempre no meu coração.

Ao meu co orientador prof. Dr Paulo Vitor Farago, primeiramente por ter me escolhido para ingressar no mestrado, juntamente, com a prof^a Patrícia, quando eu mesma duvidava da minha capacidade. Agradeço pela oportunidade que me deram, pela confiança, pelo respeito e por toda ajuda. Sou imensamente grata por tudo!

Ao prof. Eduardo Bauml Campagnoli, pela sua competência em coordenar o Programa, sempre muito gentil em nos ajudar a resolver os problemas, além de ser um excelente mestre. Quão enriquecedor foi participar de suas aulas. Muito obrigada!

Ao prof. Dr Guilherme Camargo, por toda ajuda durante o mestrado. Pelas dicas fundamentais que me deu, pelo suporte nas análises de resultados, e principalmente pelas correções e contribuições que fez no exame de qualificação. Muito obrigada por tudo!

À profª Drª Carla Cristine Kanunfre, por nos ceder seu laboratório enquanto realizamos os ensaios de citotoxicidade. Muito obrigada!

À minha querida colega de laboratório Ana Beatriz Klosowski, por toda sua contribuição e ensinamentos com os experimentos de cultivo celular. Foram essenciais para que eu conseguisse reproduzir os ensaios. Muito obrigada!

Ao meu colega Elton Kazmierczak, por suas contribuições no trabalho e por todo conhecimento adquirido nos ensaios de atividade antioxidante. Muito obrigada!

À minha querida colega Marcela, por me ajudar com o pontapé inicial do projeto, pelas dicas valiosas, pela paciência que teve em me ajudar, por me dar a direção para que eu conseguisse andar com as próprias pernas. Foram dias muito agradáveis no laboratório. Muito obrigada!

À minha querida amiga Brenda, por tudo! Não tenho palavras para agradecer por toda ajuda, por despende do seu tempo e me ajudar nos experimentos. Pelas informações que me deu, desde as mais complexas, até as mais básicas que eu não tinha conhecimento. Obrigada pela forma pacienciosa que sempre me explicava algo quando eu não entendia. Pelas incontáveis risadas que demos, incluindo risos de desespero, pelas playlists que compartilhamos, pelas manhãs e tardes muito agradáveis que passamos no laboratório, e acima de tudo pelo privilégio de ter a sua amizade. Sem você eu não teria conseguido. Infinitamente obrigada por tudo!

À profª Drª Rosana Letícia da Rosa, por aceitar o convite para compor a banca de qualificação, contribuindo com suas sugestões e correções. Muito obrigada!

Aos membros da banca de defesa, prof. Dr Guilherme dos Anjos Camargo, profª Drª Camila Bet, profª Drª Rosana Letícia da Rosa e profª Drª Jéssica Mendes

Nadal, por aceitarem o convite para compor a banca, e pelo tempo destinado à correção do trabalho e todas as contribuições a serem realizadas.

Às queridas laboratoristas Josemira e Ely, por me acolherem tão bem desde o primeiro dia. Sempre prestativas e muito dispostas a nos ajudar. Obrigada pelo carinho e amizade que cultivamos durante estes dois anos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde UEPG, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao CLABMU e CLABMU-SEBISA, com seus técnicos por todas as análises realizadas.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa por abrir suas portas para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela oportunidade da bolsa de mestrado.

RESUMO

A luteína é um carotenoide natural conhecido pela sua alta capacidade antioxidante, e, por isso, tem um potencial uso em produtos antienvhecimento. No entanto, a sua instabilidade a luz, calor e oxigênio, bem como a baixa solubilidade em água limitam sua biodisponibilidade na pele. O desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos nanoestruturados contendo luteína apresenta-se como uma abordagem interessante para otimizar suas características e favorecer sua penetração na pele. Dessa forma, buscou-se desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antioxidante e a citotoxicidade de nanocápsulas poliméricas, contendo luteína, empregando o polímero poli (ϵ -caprolactona). Os sistemas foram obtidos pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e caracterizados por meio de estudos físico-químicos de espalhamento dinâmico de luz (DLS), mobilidade eletroforética e pH em potenciômetro calibrado; morfológicos por MEV-FEG e estrutural por DRX e FTIR. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de FRAP, DPPH• e ABTS^{•+} e a citotoxicidade foi avaliada *in vitro* em fibroblastos de linhagem 3T3. As nanocápsulas poliméricas contendo luteína foram obtidas com êxito pelo método escolhido. Na análise morfológica, as nanocápsulas apresentam formato esférico com superfície lisa, regular, tamanho nanométrico e homogêneo em consonância com os resultados do DLS, onde foi observado nanocápsulas com aproximadamente 300 nm, índice de polidispersão de 0,2 e potencial zeta próximo a - 30 mV. As amostras apresentaram pH entre $5,02 \pm 0,023$ a $5,94 \pm 0,037$. O DRX confirmou que o método de encapsulação foi eficiente e o fármaco encontra-se prioritariamente em dispersão molecular no núcleo oleoso das nanocápsulas. O FTIR assegurou que não houve ligações químicas entre a luteína e a PCL. As temperaturas ambiente e de 4 °C preservaram as características dos nanossistemas por 30 dias. A veiculação da luteína em nanocápsulas garantiu alta eficácia da atividade antioxidante nos métodos avaliados. Os ensaios de viabilidade celular confirmaram que a luteína não apresentou toxicidade em células de fibroblastos em concentrações menores que 6,25% (v/v) em relação ao controle. Dessa maneira, os resultados obtidos fornecem uma base experimental que viabiliza o uso de nanocápsulas de luteína revestida por PCL como uma alternativa viável e inovadora para administração cutânea da luteína.

Palavras-chave: Nanotecnologia; nanocápsulas; carotenoide; pele; antienvhecimento.

ABSTRACT

Lutein is a natural carotenoid known for its high antioxidant capacity, thus potentially useful in anti-aging products. However, its instability to light, heat, and oxygen, as well as low water solubility, limit its bioavailability in the skin. The development of nanostructured drug delivery systems containing lutein presents an interesting approach to optimize its characteristics and enhance skin penetration. Thus, efforts were made to develop, characterize, and evaluate the antioxidant activity and cytotoxicity of polymeric nanocapsules containing lutein, employing poly(ϵ -caprolactone) polymer. The systems were obtained by the pre-formed polymer interfacial deposition method and characterized through physicochemical studies using dynamic light scattering (DLS), electrophoretic mobility, and pH measurements in a calibrated potentiometer; morphological analysis by FEG-SEM and structural analysis by XRD and FTIR. Antioxidant activity was evaluated using FRAP, DPPH• and ABTS•+ methods and cytotoxicity was evaluated *in vitro* on fibroblasts-3T3. Polymeric nanocapsules containing lutein were successfully obtained using the chosen method. Morphologically, the nanocapsules exhibited a spherical shape with smooth, regular surfaces, nanometric and homogeneous size, consistent with DLS results, showing nanocapsules of approximately 300 nm, a polydispersity index of 0.2, and a zeta potential near to - 30 mV. The samples exhibited pH levels ranging from 5.02 ± 0.023 to 5.94 ± 0.037 . The X-ray diffraction confirmed that the encapsulation method was efficient, and the drug is primarily in molecular dispersion within the oily core of the nanocapsules. The FTIR confirmed that there were no chemical bonds between lutein and PCL. Ambient and 4 °C temperatures preserved the characteristics of the nanosystems for 30 days. Lutein encapsulation in nanocapsules ensured high efficacy of antioxidant activity in the evaluated methods. Cell viability assays confirmed that lutein did not present toxicity in fibroblast cells at concentrations lower than 6.25% (v/v) compared to the control. Thus, the results provide an experimental basis supporting the use of PCL-coated lutein nanocapsules as a viable and innovative alternative for cutaneous administration of lutein.

Keywords: Nanotechnology; Nanocapsule; carotenoid; skin; anti-aging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Camadas da pele.....	22
Figura 2	–	Estrutura química da luteína.....	26
Figura 3	–	Luteína e seu isômero zeaxantina.....	26
Figura 4	–	Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	30
Figura 5	–	Aplicação tópica de nanopartículas e sua difusão cutânea.....	32
Figura 6	–	Estrutura química da poli(ε- caprolactona).....	33
Figura 7	–	Diferentes rotas de síntese de PCL.....	34
Figura 8	–	Fluxograma ilustrativo das etapas da pesquisa.....	42
Figura 9	–	Resumo gráfico da pesquisa.....	43
Figura 10	–	Esquema do método de obtenção das nanocápsulas poliméricas contendo luteína preparadas pela deposição interfacial do polímero pré-formado.....	45
Figura 11	–	Esquema da reação de redução de íons Fe^{3+} para Fe^{2+} na presença de um agente antioxidante e 1,10-fenantrolina.....	47
Figura 12	–	Mecanismo para a determinação da atividade antioxidante via redução do radical ABTS•+.....	48
Figura 13	–	Estrutura do radical DPPH e DPPH reduzido.....	50
Figura 14	–	Análise macroscópica das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) e nanocápsulas de PCL brancas, com ausência de luteína (NCB).....	53
Figura 15	–	Esquema da estrutura de nanocápsulas poliméricas obtidas pelo	

	método de nanoprecipitação.....	54
Figura 16	– Análise morfológica das nanopartículas contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) e nanopartículas com ausência de luteína (NCB), por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG).....	59
Figura 17	– Análise morfológica da luteína pura, PCL triturada e mistura física (PCL: luteína) por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG).....	60
Figura 18	– Difratoograma da luteína, PCL, da mistura física e nanocápsulas.....	62
Figura 19	– Espectros de FTIR da luteína pura, PCL, MF, lactose (LAC) e nanocápsulas poliméricas (NCL-1, NCL-2 e NCB).....	63
Figura 20	– Aspectos macroscópicos das NCs (NCL-1, NCL-2 e NCB) armazenadas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente (T.A.), estufa (37 °C) e geladeira (4 °C) durante 30 dias para o estudo de estabilidade	66

LISTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1	–	Estudo de estabilidade das NCL-1, NCL-2 e NCB dependendo do diâmetro médio (nm).....	68
Gráfico 2	–	Estudo de estabilidade das NCL-1, NCL-2 e NCB dependendo do Índice de polidispersão (IPD).....	70
Gráfico 3	–	Estudo de estabilidade das NCL-1, NCL-2 e NCB dependendo do potencial zeta (mV).....	72
Gráfico 4	–	Estudo de estabilidade das NCL-1, NCL-2 e NCB dependendo do pH.	74
Gráfico 5	–	Efeito das nanocápsulas contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, após 24 horas, pelo método do MTT..	79

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	– Estudos relativos à associação de carotenoides com sistemas nanoestruturados.....	37
Tabela 2	– Formulação das nanocápsulas de PCL contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) e nanocápsulas de PCL brancas , com ausência de luteína (NCB), obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado.....	44
Tabela 3	– Resultados obtidos para a caracterização Físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo luteína e controle negativo.	55
Tabela 4	– Atividade antioxidante da luteína livre (LUT), nanocápsula branca (NCB), nanocápsula com luteína (NCL-1 e NCL-2).....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS ⁺⁺	(2,2'-azino-bis-3- etilbenzotiazolina-6-sulfonato de amônio)
CO ₂	Dióxido de carbono
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMEM	Meio Dullbecco MEM
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPPH•	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
DRX	Difração de raios X
EAA	Equivalente de ácido ascórbico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético di-hidratado
EE%	Eficiência de encapsulação
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRAP	Poder antioxidante redutor de ferro
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de <i>Fourier</i>
HAT	Átomos de hidrogênio
HO1	heme-oxigenase 1
ICAM-1	adesão intermolecular molécula 1
IPD	Índice de Polidispersão
LAC	Lactose
LUT	Luteína
MEC	Matriz extracelular
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura acoplado com emissão de campo
MF	Mistura física
MMP's	Metaloproteinases de matriz
MMP-1	Metalloproteinase de matriz 1
MTT	Brometo de 3- [4,5- dimetil- tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NC's	Nanocápsulas poliméricas
NCB	Nanocápsulas poliméricas com ausência de luteína
NCL	Nanocápsulas poliméricas carregadas com luteína

NCL-1	Formulação de nanocápsulas contendo 0,08g de luteína
NCL-2	Formulação de nanocápsulas contendo 0,16g de luteína
PBS	Tampão fosfato
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PGLA-PEG	(Poli Ácido Lático-Co Ácido- glicólico) Peguilado
PZ	Potencial zeta
SFB	Soro fetal bovino
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UV-VIS	Ultravioleta/Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Celsius
kV	Kilovolt
μL	Microlitro
mV	Milivolt
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
Tg	Transição vítrea

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1	PELE.....	22
3.2	ENVELHECIMENTO.....	24
3.3	ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA LUTEÍNA.....	25
3.4	NANOTECNOLOGIA.....	28
3.5	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	29
3.6	POLI (ε - CAPROLACTONA) – PCL.....	33
3.7	NANOESTRUTURAS PARA VEICULAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES.....	35
3.8	NANOPARTÍCULAS CONTENDO LUTEÍNA.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	SUBSTÂNCIAS E REAGENTES.....	39
4.1.1	Fármaco.....	39
4.1.2	Produção das Nanopartículas.....	39
4.1.3	Ensaio de Citotoxicidade.....	39
4.1.4	Ensaio de Avaliação da Atividade Antioxidante.....	40
4.1.5	Outros Reagentes.....	40
4.2	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	40
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	41
4.4	DESENVOLVIMENTO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO LUTEÍNA.....	44
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO LUTEÍNA.....	45
4.5.1	Liofilização.....	45

4.5.2	Caracterização Físico-Química.....	45
4.5.3	Caracterização Morfológica.....	46
4.5.3.1	Análise de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG).....	46
4.5.4	Caracterização Estrutural.....	46
4.5.4.1	Análise de difração de raios x (DRX).....	46
4.5.4.2	Avaliação por espectroscopia no infravermelho por transformada de <i>fourier</i> (FTIR).....	46
4.6	AVALIAÇÃO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	47
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	47
4.7.1	Avaliação do Poder Antioxidante Redutor de Ferro – FRAP.....	47
4.7.2	Determinação da Capacidade Inibitória do Cátion-Radical ABTS.....	48
4.7.3	Determinação da Capacidade Inibitória do Cátion-Radical DPPH.....	49
4.8	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT.....	50
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1	OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO LUTEÍNA.....	53
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE LUTEÍNA.....	55
5.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE SUPERFÍCIE DAS NANOCÁPSULAS.....	57
5.4	ANÁLISE ESTRUTURAL.....	61
5.4.1	Análise de Difração de Raios X (DRX).....	61
5.4.2	Avaliação por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de <i>Fourier</i> (FTIR).....	63
5.5	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS.....	64
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	76
5.7	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	78
6	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS.....	82

APÊNDICE – RESUMOS APRESENTADOS DURANTE O MESTRADO.....	91
--	-----------

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que o envelhecimento cutâneo é um processo natural e complexo, influenciado por uma variedade de fatores que agem simultaneamente, que incluem predisposição genética, fatores epigenéticos e influências ambientais. Esses fatores provocam alterações cumulativas, tanto estruturais como fisiológicas na pele, e resultam no aparecimento de rugas, perda de elasticidade, manchas e flacidez (Dai *et al.* 2023; Quan, 2023).

Como a pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha papel fundamental na proteção contra agressões externas, torna-se essencial entender como o envelhecimento cutâneo pode ser retardado ou minimizado (Junqueira; Carneiro, 2013; Vênus; Waterman; McNab, 2011; Sharma; Kuhad; Bhandari, 2022). Devido a isso, percebe-se um maior interesse dos consumidores por produtos que reduzam os sinais do envelhecimento, sobretudo por produtos sustentáveis e de origem natural (Sharma; Kuhad; Bhandari, 2022).

Nesse contexto, a luteína, um carotenoide derivado do metabolismo secundário das plantas, tem se destacado pelas suas propriedades biológicas na pele, principalmente por seu potencial antioxidante, que pode contribuir para a redução dos danos causados por radicais livres, relacionado ao aparecimento de sinais de envelhecimento cutâneo (Sharma; Kuhad; Bhandari, 2022; Zaid *et al.*, 2022; Flieger *et al.* 2024).

Estudos científicos sugerem que a luteína pode ajudar a proteger a pele contra danos causados pelos raios ultravioleta (UV) do sol, reduzir a formação de rugas e melhorar a hidratação e a elasticidade da pele. Além disso, a luteína pode atuar como um fotoprotetor oral, complementando a proteção oferecida pelos filtros solares tópicos (Zaid *et al.* 2022; Sharma; Kuhad; Bhandari, 2022; De Ávila; Primo, 2021; Flieger *et al.*, 2024).

Apesar das potencialidades da aplicação da luteína, seu uso representa um desafio tecnológico a ser superado, pois se decompõe facilmente na presença de calor, luz e oxigênio, que somado a sua baixa solubilidade aquosa, apresenta fraca farmacocinética. Decorrente disso, causa baixa biodisponibilidade, o que pode reduzir a sua interação com organismo e, conseqüentemente, restringir o seu potencial na aplicação clínica, sobretudo na pele (Kotake-Nara; Nagao, 2011; Mitra *et al.*, 2021; Nikhat *et al.*, 2022).

Tendo em vista essas condições, os sistemas de dimensões nanométricas (1×10^{-9} m), em especial as nanocápsulas poliméricas, representam uma estratégia interessante, pois proporcionam a preservação das características do ativo e garantem maior estabilidade físico-química, além de promover liberação controlada e sustentada, principalmente de substâncias lipofílicas como a luteína (Schaffazick *et al.*, 2003; Maleki; Karimpour; Maleki Dizaj, 2018; Brum, 2017; Sharma; Kuhad; Bhandari, 2022; Balić; Mokos, 2019; Zaid *et al.*, 2022).

Nesse sentido, com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade e/ou eficácia terapêutica de carotenoides, sistemas nanoestruturados têm sido pesquisados, com vistas a aumentar a atividade antioxidante da luteína (Lacatusu *et al.*, 2013), licopeno (Mennati *et al.*, 2021; Lia *et al.*, 2017), curcumina (Taleb *et al.*, 2023) e β -caroteno (Azhar *et al.*, 2023), sobretudo com o uso de nanopartículas poliméricas.

A poli (ϵ -caprolactona), mais conhecida pela sua sigla (PCL) é um polímero muito utilizado no desenvolvimento desse tipo de sistema, visto que possui ótimas propriedades para uso como biomaterial, por ser biodegradável, biocompatível, de custo baixo, atóxico, resistente, compatível com diversos solventes e demais biomateriais, por isso, pode favorecer a ação biológica da luteína na pele (Abamor *et al.*, 2018; Bose *et al.*, 2019; Janmohammadi; Nourbakhsh, 2018).

Apesar de todos os benefícios supracitados, a quantidade de estudos envolvendo sistemas de liberação controlada com a luteína na pele é reduzida. Nanopartículas poliméricas foram encontradas na literatura para veiculação da luteína, mas não foram encontrados estudos com nanocápsulas do poliéster biodegradável PCL para a sua aplicação tópica.

Portanto, diante das potencialidades das nanopartículas poliméricas somado às propriedades biológicas que a luteína apresenta, o presente trabalho visou desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antioxidante e citotoxicidade *in vitro* de nanocápsulas poliméricas contendo luteína, visando sua aplicação tópica no tratamento dos sinais de envelhecimento cutâneo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antioxidante e citotoxicidade *in vitro* de nanocápsulas poliméricas de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) contendo luteína, visando sua aplicação tópica no tratamento dos sinais de envelhecimento cutâneo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver nanocápsulas poliméricas a partir do poliéster biodegradável poli (ϵ -caprolactona) contendo luteína, segundo o método de deposição do polímero pré-formado seguido pela evaporação do solvente.
- Efetuar a caracterização das nanocápsulas poliméricas por meio das análises físico-químicas, morfológicas e estruturais;
- Investigar a estabilidade físico-química das nanocápsulas poliméricas com e sem luteína pela determinação do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH durante armazenamento em temperatura ambiente, refrigerada e de estufa.
- Analisar a atividade antioxidante das nanocápsulas poliméricas por meio dos ensaios de redução do Ferro (FRAP), de inibição do radical DPPH• e inibição do cátion-radical ABTS^{•+}.
- Avaliar a citotoxicidade das nanocápsulas poliméricas por meio do ensaio de redução de MTT.

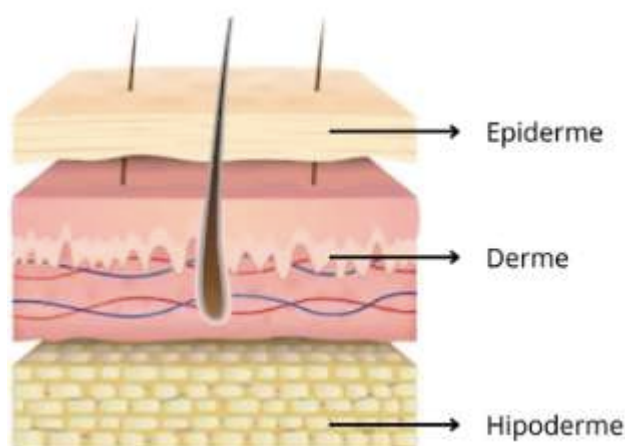
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PELE

A pele é tida como o maior órgão humano, abrangendo uma área de superfície em torno de 1,5 a 2,0 m², o que representa aproximadamente cerca de 16% do peso corporal (Vênus; Waterman; McNab, 2011). De pH entre 4,5 e 5,5, é constituída por uma estrutura extremamente organizada e especializada. Suas principais funções consistem em manter a homeostase e proteger o corpo humano contra a entrada de patógenos e agentes nocivos (químicos e físicos), evitar a perda de água e fluidos extracelulares, regular a temperatura corporal, assim como atuar na percepção sensorial, resistência mecânica, reações imunológicas e na síntese de hormônios (Mcknight; Xá; Hargest, 2022; Vênus; Waterman; McNab, 2011; Gilaberte *et al.*, 2016; Schmid-Wedtner; Korting, 2006).

É composta por três camadas: a epiderme, camada mais superior; a derme, camada intermediária e a hipoderme, camada mais profunda (Chu, 2008; Junqueira; Carneiro, 2013). As camadas da pele estão presentes na Figura 1.

Figura 1 - Camadas da pele



Fonte: Adaptado de Shutterstock (2018).

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado, formado por: queratinócitos (90% do total de células), células de Langerhans, que garantem a vigilância imunológica; os melanócitos, que permitem a pigmentação da pele; e as

células de Merkel, que estão envolvidas na sensação mecânica (Junqueira; Carneiro, 2013; Losquadro, 2017).

A camada córnea é a camada mais externa da epiderme, composta por células anucleadas achatadas, organizadas em lamelas e são envolvidas por uma matriz lipídica contínua. Abaixo dela, encontra-se a camada granulosa onde são produzidos constituintes estruturais. Segue-se com a camada espinhosa, contendo células poliédricas, com núcleo arredondado e grandes feixes de queratina, em que se formam anexos intercelulares chamados desmossomos. Por fim, a camada basal é formada por queratinócitos em forma de coluna, mitoticamente ativos ligados por filamentos de queratina (Chu, 2008; Junqueira; Carneiro 2013; Losquadro, 2017).

Abaixo da epiderme está situada a derme, essa, por sua vez, constituída essencialmente por tecido conjuntivo formado por fibras colágenas, elásticas e substância amorfa, constituintes responsáveis por proporcionar força, elasticidade, viscosidade e hidratação à pele (Gilaberte *et al.*, 2016). A principal célula da derme é o fibroblasto, responsável pela secreção de muitas das proteínas da matriz extracelular (MEC), também estão presentes células de defesa imunológicas como macrófagos e linfócitos; bem como vasos sanguíneos, fibras nervosas e anexos cutâneos como: folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (Chu, 2008; Junqueira, Carneiro 2013; Vênus, Waterman, McNab, 2011).

O colágeno é o principal constituinte da derme, pertence a uma família de proteínas presentes em toda pele e tecido conjuntivo do corpo humano. Os tipos que estão presentes em maior quantidade na pele são o colágeno tipo I, que compreende aproximadamente 80% da derme, conferindo resistência a tração, e o colágeno tipo III, representando aproximadamente 15%, responsável pela flexibilidade da pele (Losquadro, 2017). A hipoderme é formada por células adiposas, envolvidas por tecido conjuntivo frouxo, que possuem como função a reserva de energia, isolamento e proteção contra choques físicos (Junqueira; Carneiro, 2013).

A pele atua como barreira protetora, imunológica e sensorial. Sua exposição ao meio ambiente pode resultar em danos à matriz extracelular, ocasionando alterações físicas, químicas e mecânicas, incluindo o aparecimento de sinais de envelhecimento cutâneo como rugas, perda de elasticidade, manchas e flacidez (Boismal *et al.*, 2020; Rorteau *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2013).

3.2 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento cutâneo é um processo natural e complexo, influenciado por uma variedade de fatores que agem simultaneamente, incluindo predisposição genética, fatores epigenéticos e influências ambientais. Esses fatores são responsáveis por causar alterações funcionais ao longo do tempo, o que perturba o funcionamento das células, tecidos e órgãos, levando em última análise ao aparecimento de doenças e à mortalidade (Dai *et al.*, 2023; Quan, 2023). Dessa forma, o envelhecimento da pele vai além de uma preocupação estética, mas também a problemas de pele relacionados à idade.

Esse processo é um sinal altamente visível e proeminente, que ocupa uma posição central nas interações sociais e visuais. Como resultado, a aparência da pele pode afetar significativamente a qualidade de vida (Quan, 2023). Existem dois tipos de envelhecimento cutâneo: envelhecimento intrínseco ou cronológico, que ocorre naturalmente com o tempo devido a fatores genéticos, metabólicos e hormonais; e envelhecimento extrínseco, causado pela exposição cumulativa à poluição, consumo de drogas, sedentarismo, alimentação inadequada e radiação UV, levando a danos oxidativos nas células e envelhecimento prematuro (Sharma; Kuhad; Bhandari, 2022; Quan, 2023).

Durante o processo de envelhecimento, a pele sofre uma série de transformações histológicas e moleculares, muitas vezes caracterizadas por um afinamento e achatamento da epiderme, juntamente com danos à derme causados pela fragmentação das fibras de colágeno. A desregulação da renovação da MEC, especialmente a degradação das fibras de colágeno pelas metaloproteinases de matriz (MMPs) e outras proteases, é um dos eventos moleculares cruciais que caracterizam o envelhecimento da pele (Quan; Fisher, 2015).

O colágeno junto a elastina são as principais proteínas estruturais da pele e sua perda ou fragmentação leva à diminuição da elasticidade, firmeza e resiliência, bem como ao aparecimento de rugas e linhas finas de expressão. Tanto o envelhecimento intrínseco como o extrínseco estão associados a um declínio na síntese de colágeno e elastina ou ao aumento na degradação de colágeno e elastina (Sharma; Kuhad; Bhandari, 2022; Quan, 2023).

Além do envelhecimento intrínseco e extrínseco, as mulheres ainda sofrem os processos do envelhecimento climatério, que está relacionado à redução da

secreção de estrogênios (Tončić *et al.*, 2018). Este hormônio é conhecido por sua capacidade de inibir MMPs, prevenindo a degradação de colágeno, aumentando a hidratação e elasticidade da pele, bem como favorecendo a proliferação de queratinócitos e fibroblastos, o que melhora a cicatrização de feridas (Lephart, 2018; Tončić *et al.*, 2018).

Segundo o relatório sobre o envelhecimento da População Mundial das Nações Unidas (United Nations, 2023), espera-se que o número de pessoas com mais de 65 anos duplique até 2050 e que pessoas com mais de 80 anos quadruplicam até 2100. Esse cenário ressalta a importância de preservar a integridade funcional e anatômica da pele.

Diante desse panorama, produtos naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias estão ganhando cada vez mais aceitação e demanda da sociedade. Esses produtos visam neutralizar os efeitos do envelhecimento cutâneo. Um exemplo desses produtos é a luteína, cujas propriedades serão abordadas na próxima seção (Sharma; Kuhad; Bhandari, 2022).

3.3 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA LUTEÍNA

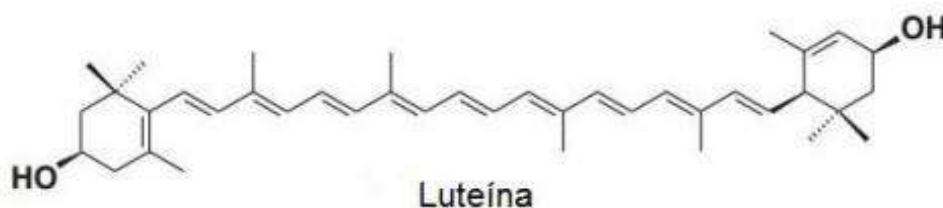
Os carotenoides são compostos bioativos, produzidos por plantas e alguns microrganismos que incluem carotenos (livres de oxigênio) e xantofilas (contendo oxigênio em sua estrutura química). Dentro do grupo das xantofilas, está a luteína, um carotenoide hidrofóbico, sólido de coloração alaranjada ou amarelada responsável por garantir a cor de diversos alimentos, como melão, ovo, pimentão e cenoura (Abdel- aal *et al.* 2013, Wallace *et al.*, 2015). Na natureza, a luteína é encontrada conjugada ao seu estereoisômero, a zeaxantina, portanto, após ser extraída é preciso submetê-la a um processo de purificação para se obter a luteína livre (Clowutimon *et al.*, 2018).

A luteína (4', 5'-dide-hidro-5', 6'-di-hidro-beta, β caroteno-3,3'-diol) (Figura 2), possui peso molecular de 568,9 g.mol⁻¹, log de P de 7.9, é solúvel em óleos e insolúvel em água (PubChem 2024). De fórmula molecular C₄₀H₅₆O₂, apresenta em sua estrutura dois grupos terminais cíclicos (um anel β e um anel α - ionona) e a estrutura isoprenoide C-40 básica, comum a todos os carotenoides. As duplas conjugadas de átomos de carbono permitem um movimento livre de elétrons, além da absorbância de luz na região azul do espectro visível, resultando em uma cor

laranja característica (Becerra *et al.*, 2020).

Ademais, possui dois grupos hidroxila em suas extremidades, o que ressalta sua reatividade com oxigênios singletos e o diferencia dos demais carotenoides (Fernández-Garcia *et al.*, 2012; Harrison; Curley, 2016; Mitra *et al.*, 2021). Embora as duplas ligações presentes na cadeia da luteína pudessem gerar conformações *cis* e *trans*, o que elevaria para um número maior de isômeros mono-*cis* e poli-*cis*, a grande maioria dos carotenoides se encontram preferencialmente na configuração *trans* (Brum, 2017).

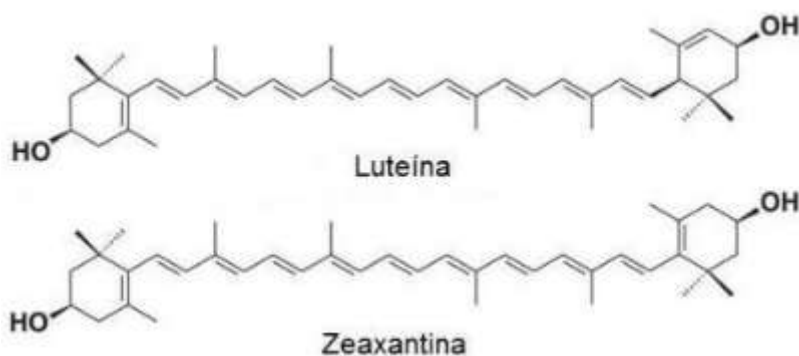
Figura 2 - Estrutura química da luteína



Fonte: Fernandez-Garcia *et al.* (2012).

A luteína e a zeaxantina são isômeros que diferem na localização de uma insaturação de ligação dupla no anel final (Figura 3). São amplamente distribuídos na natureza e podem ser encontrados na forma esterificados, em ácidos graxos, ou na forma "livre" não esterificada (Wallace *et al.*, 2015). As formas esterificadas são encontradas principalmente em flores e frutos, pois são mais estáveis contra o processo oxidativo (Giordano; Quadro, 2018).

Figura 3 - Luteína e seu isômero zeaxantina



Fonte: Fernández-Garcia *et al.* (2012).

A luteína apresenta importantes propriedades biológicas, como anti-inflamatório, anticancerígeno, filtro de luz azul e atividade antioxidante, sendo essa última propriedade a mais conhecida (Zaid *et al.*, 2022).

Carotenoides como a luteína se acumulam na derme e epiderme, desempenhando um papel crucial na defesa antioxidante da pele. Ao bloquear os comprimentos de ondas prejudiciais, como a radiação UV e luz azul, a luteína previne lesões oxidativas, evitando o aparecimento de melasma e sinais de envelhecimento. Além disso, ela pode melhorar a elasticidade, hidratação e aumentar lipídios superficiais da pele, processos fundamentais para garantir a saúde (Zaid *et al.*, 2022; Flieger *et al.*, 2024). Ademais, a luteína pode atuar como um fotoprotetor oral, complementando a proteção oferecida pelos filtros solares tópicos (De Ávila; Primo, 2021; Flieger *et al.*, 2024).

Em uma pesquisa foi observado que o uso da luteína tópica e a zeaxantina oral em mulheres de meia-idade com envelhecimento prematuro da pele poderia apresentar vantagens significativas para manter saúde da pele, pois reduziu a peroxidação lipídica, aumentou a elasticidade, lipídios superficiais e, simultaneamente, aumentou a hidratação da pele (Balić; Mokos, 2019; Zaid *et al.* 2022; Roberts; Green; Lewis, 2009).

Em um estudo cruzado, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, foi demonstrado que a suplementação oral de luteína reduz a superexpressão de genes como HO-1 (heme-oxigenase 1), gene indicador do estresse oxidativo; ICAM-1 (adesão intermolecular molécula 1), que tem a expressão aumentada em pele danificadas com erupção polimórfica à luz; e MMP-1 (metalopectidase de matriz 1), responsável pela degradação do colágeno, induzida pela radiação UVA e UVB (Grether-Beck *et al.*, 2017).

O mecanismo que justifica a capacidade antioxidante dos carotenoides foi descrito por Rice-Evans e colaboradores (1997), que analisaram diversos estudos *in vitro*, que demonstraram a eficácia antioxidante desses compostos, incluindo a capacidade de inibir a peroxidação lipídica, o estado tripleto dos fotossensibilizadores e o estado singleto do oxigênio molecular e intercepta a etapa de propagação da peroxidação lipídica. Além disso, propriedades antioxidantes foram atribuídas à luteína e à zeaxantina por diversos autores (Kotake-Nara, Nagao, 2011; Zaid *et al.*, 2022; Roberts; Green; Lewis, 2009; Giordano; Quadro, 2018; Mitra *et al.*, 2021; Becerra *et al.*, 2020; Algan; Gungor-Ak; Karatas, 2022).

Embora a luteína seja extensivamente estudada por suas propriedades farmacológicas, seu uso representa um desafio tecnológico a ser superado. Sua estrutura química com ligações duplas de oito conjugados, torna-a propícia à decomposição na presença de calor, luz e oxigênio. Outrossim, sua baixa solubilidade aquosa, devido à sua estrutura com C-40, resulta em fraca farmacocinética e baixa biodisponibilidade, limitando sua interação com organismo e, conseqüentemente, suas aplicações clínicas, especialmente na pele (Kotake-Nara; Nagao, 2011; Mitra *et al.*, 2021; Nikhat *et al.*, 2022).

Sendo assim, a luteína tem aplicações limitadas em produtos farmacêuticos, por isso, estratégias são necessárias para desenvolver e explorar sistemas eficientes de administração de fármacos, na tentativa de melhorar as características físico- químicas e otimizar a sua eficácia terapêutica como o uso da nanotecnologia (Zaid *et al.* 2022; Nikhat *et al.*, 2022; Mitra *et al.*, 2021; Algan; Gungor-Ak; Karatas, 2022; Brum *et al.*, 2017).

3.4 NANOTECNOLOGIA

Compreende-se como nanotecnologia a ciência de materiais direcionados ao desenvolvimento, caracterização e aplicação de partículas de dimensões extremamente pequenas na escala nanométrica. O prefixo “nano” remete a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro (1×10^{-9} m) (Schaffazick *et al.*, 2003).

A utilização da nanotecnologia alterou as perspectivas da indústria farmacêutica, pois permite o desenvolvimento de fármacos mais seguros e eficientes, de maior biocompatibilidade e aproveitamento de todo o seu potencial de ação e diminuição dos efeitos adversos decorrente do perfil de liberação controlada desse tipo de sistema (Maleki; Karimpour; Maleki Dizaj, 2018), sobretudo, os que possuem características lipídicas, como a luteína (Brum, 2017; Algan, Gungor-Ak, Karatas, 2022).

As vantagens que os sistemas nanotecnológicos apresentam frente aos sistemas convencionais fez com que essas nanoestruturas despertassem o interesse de múltiplas áreas, como química, física, ciência dos materiais, engenharia e médicas. Diferentes tipos de nanopartículas têm sido explorados para aplicações biomédicas, sobretudo para melhorar a administração de medicamentos, podendo

ser citados os lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, nanocristais, dendrímeros, nanotubos de carbonos, dentre outros (El-Say; El-Sawy, 2017; Sahu *et al.*, 2021).

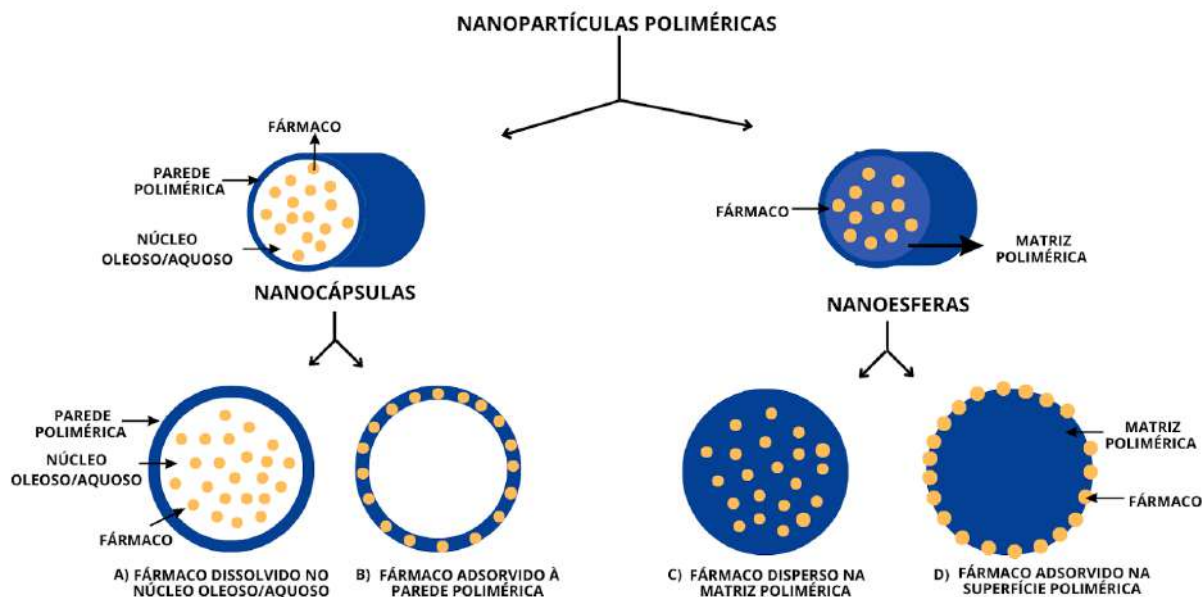
As nanopartículas são uma das mais importantes tecnologias dentro dos sistemas de liberação de fármacos na escala nanométrica, uma vez que possuem estabilidade coloidal, atravessam barreiras fisiológicas, têm a capacidade de se ligar a sítios específicos e são de fácil obtenção (Deng *et al.*, 2020; Schaffazick *et al.*, 2003; Algan; Gungor-Ak; Karatas, 2022; Brum, 2017). Essas nanoestruturas podem ser constituídas por material biodegradável, como polímeros naturais ou sintéticos, lipídios, fosfolipídios e ainda metais (El-Say; El-Sawy, 2017; Deng *et al.*, 2020; Jarai *et al.*, 2020).

Devido ao seu tamanho nanométrico, que varia de 100 a 1000 nm, as nanopartículas apresentam a capacidade de: reduzir a toxicidade dos compostos veiculados; proporcionar uma liberação contínua e controlada de fármacos; modificar as suas propriedades físico-químicas, aumentando sua biocompatibilidade e protegendo-os de processos fisiológicos e ambientais de degradação e inativação (Brum, 2017; Deng *et al.*, 2020; Sahu *et al.*, 2021).

3.5 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas poliméricas normalmente possuem diâmetro de 100-500 nm e são divididas entre nanoesferas e nanocápsulas. As nanocápsulas são estruturas vesiculares que possuem uma parede polimérica, envolvendo o núcleo oleoso ou aquoso da estrutura, onde o fármaco pode estar dissolvido ou disperso no núcleo e/ou aderido na parede polimérica. Em contrapartida, as nanoesferas se caracterizam pela ausência de núcleo, composta por uma matriz polimérica, onde o fármaco encontra-se retido ou adsorvido (El-Say; El-Sawy, 2017; Jarai *et al.*, 2020; Schaffazick *et al.*, 2003). A Figura 4 apresenta esquematicamente a diferença entre esses sistemas.

Figura 4 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.



Fonte: A autora.

A estrutura composta por um invólucro polimérico permite que as nanocápsulas protejam o fármaco da degradação, proporcionando estabilidade física nos fluidos biológicos e no armazenamento. Isso resulta em propriedades *in vivo* otimizadas, incluindo distribuição aprimorada, transposição de barreiras biológicas e o aumento da sua absorção. Essas estratégias são eficazes para prolongar a liberação do fármaco, consequentemente, aumentando seu tempo de meia-vida nos compartimentos biológicos (Schaffazick *et al.*, 2003; Jarai *et al.*, 2020; Brum, 2017).

As propriedades das nanopartículas poliméricas são diretamente dependentes do seu tamanho e das características da sua superfície, como potencial zeta, hidrofobicidade, presença de ligantes, morfologia e a escolha do polímero são determinantes nos desenvolvimentos desses sistemas nanoestruturados (Deng *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, tem havido um aumento significativo do interesse em nanopartículas poliméricas para a liberação cutânea de diversas substâncias ativas. Essas nanopartículas têm sido aplicadas em diversas áreas, incluído a veiculação de fármacos, diagnóstico não invasivo de neoplasias, tratamento de doenças inflamatórias e cicatrização de feridas, além de cosméticos para tratamento de melasma e envelhecimento cutâneo (Mordorski; Landriscina; Friedman, 2016).

Diversos pesquisadores têm mostrado que partículas poliméricas que variam

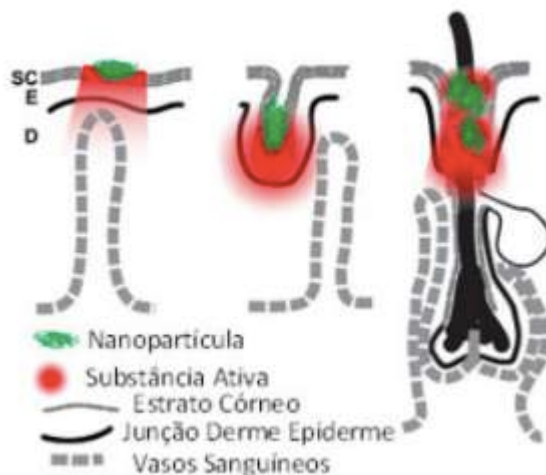
de 50 a 500 nm são ótimas opções para sistema de liberação transepidermal, enquanto partículas de 500-1000 nm atingem apenas as camadas mais superficiais da pele (Bhatia, 2016; Carter; Narasimhan; Wang, 2019). O tamanho reduzido dessas nanoestruturas garante elevada área superficial, o que a torna especialmente interessante para a aplicação de substâncias lipofílicas, promovendo liberação controlada e homogênea do ativo, bem como maior adesão do paciente, uma vez que é uma via de administração não invasiva e não sofre metabolismo de primeira passagem no fígado (Prow *et al.*, 2011; Carter; Narasimhan; Wang, 2019).

Muitos produtos antienvelhecimento baseados em nanocápsulas já são comercializados, incluindo: Primordiale Intense® e Hydra Zen® Serum comercializado pela L'Oreal e creme antirrugas Soleil Soft Touch® da Lancôme. Estes produtos auxiliam principalmente na preservação da saúde da pele (Sharma; Kuhad; Bhandari, 2022).

A epiderme é rica em corneócitos e substâncias lipídicas, enquanto a parede das nanocápsulas é composta de um polímero biocompatível e biodegradável que consegue ultrapassar o estrato córneo. Nesse contexto, nanopartículas constituídas por polímeros são transportadores promissores para veiculação na pele, já que estas partículas conferem alta estabilidade ao princípio ativo, também proporcionam uma maior taxa de absorção e distribuição pela pele, reduzindo a irritação da pele, o que é interessante a uma grande gama de compostos, como carotenoides que possuem ação antioxidante (Mihrianyan; Ferraz; Strømme, 2012; Mordorski; Landriscina; Friedman, 2016; Brum, 2017).

Existem algumas rotas principais as quais as nanocápsulas seguem quando em contato com o tecido cutâneo. Uma delas é a rota intercelular lipídica que ocorre por entre os corneócitos do estrato córneo, permeando as células chegando até o citosol celular. Outra maneira é por meio dos corneócitos e lipídeos, sem permear as membranas, chamada de rota intracelular, auxiliado principalmente através dos apêndices cutâneos, os quais funcionam como caminhos dérmicos para a aplicação tópica, que pode ser ainda mais expressiva quando os produtos forem devidamente massageados sobre a pele. Isso pois, os folículos pilosos se estendem até o tecido dérmico, onde são cercados por uma rede de células dendríticas e capilares sanguíneos, as substâncias aplicadas ficam ali reservadas (Prow *et al.*, 2011). Esses mecanismos são elucidados na Figura 5.

Figura 5 - Aplicação tópica de nanopartículas e sua difusão cutânea.



Fonte: Adaptado de Prow *et al.* (2011).

As nanopartículas podem ser produzidas por diversos métodos, dentre eles por polimerização *in situ* de monômeros dispersos e obtidos por precipitação de polímeros pré-formados (Schaffazick *et al.*, 2003).

O método por polímeros pré-formados apresenta quatro formas de obtenção: por deslocamento do solvente; *salting out*; emulsificação-difusão do solvente; ou por emulsificação-evaporação do solvente (Ozturk *et al.*, 2010). Este último método é o que apresenta melhor rendimento e possui a vantagem de poder incorporar em nanoestruturas fármacos lipofílicos e hidrofílicos, por tal motivo, ele é o mais frequentemente utilizado (Deng *et al.*, 2020).

Em resumo, o método interfacial do polímero pré-formado é baseado na mistura da fase orgânica com a fase aquosa por um lento gotejamento sob agitação vigorosa. O polímero é dissolvido em solvente orgânico com polaridade intermediária e miscível em água, esta solução é adicionada gradualmente a uma solução aquosa. Devido a rápida difusão espontânea da solução polimérica na fase aquosa, o polímero precipita na interface da água e do solvente orgânico dando a origem às nanopartículas, na tentativa de evitar as moléculas de água. Após a formação das partículas é realizada a remoção do solvente por evaporação reduzida e a suspensão formada é concentrada retirando-se o excesso de água (Fessi *et al.*, 1989; Salatin *et al.* 2017; Zielińska *et al.* 2020).

As características das nanocápsulas podem ser influenciadas principalmente pela concentração dos polímeros, método de injeção da fase orgânica, razão de

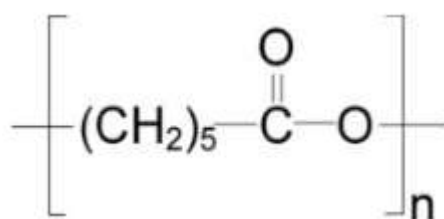
volume entre a fase orgânica e a fase aquosa e a natureza dos materiais (Deng *et al.*, 2020).

Na formulação, a adição da fase oleosa é essencial e suas características, como viscosidade e tensão superficial, interferem na partícula final, uma vez que esses parâmetros são diretamente proporcionais ao tamanho das partículas (Santos, 2010). Da mesma maneira, os tensoativos são importantes para auxiliar na obtenção de partículas menores e importantes na estabilização das nanopartículas, diminuindo o risco de agregação durante o preparo e armazenamento (Deng *et al.*, 2020; Schaffazick *et al.*, 2003; Santos, 2010).

3.6 POLI (ε -CAPROLACTONA) – PCL

A poli (ε -caprolactona) (Figura 6), mais conhecida pela sua sigla PCL é um polímero alifático sintético aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para ser utilizado como biomaterial, devido a suas propriedades únicas e versatilidade de aplicações. É polímero semicristalino, atóxico, hidrofóbico com propriedades térmicas compatíveis com a temperatura corpórea, com excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e resistência elástica (Abamor *et al.*, 2018; Bose *et al.*, 2019).

Figura 6 - Estrutura química da poli(ε- caprolactona).

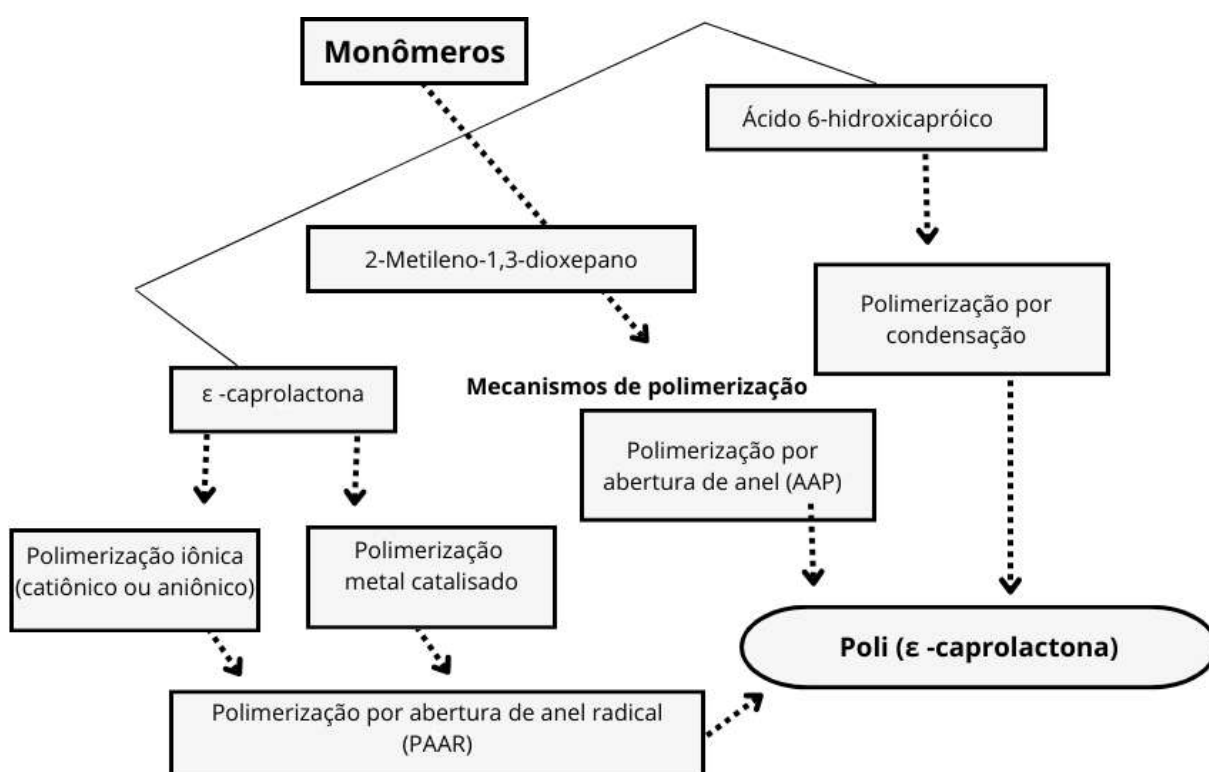


Fonte: A autora.

A síntese da PCL, pode ser realizada por meio da abertura do anel ε -caprolactona por polimerização, por meio de catalisadores catiônicos, aniônicos, de coordenação e/ou espécies reativas de oxigênio ou hidrogênio (Figura 7). A estrutura química da PCL é composta por unidades repetidas de caprolactona, que confere biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixo ponto de fusão (Janmohammadi; Nourbakhsh, 2018).

As propriedades físicas, mecânicas, térmicas e o tempo de biodegradação dependem do peso molecular, do índice de polidispersidade e do grau de cristalinidade. Assim, o controle destes parâmetros durante a síntese da PCL é crucial para muitas das aplicações práticas específicas (Sowmya; Hemavathi; Panda, 2021; Abamor *et al.* 2018; Janmohammadi; Nourbakhsh, 2018).

Figura 7 - Diferentes rotas de síntese de PCL.



Fonte: A autora.

A PCL apresenta vantagens perante os demais polímeros disponíveis no mercado, por se tratar de um material barato, mesmo sendo de origem sintética, devido a facilidade da sua obtenção, e por ser compatível com uma variedade de solventes orgânicos, como clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, levemente solúvel em acetona, acetato de etila, dimetilformaldeído e acetonitrila (Abamor *et al.*, 2018).

Além das características supracitadas, a PCL possui baixa temperatura de fusão (59 a 64 °C), temperatura de transição vítrea (Tg) entre -65 a -60 °C, temperatura de decomposição acima de 350 °C e propriedades reológicas e viscoelásticas superiores a outros poliésteres, o que o torna fácil de manipular,

permitindo obter uma ampla gama de produtos de custo baixo e de bom desempenho, principalmente quando se trata de sistemas de liberação de fármacos. Ademais, outras características também são muito atrativas, como boa tenacidade, flexibilidade e compatibilidade com outros polímeros sintéticos (Sowmya, Hemavathi, Panda, 2021; Abamor *et al.*, 2018; Janmohammadi; Nourbakhsh, 2018; Bose *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2020).

A degradação deste polímero acontece sob condições fisiológicas em duas fases. Na primeira ocorre a clivagem hidrolítica não enzimática dos grupos ésteres da camada amorfa. Na segunda, quando o polímero está mais cristalino e com uma baixa massa molar (menor de 3.000 g/mol), macrófagos e fagócitos promovem sua degradação intracelularmente, sendo assim, absorvido completamente pelo organismo, indicando que a PCL também é bioabsorvível. A vantagem da utilização desse polímero é que ele evita a criação de um ambiente ácido no tecido, além de possuir estabilidade *in vitro* (Sowmya; Hemavathi; Panda, 2021; Abamor *et al.*, 2018; Janmohammadi; Nourbakhsh, 2018).

A versatilidade desse polímero o torna adequado e altamente explorado no desenvolvimento de nanopartículas para a entrega controlada de fármacos, devido a sua alta permeabilidade a vários ativos, biocompatibilidade com outros materiais e a capacidade de ser biodegradável. Outro fato importante é que os nanocarreadores desenvolvidos com PCL possuem aprovação e registro de marca da FDA, o que torna mais rápida sua entrada no mercado (Abamor *et al.*, 2018; Bose *et al.*, 2019).

3.7 NANOESTRUTURAS PARA A VEICULAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

Sistemas nanoestruturados têm sido empregados para a liberação controlada de veiculação de substâncias antioxidantes, como quercetina, curcumina e ácido ascórbico, com o intuito tanto de aumentar a estabilidade físico-química quanto potencializar a atividade antioxidante desses contra a lipoperoxidação (Liu *et al.*, 2008; Voci *et al.*, 2021; Gunawan; Boonkanokwong, 2024). Com o uso de nanopartículas poliméricas foram observadas melhoras na atividade antioxidante de substâncias como coenzima- Q10 (Huerta-Madronal *et al.*, 2023), licopeno (Mennati *et al.*, 2021; Lia *et al.*, 2017), curcumina (Taleb *et al.*, 2023) e β -caroteno (Azhar *et al.*, 2023).

Os carotenoides, como luteína, β -caroteno, licopeno, dentre outros, apresentam baixa solubilidade em água, e, por isso, baixa solubilidade no organismo. Dessa maneira, sistemas nanoestruturados contendo carotenoides têm aumentado a absorção dessas substâncias ativas nos organismos e a sua atividade biológica (Lacatusu *et al.*, 2013; Mitra *et al.*, 2021; Nikhat *et al.*, 2022; Azhar *et al.*, 2023; Mennati *et al.*, 2021). Na Tabela 1, pode-se observar trabalhos onde foram desenvolvidos sistemas nanoestruturados contendo carotenoides.

Tabela 1 - Estudos relativos à associação de carotenoides com sistemas nanoestruturados.

Sistema	Carotenoide	Método de preparo	Características Físico-químicas	Resultados Obtidos	Referência
Nanopartículas lipídicas	Luteína	Emulsificação-homogeneização de alto cisalhamento	167-390 nm PZ -29,1 -34,5 mV IPD 0,2-0,4	Aumento da atividade antioxidante, liberação sustentada <i>in vitro</i>	LACATUSU <i>et al.</i> (2013)
Nanopartículas poliméricas	Luteína	Nanoprecipitação	191,90 nm PZ -5,14 mV IPD 0,11 EE% 99,51%	Solubilização da luteína em meio aquoso, aumentou a estabilidade da luteína	BRUM <i>et al.</i> (2017)
Nanopartículas poliméricas	Licopeno	Nanoprecipitação	135-276 nm PZ 44,2 a 58,3mV IPD 0,2 EE% > 80%	Melhora na farmacocinética e maior estabilidade gástrica	LIA <i>et al.</i> (2017)
Lipossomas	Licopeno β- caroteno Luteína Cantaxantina	Hidratação do filme lipídico	70-100 nm PZ 9,3 mV IPD <0,3	Aumento da estabilidade e maior controle de liberação	TAN <i>et al.</i> (2016)
Nanopartículas lipídicas	β-caroteno	Emulsificação-homogeneização	200 nm PZ -43,46 IPD 0,6	Aumento da permeabilidade cutânea <i>in vivo</i> , aumento da estabilidade e controle de liberação	MARETTI <i>et al.</i> (2021)
Nanoemulsão	Astaxantina	Emulsificação espontânea	106–213,7 nm PZ -20,57 IPD 0,15	Aumento no potencial de cicatrização de feridas, efeito antimicrobiano e anti cancerígeno	SHANMUGA PRIYA <i>et al.</i> (2018)
Nanoemulsão	Extrato bruto de carotenoides	Emulsificação O/A	74 nm IPD 0,5 EE% 98%	Diminuição do processo inflamatório em órgãos de ratos obesos	MEDEIROS <i>et al.</i> (2020)
Nanopartículas híbridas	Extrato bruto de carotenoides	Precipitação anti solvente por tratamento térmico	200 nm IPD <0,3; PZ -30 mV EE% 85,65% e 82,34%	Maior solubilidade em água, controle de liberação no trato gastrointestinal e na atividade antioxidante	WANG <i>et al.</i> (2021)

Fonte: A autora.

Nota: PZ: potencial zeta; IPD: índice de polidispersão; EE%: eficiência de encapsulação.

3.8 NANOPARTÍCULAS CONTENDO LUTEÍNA

A literatura relata um número restrito de sistemas nanoparticulados contendo luteína para uso tópico, em especial na pele. A maioria deles destina-se ao tratamento de efeitos cicatrizantes, proteção ocular e doenças neurodegenerativas.

Bodoki *et al.* (2019) encapsularam a luteína pelo método de emulsificação com evaporação do solvente usando o polímero poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) - PLGA e zeína para a aplicação tópica da luteína para tratar catarata induzida por selenito. Foi observado que a luteína encapsulada permitiu a redução da catarata induzida em ratos, enquanto a luteína aplicada de forma livre oral e tópica não apresentou redução. Esse resultado indica que a luteína nanoestruturada aumentou a biodisponibilidade e estabilidade da luteína, mantendo sua ação antioxidante por mais tempo no local de ação. Ainda, em outro estudo, a luteína encapsulada em nanopartículas de zeína melhorou a estabilidade digestiva do carotenoide em condições gástricas e forneceu conteúdo nutritivo suficiente de luteína (Cheng; Ferruzzi; Jones, 2019).

Hong *et al.* (2016) observaram em seu estudo que encapsular a luteína em nanopartículas a base de quitosana e ácido poli- γ -glutâmico possibilitou o aumento da solubilidade da luteína cerca de 12 vezes mais em comparação com a da luteína não nanoencapsulada, característica importante para aumentar a biodisponibilidade oral do fármaco. Bolla *et al.* (2020) desenvolveram nanopartícula polimérica com PLGA-PEG- biotina e obtiveram partículas menores que 250 nm e monodispersas que foram capazes de melhorar a captação celular da luteína por células da retina, se tornando um sistema de entrega promissor para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade (DMRI).

A luteína também foi carregada em nanopartículas lipídicas (NLCs) produzidas por homogeneização de alta pressão para proteger a pele do fotodano (Mitri *et al.*, 2011). Neste estudo, os NLCs apresentaram faixa de diâmetro de 150 a 350 nm, faixa de potencial zeta - 40 a - 63 mV, e a luteína encapsulada permaneceu na pele, protegendo a pele contra raios UV.

Diante da revisão apresentada considera-se viável a investigação dos efeitos da luteína encapsulada em forma de nanocápsulas poliméricas para o tratamento do envelhecimento cutâneo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES

4.1.1 Fármaco

- Luteína (10,25% luteína, Galena[®] São Paulo, Brasil)

4.1.2 Produção das Nanopartículas

- Poli (ϵ -caprolactona) (Mw 14.000 g/mol, Sigma-Aldrich[®], São Paulo, Brasil).
- Água ultrapurificada pelo sistema de ultrapurificação em equipamento Milli-Q (Merck, Integral 5, Darmstadt, Alemanha).
- Acetona ((CH₃)₂CO) (Synth, Diadema, Brasil).
- Monooleato de sorbitano etoxilado 20 (polissorbato 80, Tween[®] 80, Delaware, Porto Alegre, Brasil).
- Monooleato de sorbitano (Span 80[®], OXITENO, Mauá, São Paulo).
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico-caprílico (FOCUS QUÍMICA, São Paulo, Brasil).

4.1.3 Ensaio de Citotoxicidade

- Ácido etilenodiamino tetracético, di-hidratado (EDTA) (Synth, Brasil).
- Azul de Tripán (Sigma Chemical, Estados Unidos).
- Bicarbonato de sódio P.A. (Vetec, Brasil).
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (MTT) (Sigma Chemical, Estados Unidos).
- Cloreto de potássio P.A. (Vetec, Brasil).
- Cloreto de sódio P.A. (Vetec, Brasil).
- Dimetilsufóxido (DMSO) P.A. (Vetec, Brasil).
- Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. (Synth, Brasil).
- Fosfato de sódio dibásico anidro P.A. (Synth, Brasil).
- Meio Dulbecco MEM (DMEM) (Vitrocell, Brasil).

- Penicilina/Estreptomicina (Vitrocell, Brasil).
- Soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil).
- Tripsina (Sigma Chemical, Estados Unidos).

4.1.4 Ensaio de Avaliação da Atividade Antioxidante

- Sulfato férrico amoniacal dodecahidratado ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Neon, Brasil).
- Ácido clorídrico (HCl 1 M) (Synth, Brasil).
- 1,10-fenantrolina Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Placa de 96 poços.
- Ácido ascórbico (Synth, Diadema, SP, Brasil).
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma- Aldrich, São Paulo, Brasil).
- 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) - (ABTS) (Sigma- Aldrich, São Paulo, Brasil).
- Álcool etílico (Anidrol, Diadema, SP, Brasil).

4.1.5 Outros Reagentes

- Lactose Monohidratada PA (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil).

4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

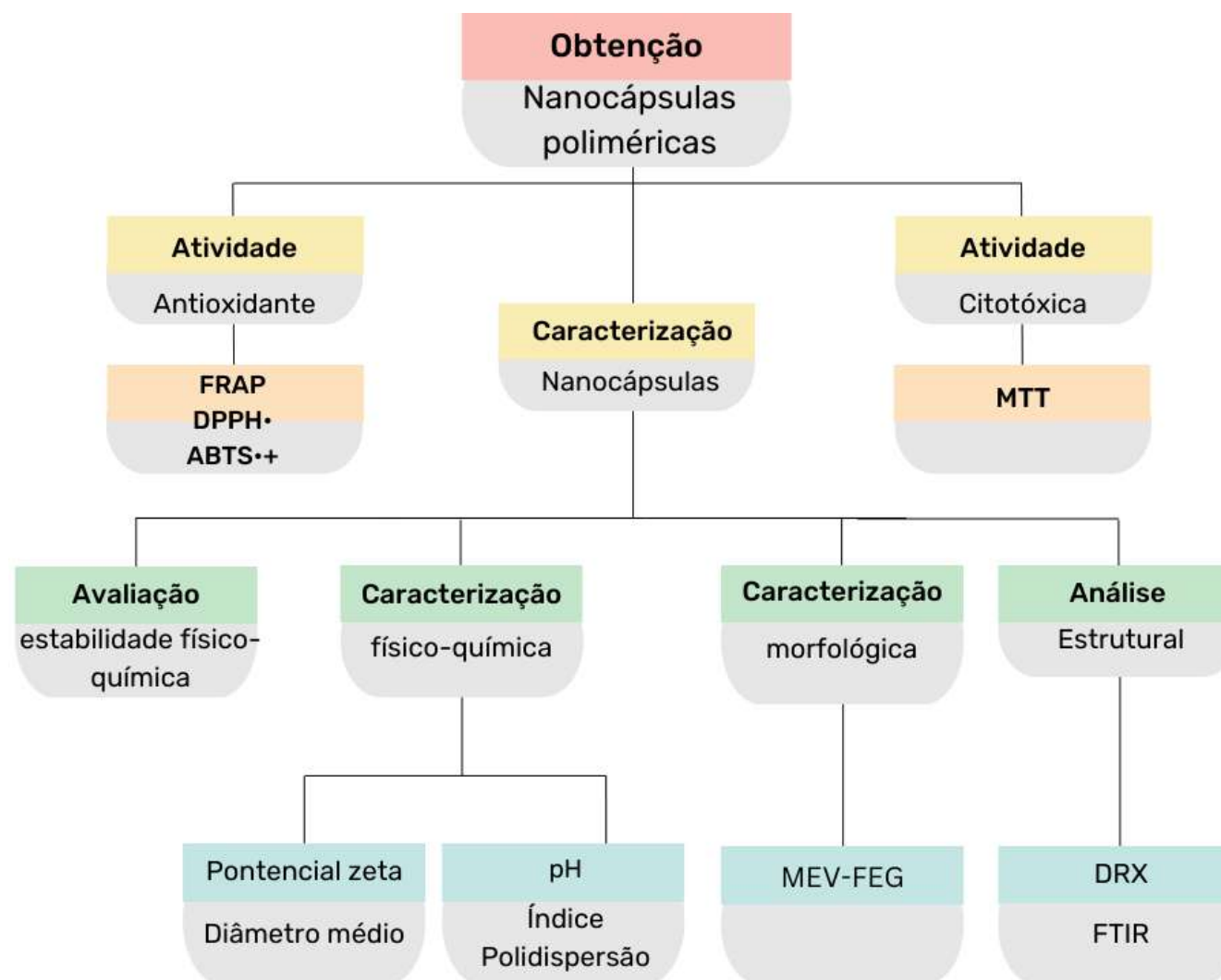
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil).
- Centrífuga (Hermle Z326K, Wehingen, Alemanha).
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a detector de fotodiodos (SHIMADZU, modelo Nexera X2 System®, Quito, Japão).
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas (WATERS, Acquity HClass, Massachusetts, USA).
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil).
- Difrátômetro de raios X (SHIMADZU, modelo XRD-6000, Quito, Japão).
- Equipamento DSC/TG (STA 6000, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos).

- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Evaporador rotatório (FISATOM, modelo 801, Diadema, Brasil).
- Liofilizador (LIOTOP, L202, São Paulo, Brasil).
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão).
- Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca).
- pHmetro digital (HANNA, HI 2221, São Paulo, Brasil).
- Placa de agitação e aquecimento (FISATOM, modelo Q261-22, Diadema, Brasil).
- Ultrafreezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos).
- Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, NANO ZS90, Malvern Reino Unido).

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

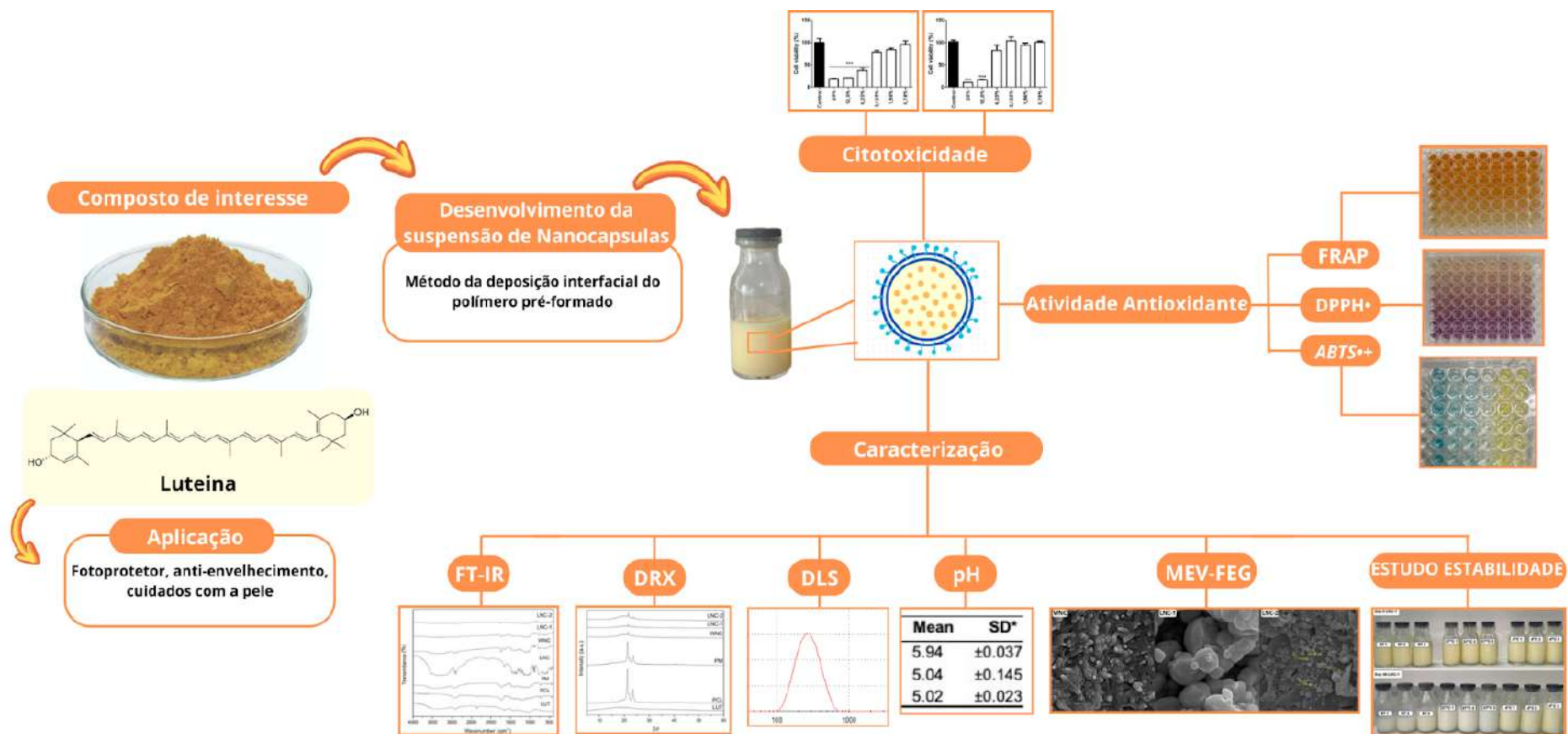
O presente trabalho teve início com a síntese das nanocápsulas poliméricas. Na sequência, as formulações desenvolvidas foram caracterizadas por métodos físico-químicos, morfológicos e espectroscópicos, sendo posteriormente investigada a estabilidade delas. A avaliação da atividade antioxidante das nanocápsulas foi analisada pelos métodos de FRAP, ABTS^{•+} e DPPH[•] e a citotoxicidade foi avaliada *in vitro* em células de fibroblastos 3T3. As etapas realizadas na parte experimental estão representadas na forma de fluxograma na Figura 8 e na forma resumo gráfico na Figura 9.

Figura 8 - Fluxograma ilustrativo das etapas da pesquisa.



Fonte: A autora.

Figura 9 - Resumo gráfico da pesquisa.



Fonte: A autora.

4.4 DESENVOLVIMENTO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO LUTEÍNA

Após estudos experimentais de pré-formulação e observação crítica da literatura disponível, as nanocápsulas poliméricas obtidas a partir da PCL contendo luteína foram preparadas pela deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação) descrito por Fessi *et al.* (1989). As formulações encontram-se na Tabela 2.

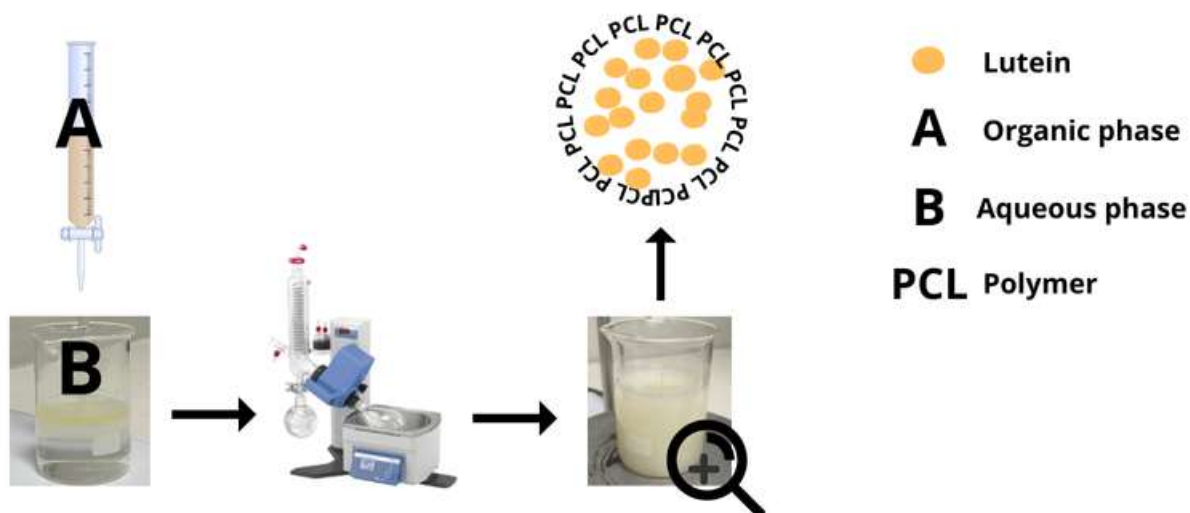
Tabela 2 - Formulações das nanocápsulas de PCL contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) e nanocápsulas de PCL brancas, com ausência da luteína (NCB), obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado.

COMPOSIÇÃO	FORMULAÇÃO		
	NCB	NCL- 1	NCL-2
FASE AQUOSA			
Tween [®] 80	0,077 g	0,077 g	0,077 g
Água destilada	50 mL	50 mL	50 mL
FASE ORGÂNICA			
Luteína	-	0,08 g	0,16 g
Poli (ε -caprolactona)	0,100 g	0,100 g	0,100 g
Span [®] 80	0,070 g	0,070 g	0,070 g
Ácido caprílico	0,300 g	0,300 g	0,300 g
Acetona	27 mL	27 mL	27 mL

Fonte: A autora.

Na fase orgânica, o polímero foi solubilizado em acetona na presença do Span[®] 80, luteína e ácido caprílico. Para a fase aquosa, foi adicionado Tween[®] 80 em água destilada sob agitação magnética para incorporação do tensoativo. A fase orgânica foi homogeneizada por 5 minutos em agitação magnética até atingir 40 °C e então gotejada lentamente sobre a fase aquosa, durante 40 minutos. Após o gotejamento total, a suspensão foi mantida em agitação vigorosa por mais 10 minutos. O solvente orgânico foi eliminado em rota-evaporador até o volume final de 10 mL, conforme ilustrado na Figura 10 para a obtenção das NCL-1 e NCL-2. Para fins comparativos, foi preparada uma suspensão de nanocápsulas sem a adição do fármaco (NCB), como controle negativo e todas as formulações foram preparadas em triplicata.

Figura 10 - Esquema do método de obtenção das nanocápsulas poliméricas contendo luteína preparadas pela deposição interfacial do polímero pré-formado.



Fonte: A autora.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO LUTEÍNA

4.5.1 Liofilização

Para realizar a caracterização por alguns métodos, fez-se necessário a liofilização das nanocápsulas poliméricas contendo luteína. Para isso, 1 g de lactose (LAC) monohidratada foi dispersa na nanossuspensão sob agitação magnética. Em seguida, a suspensão foi congelada em ultrafreezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos) a -80°C por 24 horas e liofilizada em liofilizador (LIOTOP, L202, São Paulo, Brasil) por 48 horas, até total remoção da água.

4.5.2 Caracterização Físico-Química

As análises de tamanho médio e índice de polidispersão (IPD) foram realizadas pela metodologia de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e a determinação de potencial zeta por meio da mobilidade eletroforética em equipamento Zetasizer® Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido) com ângulo de detecção de 90° em temperatura de 25°C . Tais análises foram realizadas com nanopartículas diluídas em água na proporção de 1:500 (v/v). O pH foi medido

diretamente nas formulações com o auxílio de um potenciômetro calibrado (Digimed®, Brasil), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

4.5.3 Caracterização Morfológica

4.5.3.1 Análise de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

A avaliação morfológica e de superfície foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada a voltagem de aceleração de 7 a 10 kV e utilizado software específico (*Electron Optical Design*).

4.5.4 Caracterização Estrutural

4.5.4.1 Análise por difração de raios x (DRX)

As nanocápsulas foram examinadas em difratômetro de raios X Shimadzu XRD-6000, scan de $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e 2θ de 4° à 80° , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade. Para a realização da análise as amostras de nanossuspensão foram gotejadas sob uma lamínula e secas à temperatura ambiente formando uma camada espessa de amostra.

4.5.4.2 Avaliação por espectroscopia no infravermelho por transformada de *fourier* (FTIR)

As formulações foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento IR Prestige-21 (SHIMADZU, Quioto, Japão), na faixa de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 2 cm^{-1} e $64 \text{ scan/minuto}^{-1}$. Os espectros obtidos foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, polímero,

MF e da formulação sem a adição da luteína (NCB).

4.6 AVALIAÇÃO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE

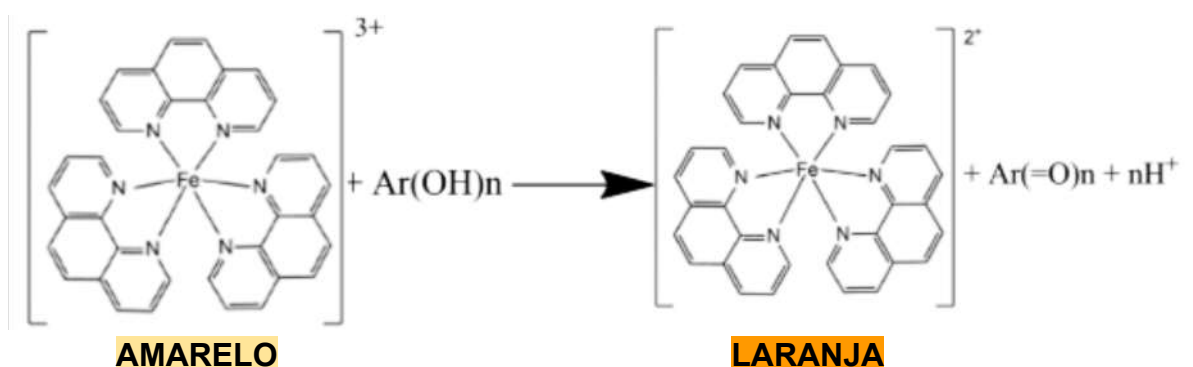
As nanocápsulas contendo a luteína (NCL-1 e NCL-2) e as nanocápsulas com ausência da luteína (NCB) foram avaliadas em diferentes condições de armazenamento ao abrigo da luz em temperatura ambiente, estufa (37 °C) e geladeira (4 °C) por 30 dias. Com leituras nos tempos 0, 7, 15, 30 e 60 dias com avaliação das características físico-químicas como diâmetro de partícula, IPD, potencial zeta e pH. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.7.1 Avaliação do Poder Antioxidante Redutor de Ferro (*Ferric-Reducing Antioxidant Power – FRAP*)

A avaliação da atividade antioxidante por meio deste método baseia-se na habilidade da amostra em reduzir íons Fe^{3+} para Fe^{2+} através da transferência de elétrons, na presença de 1,10-fenantrolina, resultando na formação do complexo 1,10-fenantrolina- Fe^{2+} com coloração laranja, que é monitorado em 510 nm (Figura 11). Portanto, quanto maior a concentração de Fe^{2+} formada, mais intensa é a cor do complexo e, assim, maior é considerada a atividade antioxidante do composto de análise (Berker *et al.*, 2007).

Figura 11 – Esquema da reação de redução de íons Fe^{3+} para Fe^{2+} na presença de um agente antioxidante e 1,10-fenantrolina.



Fonte: Adaptado de Kazmierczak (2022).

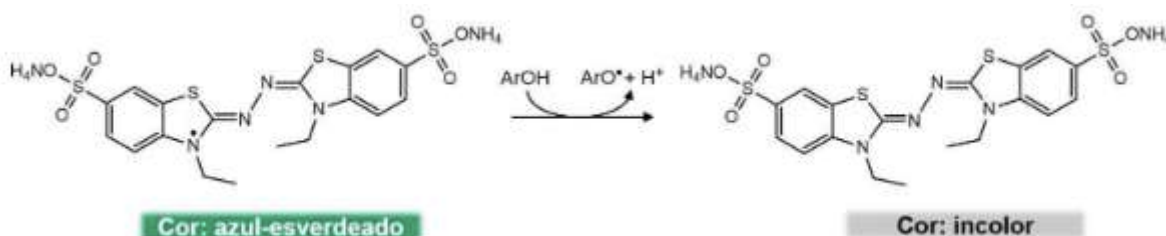
Nota: Ar (OH)= espécie antioxidante.

Conforme Berker e colaboradores (2007), primeiramente, dodeca-hidrato de sulfato férrico de amônio ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (160,0 mg) foi dissolvido em ácido clorídrico (HCl 1 M) (2 mL). Em seguida foram adicionadas água ultrapura (50 mL) e 1,10-fenantrolina (180,2 mg) e completado o volume para 100 mL com água ultrapura em um frasco, resultando em uma solução com concentração final de $1,10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. A seguir, duas soluções foram misturadas e diluídas com água ultrapura (100 mL). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,25 mL de amostras diluídas em acetona na concentração de 1:4 e 2 mL da solução do complexo Fe^{3+} -1,10-fenantrolina. Os tubos foram então incubados no escuro por 30 minutos até a reação estar completa. As leituras de absorbância foram medidas a 510 nm contra um branco de reagente no espectro UV-Vis. Para o controle negativo, o procedimento foi repetido sem adição de amostras. O ácido ascórbico foi utilizado como controle para construir a curva nas concentrações de 10, 8, 6, 4, 3, 2 e 0 ppm para montar a curva de calibração. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido ascórbico por mL de amostra ($\mu\text{g AA mL}^{-1}$).

4.7.2 Determinação da Capacidade Inibitória do Cátion-Radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2'-Azino-Bis-3- Etilbenzotiazolina-6-Sulfonato de Amônio)

ABTS (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foi empregado para avaliar a atividade de eliminação de cátions radicais. O cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ é formado a partir da reação entre ABTS e persulfato de potássio, com absorção máxima de energia em 645, 734 e 815 nm. A inibição foi determinada pela mudança de coloração azul para incolor (Figura 12), que é medida pela absorbância, em função da concentração das amostras (Jaiswal 2020).

Figura 12 - Mecanismo para a determinação da atividade antioxidante via redução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$



Fonte: A autora.

Nota: Onde ArOH = agente antioxidante.

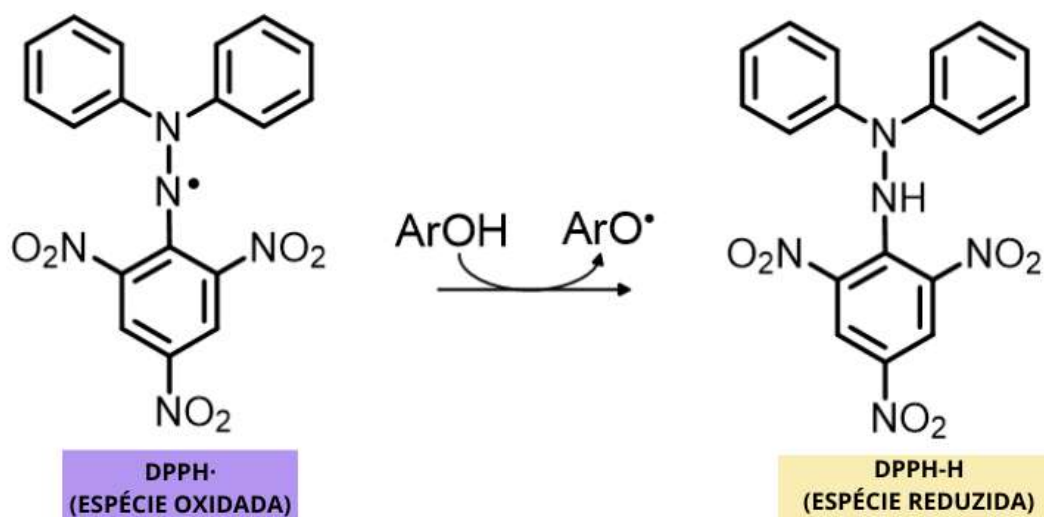
Seguindo o método descrito por Re *et al.* (1999) e Shu *et al.* (2023), uma solução estoque de ABTS a 7 mmol L^{-1} foi preparada adicionando $88 \text{ }\mu\text{L}$ de persulfato de potássio ($2,45 \text{ mmol L}^{-1}$) ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Esta solução foi armazenada ao abrigo da luz e a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ (freezer) por 16 horas para facilitar a formação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Posteriormente, a solução foi diluída em etanol para atingir uma absorbância de 0,70 a 734 nm , medida com espectrofotômetro, antes do uso. Para criar a curva padrão, adicionou-se ácido ascórbico a uma microplaca de 96 poços em concentrações de 10, 8, 6, 4, 3, 1 e 0 ppm. Em seguida, as amostras de análise foram diluídas na proporção de 1:4. Em seguida, $1.000 \text{ }\mu\text{L}$ das amostras diluídas e $3.000 \text{ }\mu\text{L}$ da solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foram misturados em tubos de ensaio, sendo $300 \text{ }\mu\text{L}$ dessa mistura transferidos para microplacas. As microplacas foram então incubadas durante 30 minutos longe da luz antes das leituras de absorbância a $\lambda 734 \text{ nm}$ serem feitas utilizando um espectrofotômetro. Uma solução de $300 \text{ }\mu\text{L}$ da solução $\text{ABTS}^{\bullet+}$ serviu como controle negativo. Os resultados foram expressos como atividade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico por mililitro de amostra ($\mu\text{g AA mL}^{-1}$).

4.7.3 Determinação da Capacidade Inibitória do Cátion-Radical DPPH • (1,1-difenil-2-picril hidrazina)

O método é baseado na transferência de elétrons, sendo a transferência de átomos de hidrogênio um mecanismo de reação apenas uma via marginal no ensaio (De Oliveira *et al.*, 2009; Shahidi; Zhong, 2015). O DPPH é um radical estável de coloração roxa e solúvel em etanol, após reagir com antioxidantes, elétrons ou átomos de hidrogênio perde a cor roxa, tornando-se incolor ou cor levemente amarelada.

O composto incolor formado também é chamado de 2,2-difenil-picrilhidrazila ou DPPH reduzido Figura 13 (Shahidi; Zhong, 2015).

Figura 13 - Estrutura do radical DPPH e DPPH reduzido.



Fonte: A autora.

Baseado em Brand-Williams *et al.* (1995), a construção da curva de controle consistiu em uma amostra padrão de ácido ascórbico seguindo concentrações de 10, 8, 6, 4, 3, 2 e 0 ppm. As soluções das amostras foram preparadas em acetona na proporção de 1:4. Nos tubos foram adicionados 2 mL de cada amostra e 2 mL de solução DPPH• (120 µmol/L) em acetona. Também foi realizado controle negativo adicionando 1 mL de DPPH e 1 mL de acetona. Após construção da curva e adição das amostras e DPPH, os tubos foram incubados por 30 minutos no escuro para completar a reação. As amostras foram lidas a 517 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados foram expressos em µg equivalente de ácido ascórbico por mililitro de amostra (µg AA mL⁻¹).

4.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT

Desenvolvido por Mosmann *et al.* (1983), o método utiliza o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo), que é um sal de mono-tetrazólio. Sua redução resulta na quebra do anel tetrazólico central e na formação de uma molécula violeta-azulada insolúvel em água chamada formazan (Ghasemi *et al.*, 2021).

As células utilizadas foram fibroblastos de camundongo linhagem 3T3, que foram cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). Elas foram

semeadas em placas de 96 poços, com a concentração de 2×10^5 células/poço e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂ durante 24 horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se na placa a amostra NCL-1 nas concentrações de 247,50; 123,75; 61,87; 30,93; 15,46 e 7,73 µg.mL⁻¹ que compreendem as concentrações: 25; 12,50; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78%. Enquanto que para a NCL-2 foram adicionadas as amostras nas concentrações de 495,50; 247,50; 123,75; 61,87; 30,93 e 15,48 µg.mL⁻¹ que correspondem: 25; 12,50; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78%. As concentrações foram obtidas a partir da diluição das formulações em meio DMEM com 10% de SFB.

As células com as amostras foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Após este período, o sobrenadante foi retirado e adicionado às células uma solução de MTT. Posteriormente, as culturas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora isoladas da luz. Em seguida, foram solubilizados os cristais de formazan utilizando dimetilsulfóxido (DMSO), e foi feita a leitura da absorbância em 570 nm em um leitor de placas. Como controle negativo foi utilizado meio DMEM, e a viabilidade celular foi obtida pela comparação entre as células do controle negativo com as amostras.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para a caracterização e estudo de estabilidade, as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (n= 3). A análise estatística foi feita utilizando a análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste posterior de comparações múltiplas Bonferroni por meio do programa GraphPad Prism® versão 6 (San Diego, CA, USA) e o nível de significância foi considerado $p < 0,05$.

Para a citotoxicidade, os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (n= 6). A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste posterior de comparações múltiplas de post-hoc de tukey por meio do programa GraphPad Prism® versão 6 (San Diego, CA, USA) e o nível de significância foi considerado $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$.

Para a atividade antioxidante avaliadas, após a ANOVA, as médias dos grupos foram comparadas pelo teste de T-Student-Newman-Keuls por meio do

programa GraphPad Prism® versão 6 (San Diego, CA, USA) o nível de significância foi considerado $p < 0,05$. As correlações dos dados foram calculadas por meio da correlação de Pearson.

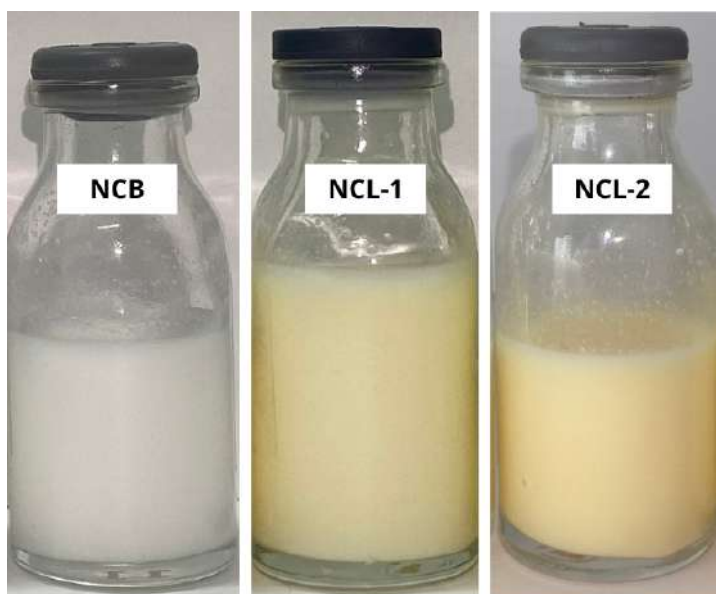
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO LUTEÍNA

As NCL-1, NCL-2 e NCB foram obtidas com êxito pelo método de nanoprecipitação. A escolha desse método foi motivada por possibilitar uma boa reprodutibilidade, segurança, facilidade de transposição de escala e desenvolvida para fármacos hidrofóbicos (como a luteína) e solventes miscíveis em água, como etanol e acetona (Deng *et al.*, 2020; Salatin *et al.*, 2017; Zielińska *et al.*, 2020; Abriata *et al.*, 2019).

As formulações contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) apresentaram macroscopicamente o aspecto leitoso, homogêneo, brancas amareladas opalescentes e com odor de luteína, enquanto a NCB apresentou aspecto leitoso, homogêneo e cor branco opalescente (Figura 14). Ainda, todas apresentaram a presença de reflexos azulados, característicos do efeito *Tyndall*, que é resultado da reflexão da luz sobre as partículas nanométricas (Fessi *et al.*, 1989; Schaffazick *et al.*, 2003). Não foi observada separação de fases e nem formação de cristais nas formulações analisadas.

Figura 14 - Análise macroscópica das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) e nanocápsulas de PCL brancas, com ausência de luteína (NCB).



Fonte: A autora.

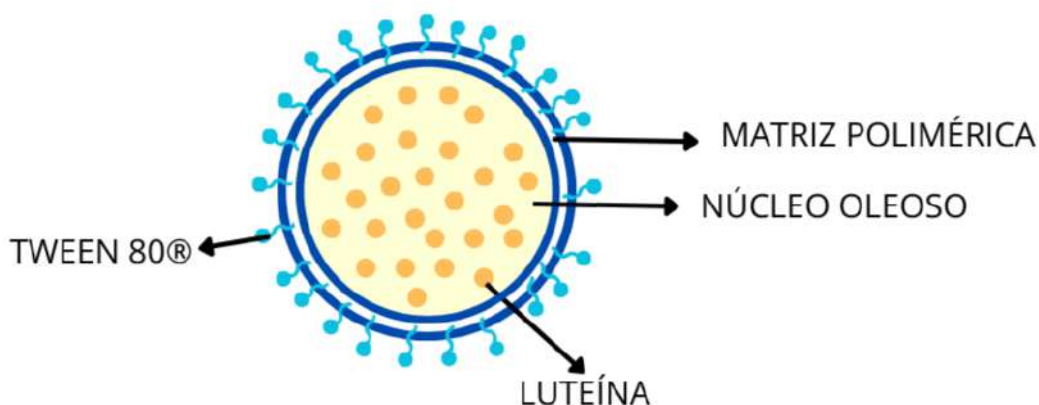
A escolha das concentrações do fármaco utilizadas nesse estudo foi

baseada na concentração encontrada na literatura para nanopartículas carregadas com luteína (Viana, 2022), preparadas com o intuito de tratar sintomas do espectro autista. Ademais, tem como base o estudo realizado com nanocápsulas poliméricas carregadas com ácido ferúlico, que foram desenvolvidas como potencial tratamento de feridas de pele devido a sua atividade antioxidante, visto que o objetivo deste trabalho também visa a aplicação de um composto de atividade antioxidante conhecida de administração na pele (Schwab, 2019).

A formação de nanocápsulas se dá quando uma pequena quantidade de óleo é incorporada na fase orgânica, como é o caso do ácido caprílico. Essa cavidade central à base de óleo permite uma alta eficiência na encapsulação de fármacos lipofílicos, devido à afinidade natural com o núcleo, resultando em uma encapsulação eficaz (Nagavarma *et al.*, 2012). O núcleo oleoso é cercado por uma parede fina formada pela deposição interfacial do polímero PCL, obtendo-se por fim a nanocápsula (Figura 15) (Granata *et al.*, 2018; Schaffazick *et al.*, 2003; Jarai *et al.*, 2020; Brum, 2017).

O Tween® 80, utilizado como surfactante não iônico, recobre o PCL garantindo a hidrofília adequada com o sistema formado, impedindo a coalescência das nanocápsulas por um efeito de estabilização estérica, melhorando a estabilidade da partícula formada (Abriata *et al.*, 2019; Granata *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2020).

Figura 15 - Esquema da estrutura de nanocápsulas poliméricas obtidas pelo método de nanoprecipitação.



Fonte: A autora.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE LUTEÍNA

O tamanho de partícula IPD e PZ são análises indispensáveis para a caracterização de sistemas nanoestruturados, podendo ser também válidas em estudos de estabilidade. Os resultados de tamanho de partícula, IPD e PZ das nanocápsulas de PCL contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) e nanocápsulas de PCL branca (NCB) encontram-se na Tabela 3, expressas em média e desvio padrão.

Tabela 3 - Resultados obtidos para a caracterização Físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo luteína e controle negativo.

Formulação	Diâmetro médio (nm)		Índice de Polidispersão		Potencial Zeta (mV)		pH	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
NCB	277,40	± 7,00	0,214	± 0,061	- 37,4	±3,88	5,94 b,c	±0,037
NCL-1	290,30	± 16,36	0,220	± 0,062	-37,3	± 1,57	5,04	± 0,145
NCL-2	296,33	± 26,29	0,229	± 0,038	-19,16 a,b	± 8,14	5,02	± 0,023

Fonte: A autora.

Nota: *Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP). (n = 3) de experimentos realizados em triplicata. Médias seguidas por letras diferentes (a-c) diferem estatisticamente na mesma coluna (teste de Newman – Keuls em $p < 0,05$). Aplicou-se o teste de Tukey nível 5% de probabilidade. a) Comparação com NCB; b) Comparação com a NCL-1; c) Comparação com a NCL-2.

As formulações revelaram a presença de partículas de tamanho nanométrico comum para esse tipo de sistema, que variam entre $277,40 \pm 7,00$ a $296,33 \pm 26,29$ nm. O tamanho reduzido das nanopartículas permite maior superfície de contato, melhorando a eficácia terapêutica do fármaco, tornando-se uma alternativa satisfatória para uso como sistema de liberação transepidermal da luteína no tratamento de sinais do envelhecimento cutâneo, já que o seu tamanho se encontra menor que 500 nm, sugerindo-se que são capazes de penetrar a pele (Bhatia, 2016; Carter; Narasimhan; Wang, 2019).

Os resultados obtidos apresentaram valores próximos quando comparados com o estudo realizado por Brum *et al.* (2017) no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas com luteína para uso em alimentos, que utilizou o mesmo método de síntese e o mesmo polímero, para o qual valor obtido por eles foi de $191,90 \pm 3,24$ nm. Nas nanocápsulas de quitosana e poli- γ - glutâmico contendo luteína descrita por Hong *et al.* (2016) também foram encontradas partículas na faixa de 115 - 260

nm.

O IPD fornece informações sobre a homogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão. São consideradas amostras homogêneas ou monodispersas as amostras que apresentam IPD menor que 0,5, enquanto em valores maiores que 0,5 a amostra é caracterizada como uma dispersão heterogênea ou polidispersa (Bhatia, 2016; Danaei *et al.*, 2018). As suspensões apresentaram IPD variando entre $0,229 \pm 0,038$ (NCL-2) a $0,214 \pm 0,061$ (NCB) podendo ser classificadas como dispersões monodispersas.

Não foi observada diferença significativa entre o diâmetro de partícula e IPD da NCB e nanopartículas contendo luteína ($p > 0,05$), indicando que a presença de luteína não alterou significativamente as características de tamanho e homogeneidade do sistema.

O potencial zeta (PZ) é uma medida quantitativa de carga elétrica superficial e um importante indicador de estabilidade de partículas em suspensão. Esse método baseia-se na repulsão das cargas elétricas que as partículas apresentam quando entram em contato com um líquido. Essas cargas são resultado da dissociação de grupos funcionais da superfície da partícula e do meio dispersante, podendo ser positiva ou negativa dependendo da interação com o meio dispersante (Schaffazick *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2020). Quanto maior for o PZ (± 30 mV) maior são as interações repulsivas entre as partículas e menor é a força de atração entre elas, o que leva à formação de partículas mais estáveis, porque evita a agregação entre elas. Por outro lado, valores menores que ± 30 mV sugerem diminuição na repulsão eletrostática entre as partículas e, conseqüentemente, um aumento na tendência de agregação entre elas (Bhatia, 2016).

As nanocápsulas apresentaram valores de PZ que variaram de $37,4 \pm 3,88$ mV a $-19,16 \pm 8,14$ mV, como demonstrado na Tabela 2, indicando a estabilidade das partículas. Todas as amostras apresentaram residual de superfície negativa, que pode estar relacionado aos grupos carboxílicos da estrutura de poliésteres, como a PCL, que estão depositadas ao redor da nanocápsula (Schaffazick *et al.*, 2003).

O potencial zeta encontrado foi superior ao descrito para nanopartículas poliméricas de PCL com luteína desenvolvidas por Brum *et al.* (2017), que obtiveram potencial zeta de $-5,14 \pm 2,22$ mV. Ademais, foi superior a nanopartículas lipídicas com luteína desenvolvidas por Lacatusu *et al.* (2013), que obtiveram valores de $-34,5$ mV, sugerindo que a concentração e a escolha dos reagentes somado ao

método de síntese utilizados neste trabalho foram mais eficientes na obtenção de nanocápsulas estáveis contendo como ativo a luteína.

O pH é um parâmetro importante e fundamental para garantir a estabilidade e eficácia de formulações contendo nanopartículas em campos como cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. Esse parâmetro influencia diretamente a carga superficial das nanopartículas, pois determina o grau de ionização de grupos funcionais na sua superfície. Por sua vez, isso afeta a estabilidade coloidal das nanopartículas, pois cargas superficiais opostas levam a repulsões eletrostáticas, que impedem a aglomeração das partículas. Além disso, variações no pH podem alterar a solubilidade das nanopartículas, levando a mudanças em sua dispersão e biodisponibilidade em sistemas biológicos (Carneiro- Da-Cunha *et al.*, 2011; Schaffazick, *et al.*, 2003).

As amostras apresentaram pH entre $5,02 \pm 0,023$ (NCL-2) a $5,94 \pm 0,037$ (NCB). O caráter levemente ácido das nanoestruturas é resultado da presença dos grupamentos ácidos carboxílicos terminais do PCL, que podem ser expostos por meio de reações de ionização ou hidrólise desses grupamentos químicos, que devido a sua alta eletronegatividade e efeito de ressonância do éster, diminuem o pH das nanocápsulas (Schaffazick *et al.*, 2003; Solomons & Fryhle 2009). Assim como a presença dos grupamentos hidroxilas na estrutura da luteína podem contribuir na redução do pH das amostras (PubChem 2024), observados pelo pH menor para as amostras que continham a luteína na sua composição em relação a NCB ($p < 0,05$).

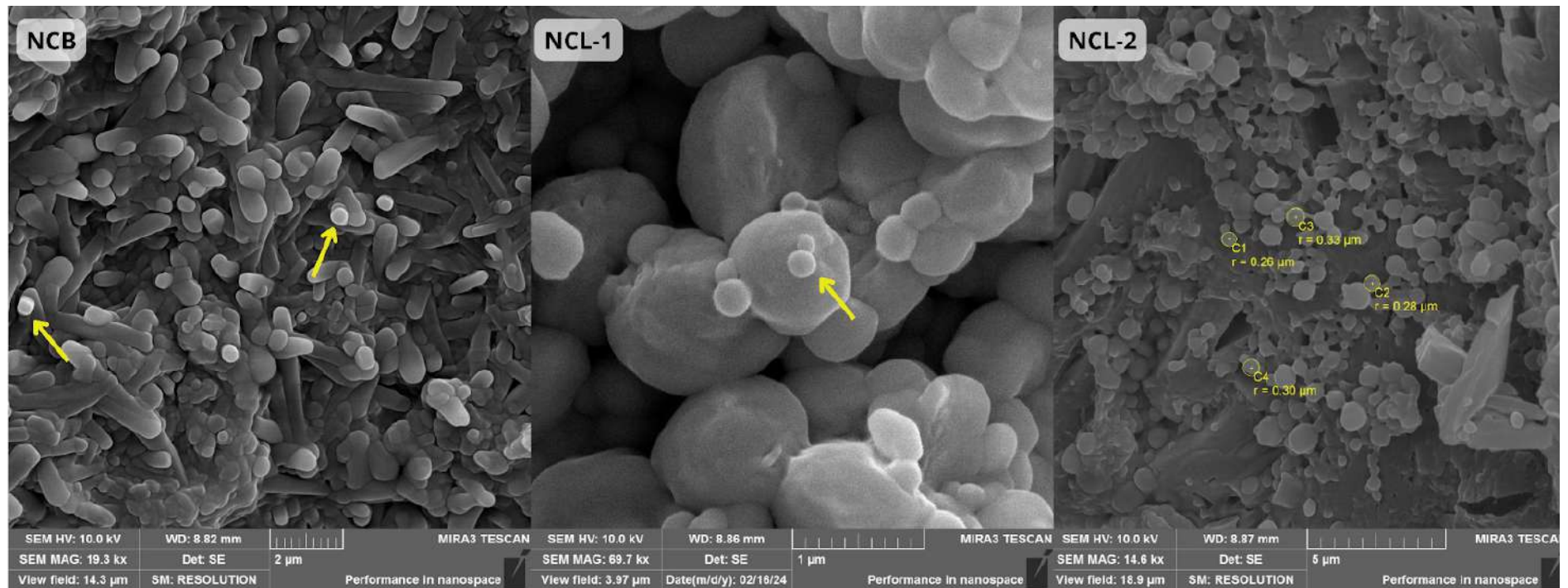
5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE SUPERFÍCIE DAS NANOCÁPSULAS

A partir das imagens obtidas por MEV-FEG foi possível obter informações morfológicas das nanocápsulas, luteína pura, PCL, e mistura física (Figura 16 e 17). A análise morfológica da PCL evidenciou uma superfície levemente irregular, rígida e quebradiça, enquanto a luteína na sua forma pura mostrou-se como pequenos cristais arredondados, de superfície irregular e lisa. Na figura da mistura física pode-se observar a luteína e a PCL agrupadas.

Foi evidenciado que as NCB, NCL-1 e NCL-2 possuem formato esférico bem definido com superfície lisa e uniforme, com ausência de poros e tamanho nanométrico, reafirmando o que foi observado pela técnica do DLS. As características morfológicas visualizadas, são semelhantes ao encontrado na

literatura para nanopartículas poliméricas de PCL realizado por Camargo *et al.* (2020) no desenvolvimento de nanopartículas de tacrolimus; por Ferreira *et al.* (2018), para nanopartículas de disseleneto de difenila, e por Yingngam *et al.* (2019), na síntese de nanocápsulas de mentol.

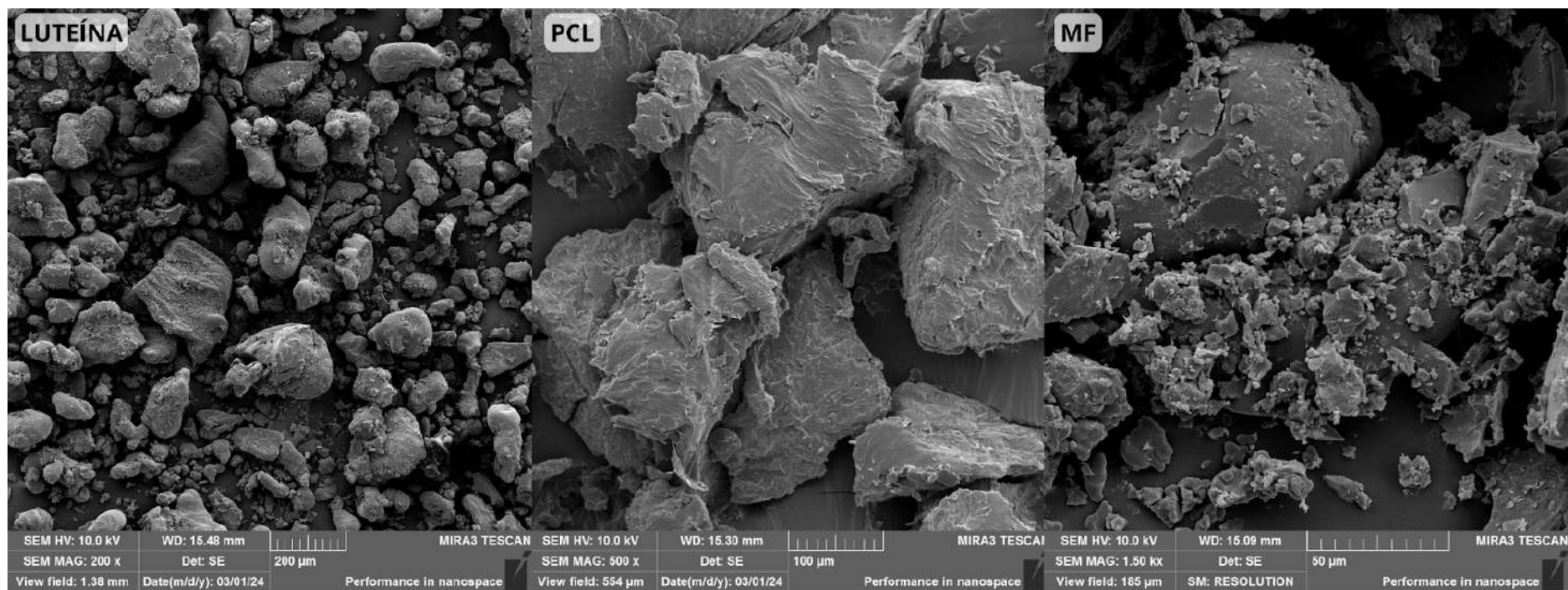
Figura 16 - Análise morfológica das nanopartículas contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) e nanopartículas com ausência de luteína (NCB), por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG) sob tensão de aceleração de 10 kV.



Fonte: A autora.

Nota: As setas indicam as nanocápsulas formadas, indicando uma região mais clara na porção superior, correspondente ao revestimento da parede e uma região central mais escura, correspondente ao núcleo.

Figura 17 - Análise morfológica da luteína pura, PCL triturada e mistura física (PCL: luteína) por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG) sob tensão de aceleração de 10 kV.



Fonte: A autora.

Além disso, as imagens obtidas das nanocápsulas sem e com luteína confirmam a estrutura reservatória característico de nanocápsulas formada pela deposição da PCL, por meio da presença de uma região mais clara na porção exterior correspondendo ao revestimento da parede polimérica e uma região central mais escura, o núcleo. Essa peculiaridade é atribuída a presença da PCL formando um revestimento polimérico ao redor da mistura oleosa de Span[®] 80, ácido caprílico e luteína (Yingngam *et al.*, 2019). Não foi observado a presença de cristais do fármaco na superfície das partículas formadas, indicando que todo fármaco foi encapsulado. Portanto, a técnica de síntese mencionada acima demonstra o sucesso da formação das nanocápsulas.

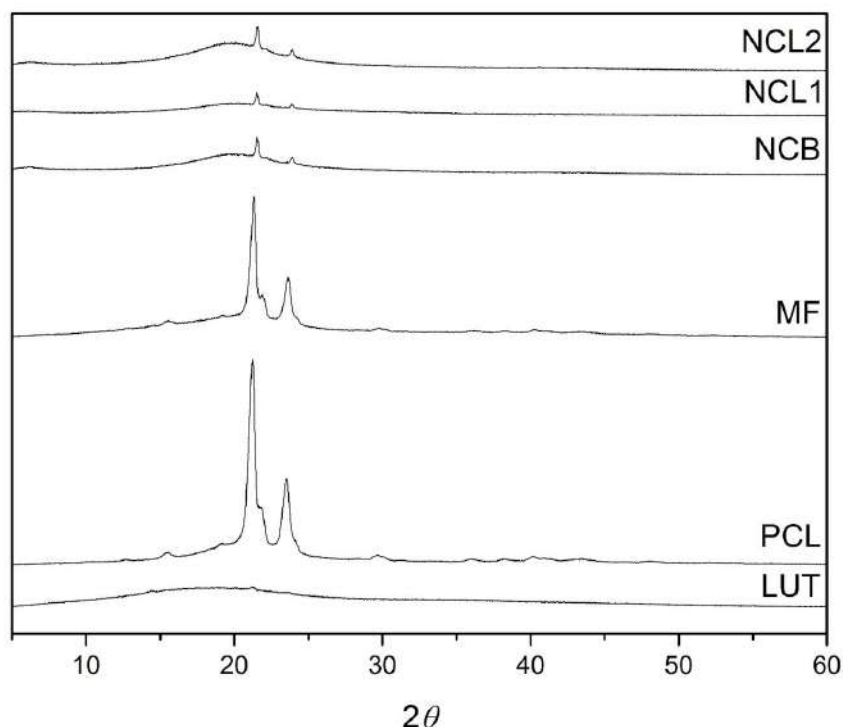
5.4 ANÁLISE ESTRUTURAL

5.4.1 Análise de Difração de Raios X (DRX)

A difração de raios X (DRX) é amplamente empregada na análise das propriedades cristalinas ou amorfas de fármacos. Substâncias cristalinas exibem uma organização ordenada e repetitiva de suas partículas em uma estrutura tridimensional, enquanto substâncias amorfas possuem uma disposição desordenada e aleatória de partículas. Como resultado da sua estrutura desorganizada, substâncias amorfas tendem a ser mais solúveis em solventes que as cristalinas, requerendo menos energia para a sua dissolução. Estas características desempenham um papel fundamental na solubilidade e na cinética de dissolução de fármacos, influenciando diretamente sua eficácia terapêutica (Lia, *et al.*, 2023).

A presença de picos bem definidos no difratograma é atribuída a substâncias cristalinas, enquanto bandas largas indicam substâncias amorfas (Riekes, *et al.*, 2011; Zhang, *et al.*, 2023). A Figura 18 revela os resultados obtidos por DRX para a luteína pura, PCL, mistura física (MF) e para as nanocápsulas poliméricas contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) e sem luteína (NCB).

Figura 18 - Difratoograma da luteína pura, PCL, da mistura física (MF) e nanocápsulas.



Fonte: A autora.

No difratograma da luteína pura, observou-se um padrão amorfo, caracterizado pela ausência de picos e pela presença de uma banda larga. Este comportamento difere dos achados na literatura, onde uma estrutura cristalina foi observada para a luteína, evidenciada por picos de difração proeminentes na faixa de 2θ entre $11,5^{\circ}$ – $21,6^{\circ}$ (Jiao *et al.*, 2023) e em torno de 20° e 25° (Silva *et al.*, 2017). A discrepância observada entre os resultados pode ser atribuída às condições de preparo da luteína, dado que o produto comercial utilizado continha apenas 10% de luteína. Esta baixa concentração sugere que os demais compostos presentes na forma comercial do produto podem interferir na leitura do difratograma da luteína. Tal interferência destaca a necessidade de etapas adicionais de purificação para uma caracterização mais precisa da sua estrutura cristalina.

Em relação a PCL comprovou sua natureza semicristalina, com picos característicos ($2\theta = 21,45$ e $23,73^{\circ}$) (Carletto 2015; Camargo *et al.*, 2020). A mistura física revela picos coincidentes com a do PCL, evidenciando que a mistura física não altera os perfis de cristalinidade e amorfização da luteína (Camargo *et al.*, 2020).

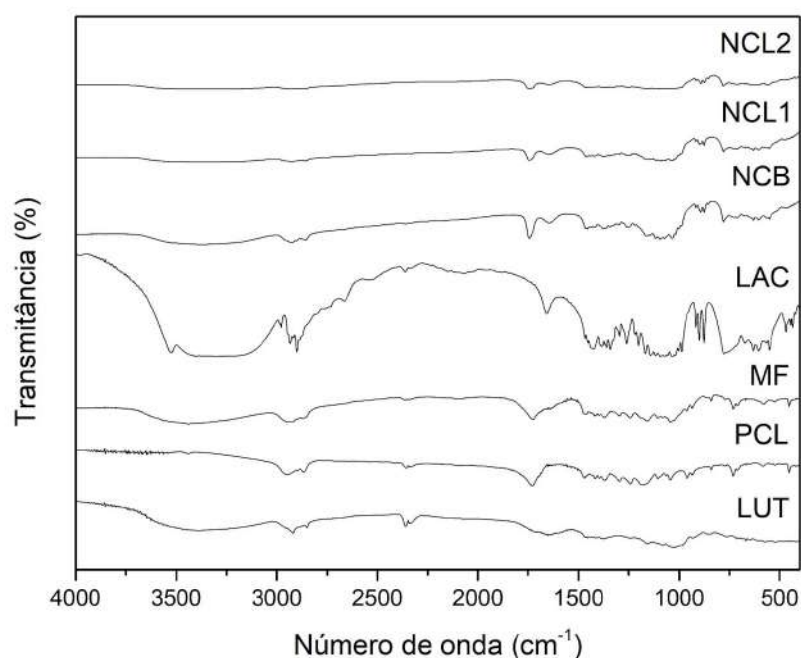
Os resultados de DRX demonstraram que a nanoencapsulação preservou as características amorfas da luteína durante o encapsulamento. Em todas as

nanocápsulas, tanto com a presença ou ausência de luteína apresentaram picos de cristalinidade referentes a PCL. Esse achado indica que o método de encapsulação foi bem-sucedido, com o fármaco predominantemente disperso molecularmente no núcleo oleoso das partículas, protegido pela matriz polimérica de PCL. Essa disposição dificulta sua detecção da luteína por técnicas de análise de superfície, confirmando a natureza das partículas como sendo nanocápsulas, sendo capaz de ser liberado pela matriz polimérica para exercer seu mecanismo de ação (Camargo *et al.*, 2020; Lia *et al.*, 2023).

5.4.2 Avaliação Por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de *Fourier* (FTIR)

A análise por FTIR foi realizada para avaliar a presença de grupos funcionais característicos de nanocápsulas de PCL contendo luteína, bem como possíveis alterações no espectro em decorrência das interações moleculares entre fármaco e a formulação (Bhatia 2016; Jarai 2020). A Figura 19 mostra os espectros de FTIR do PCL, luteína pura e nanocápsulas poliméricas contendo luteína (NCL-1 e NCL-2).

Figura 19 - Espectros de FTIR da luteína pura, PCL, mistura física (MF), lactose (LAC) e nanocápsulas poliméricas.



Fonte: A autora.

As absorções infravermelhas características da luteína incluíram a banda de vibração de estiramento O–H acima de 3000 cm^{-1} , os picos de vibração de estiramento C–H em 2.918 cm^{-1} e 2.848 cm^{-1} , e picos discretos de vibração de estiramento C–C em 1.715 cm^{-1} (Silva *et al.*, 2017; Jarai 2020). O espectro FTIR do PCL mostrou bandas típicas do polímero como vibrações de estiramento de carbono hibridizado sp^3 em 2.948 , 2.899 e 2.865 cm^{-1} , vibração de estiramento C=O de éster em 1.729 cm^{-1} , vibrações angulares de carbono hibridizado sp^3 em 1.470 cm^{-1} , vibrações de estiramento simétrico C–O em 1297 e 1241 cm^{-1} , estiramento assimétrico C–O em 1175 cm^{-1} e vibrações angulares de carbono hibridizado sp^3 em 731 cm^{-1} (Camargo *et al.*, 2020).

As bandas de absorção atribuídas a MF corresponderam à sobreposição dos espectros de FTIR do fármaco puro e do polímero indicando que não houve reação química que modificasse a estrutura do fármaco ou do polímero, sugerindo que o polímero está servindo apenas como carreador para a droga. A lactose monohidratada possui bandas de vibrações de estiramento OH em ligação de hidrogênio intermolecular (3530 cm^{-1}) e OH polimérico (3300 cm^{-1}), vibrações de estiramento de carbono hibridizado sp^3 (2980 , 2934 , 2898 e 2879 cm^{-1}), vibrações de estiramento C–O e estiramento assimétrico C–O–C de éter (1035 cm^{-1}) e vibrações angulares OH (775 cm^{-1}) (Camargo *et al.*, 2020).

Em relação aos espectros de NCs descarregados e NCs carregados com luteína, foram confirmados sinais relacionados à lactose utilizada para liofilização com vibração angular OH a 775 cm^{-1} , bem como bandas pertencentes ao PCL, principalmente devido à vibração de estiramento C=O do polímero em 1743 cm^{-1} . A ligeira mudança no alongamento C=O do PCL do polímero puro (1729 cm^{-1}) provavelmente estava relacionada ao método de preparação da NC para a análise. Nenhum sinal FTIR de luteína foi registrado para os espectros NCL-1 e NCL-2, o que pode sugerir o encapsulamento da droga.

Avaliando o conjunto de dados obtidos até aqui, sugere-se que o método proposto foi eficiente na obtenção de nanocápsulas de PCL na veiculação da luteína.

5.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS

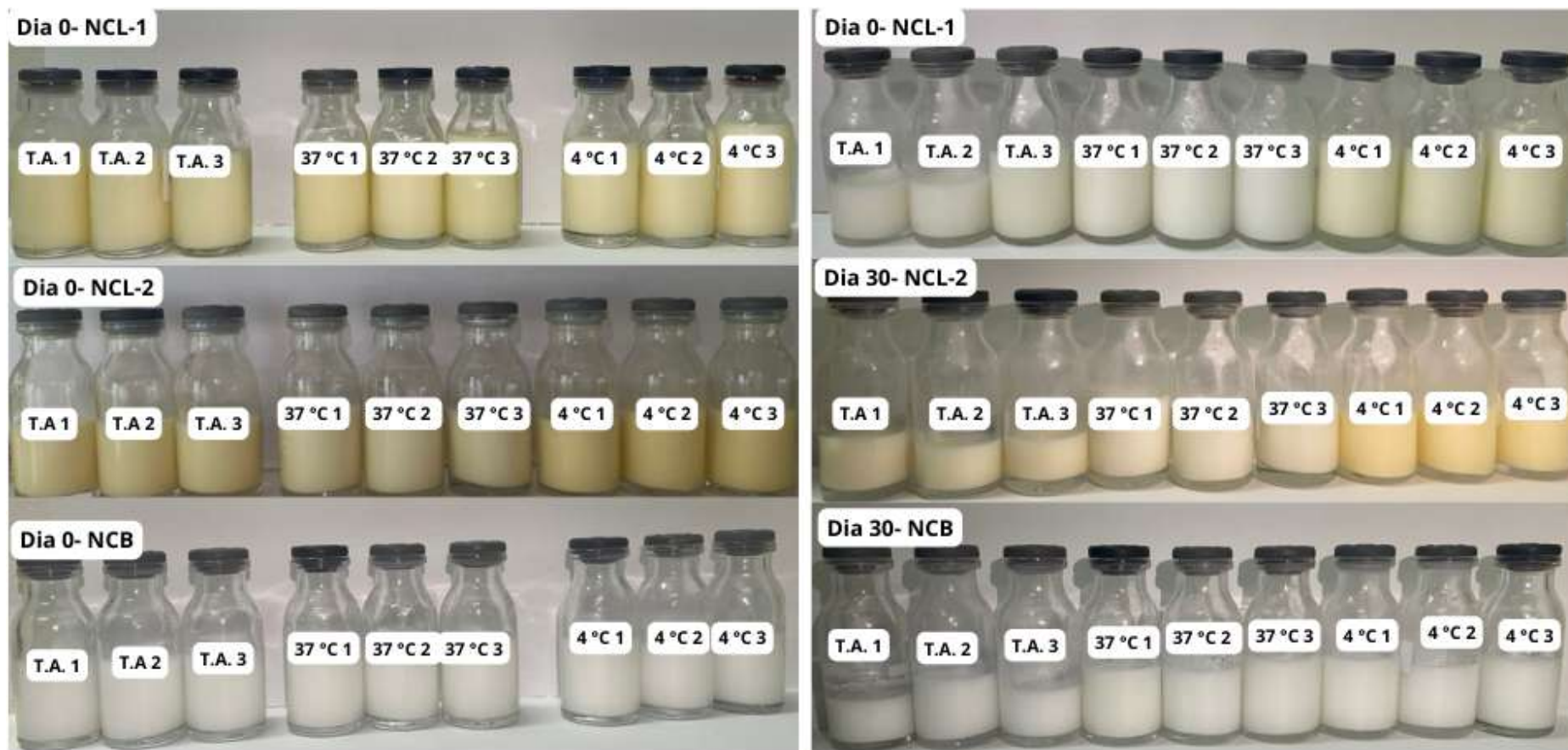
Nanopartículas constituídas por polímeros são transportadores promissores

para veiculação na pele, já que estas partículas confere alta estabilidade ao princípio ativo, maior taxa de absorção e distribuição, o que é interessante a uma grande gama de compostos, como carotenoides que possuem ação antioxidante (Mihiranyan; Ferraz; Strømme, 2012; Mordorski; Landriscina; Friedman, 2016; Brum, 2017). Entretanto, tal atribuição necessita ser verificada no que tange a sua estabilidade físico-química em armazenamento a longos períodos.

O estudo de estabilidade foi conduzido em diferentes temperaturas por um período de 30 dias a fim de verificar o comportamento das nanocápsulas. Os resultados podem ser analisados por meio dos Gráficos 2 – 4.

Através das análises macroscópicas das formulações constatou-se que todas as formulações mantiveram o mesmo aspecto leitoso inicial característico das nanocápsulas em suspensão coloidal, apresentando boa estabilidade físico-química e ausência de processos de formação de creme, sedimentação ou floculação, conforme observado na Figura 20.

Figura 20 - Aspectos macroscópicos das NCs (NCL-1, NCL-2 e NCB) armazenadas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente (T.A.), 37 °C (estufa), e 4 °C (geladeira) durante 30 dias para o estudo de estabilidade.

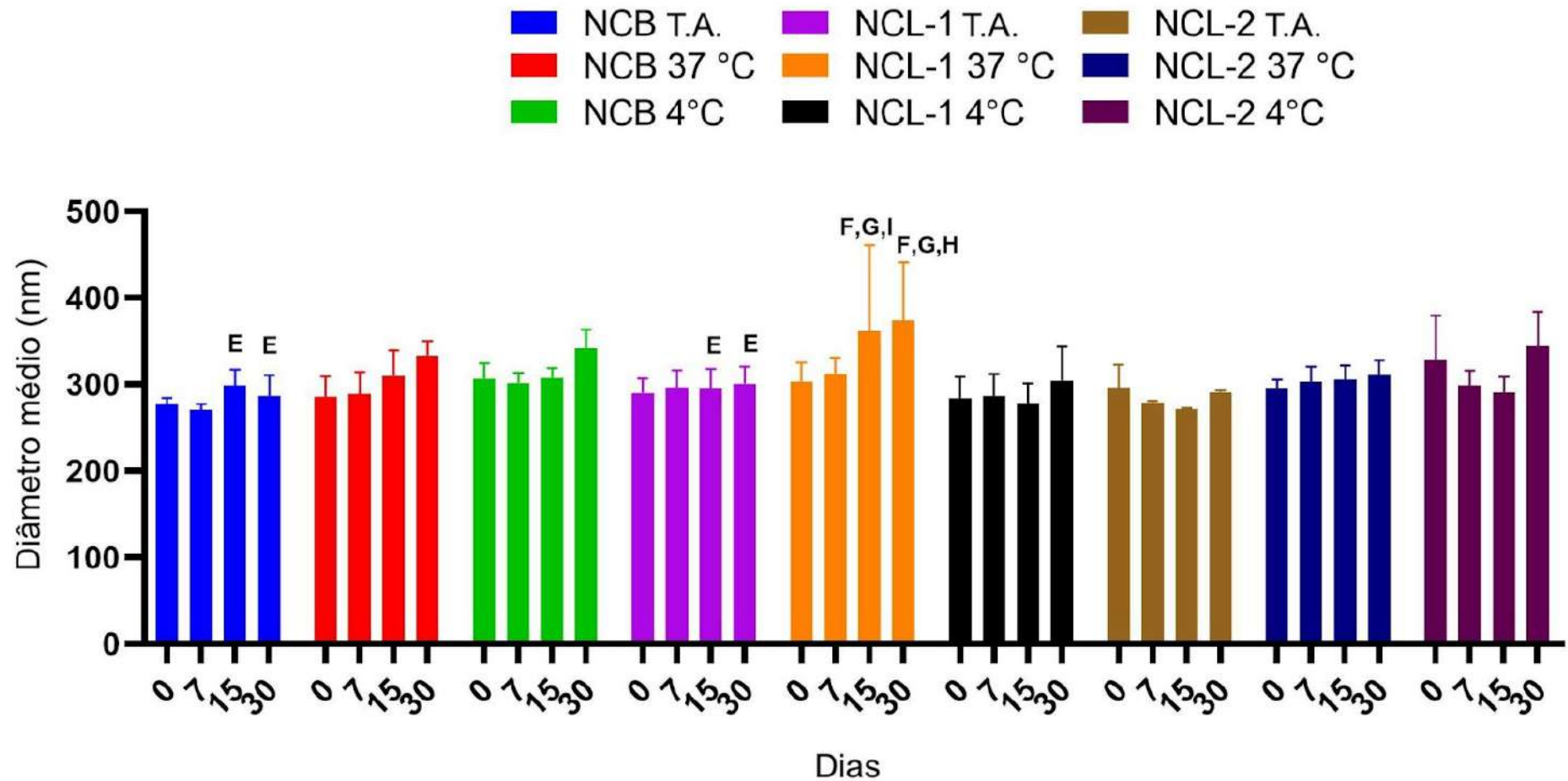


Fonte: A autora.

A partir do 15º dia de armazenamento, as amostras NCL-1, NCL-2 e NCB armazenadas a 37 °C apresentaram tamanhos de partículas maiores em comparação com aquelas armazenadas em temperatura ambiente e na geladeira. Entretanto, essa diferença só foi significativa ($p < 0,05$) para a NCL-1 a 37 °C. A presença de luteína, juntamente com as altas temperaturas, influenciou o aumento do tamanho das amostras à medida que os dias de análise avançaram.

O Gráfico 1 indicou que NCL-1, NCL-2 e NCB não sofreram grandes modificações ao longo do tempo em seu tamanho, sugerindo ausência de coalescência e degeneração das amostras confirmadas pela análise macroscópica (Figura 20).

Gráfico 1 - Estudo de estabilidade das NCL-1, NCL-2 e NCB dependendo do diâmetro médio (nm).



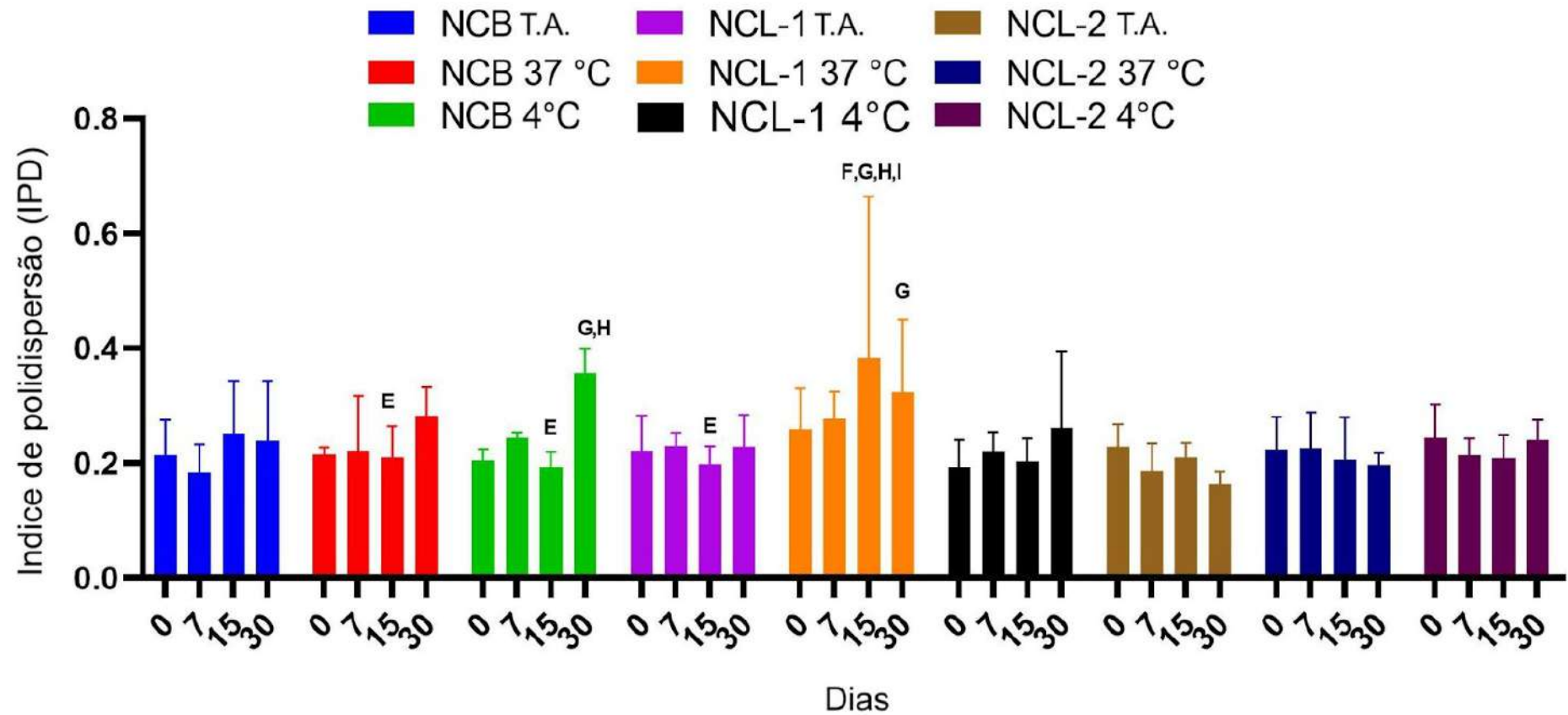
Fonte: A autora.

Nota: Temperatura ambiente: T.A.*p < 0.05; E) comparação com a NCL-1 armazenada a 37 °C; F) comparação com a NCL-1 armazenada a 4 °C. G) comparação com a NCL-2 armazenada a T.A; H) comparação com a NCL-2 armazenada a 37 °C.

O índice de polidispersidade (IPD) aumentou em todas as amostras de análise a medida que o período de estudos aumentou, principalmente para as amostras armazenadas a 37 °C, mas apesar disso, o Gráfico 2 nos mostra que essa diferença no IPD das amostras não causou prejuízo do sistema, uma vez que os valores permaneceram aceitáveis, ou seja, menores que 0,3, sendo satisfatório para uso tópico e demonstrando que as amostras permanecem em uma distribuição unimodal de seus diâmetros médios, indicando que ao longo do tempo, as amostras continuaram dispersas sem ocorrer agregação ou floculação (Zanetti *et al.*, 2019; Diyanat *et al.*, 2019).

Nanoestruturas como as nanocápsulas são cineticamente estáveis devido ao movimento browniano das partículas nanométricas, o que previne floculação e coalescência aparente durante o armazenamento a longo prazo e mantém uma distribuição homogênea. Isso reforça seu uso como um sistema de entrega inovador para luteína (Schaffazick S *et al.*, 2003; Deng S *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2023).

Gráfico 2 - Estudo de estabilidade das NCL-1, NCL-2 e NCB dependendo do Índice de polidispersão (IPD).



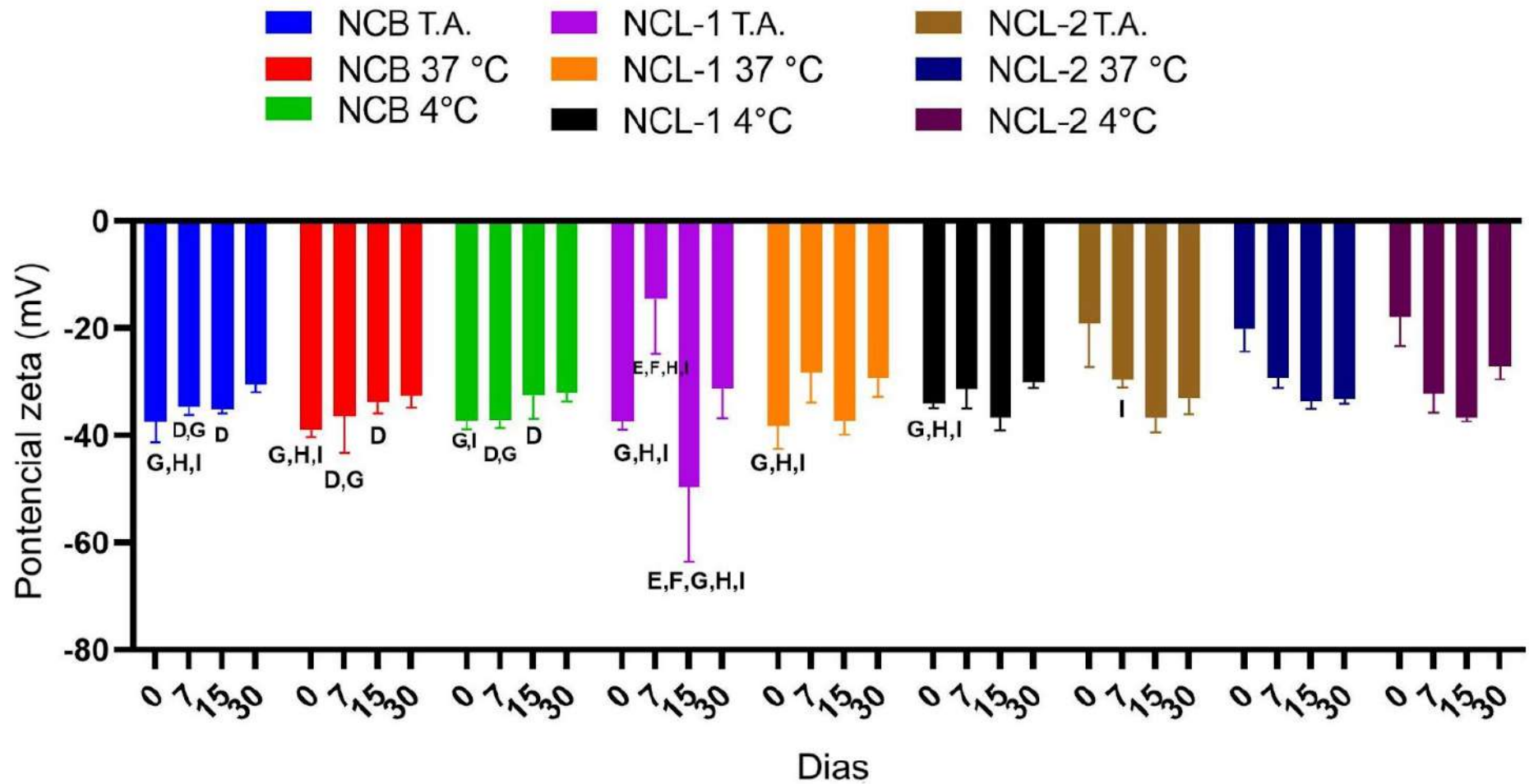
Fonte: A autora.

Nota: Temperatura ambiente: T.A.*p < 0.05; E) comparação com a NCL-1 armazenada a 37 °C; F) comparação com a NCL-1 armazenada a 4 °C. G) comparação com a NCL-2 armazenada a T.A; H) comparação com a NCL-2 armazenada a 37 °C; I) comparação com a NCL-2 armazenada a 4 °C.

O potencial zeta revelou estabilidade eletrostática, com valores próximos a -30 mV mesmo após 30 dias de armazenamento. Diferenças significativas foram observadas no potencial zeta entre as amostras sem luteína e aquelas com luteína em diferentes temperaturas, indicando que a presença da luteína diminuiu o potencial zeta tornando-o mais positivo.

A NCL-1 em temperaturas diferentes e em comparação com a NCL-2 em diferentes temperaturas apresentou diferenças significativas no potencial zeta, indicando que as condições de armazenamento influenciam o potencial zeta, especialmente a 37 °C, onde as variações são mais pronunciadas, que sugerem possíveis mudanças na estabilidade eletrostática das nanocápsulas nessas condições, provavelmente devido à degradação do polímero e à alteração na exposição de cargas positivas quando submetidas a temperaturas elevadas (Melo *et al.*, 2010). Apesar das diferenças observadas na Figura 9, todas as amostras exibiram valores de potencial zeta próximos a -30 mV em todas as condições ao longo dos 30 dias, incluindo as amostras armazenadas a 37 °C.

Gráfico 3 - Estudo de estabilidade das NCL-1, NCL-2 e NCB dependendo do potencial zeta (mV).



Fonte: A autora.

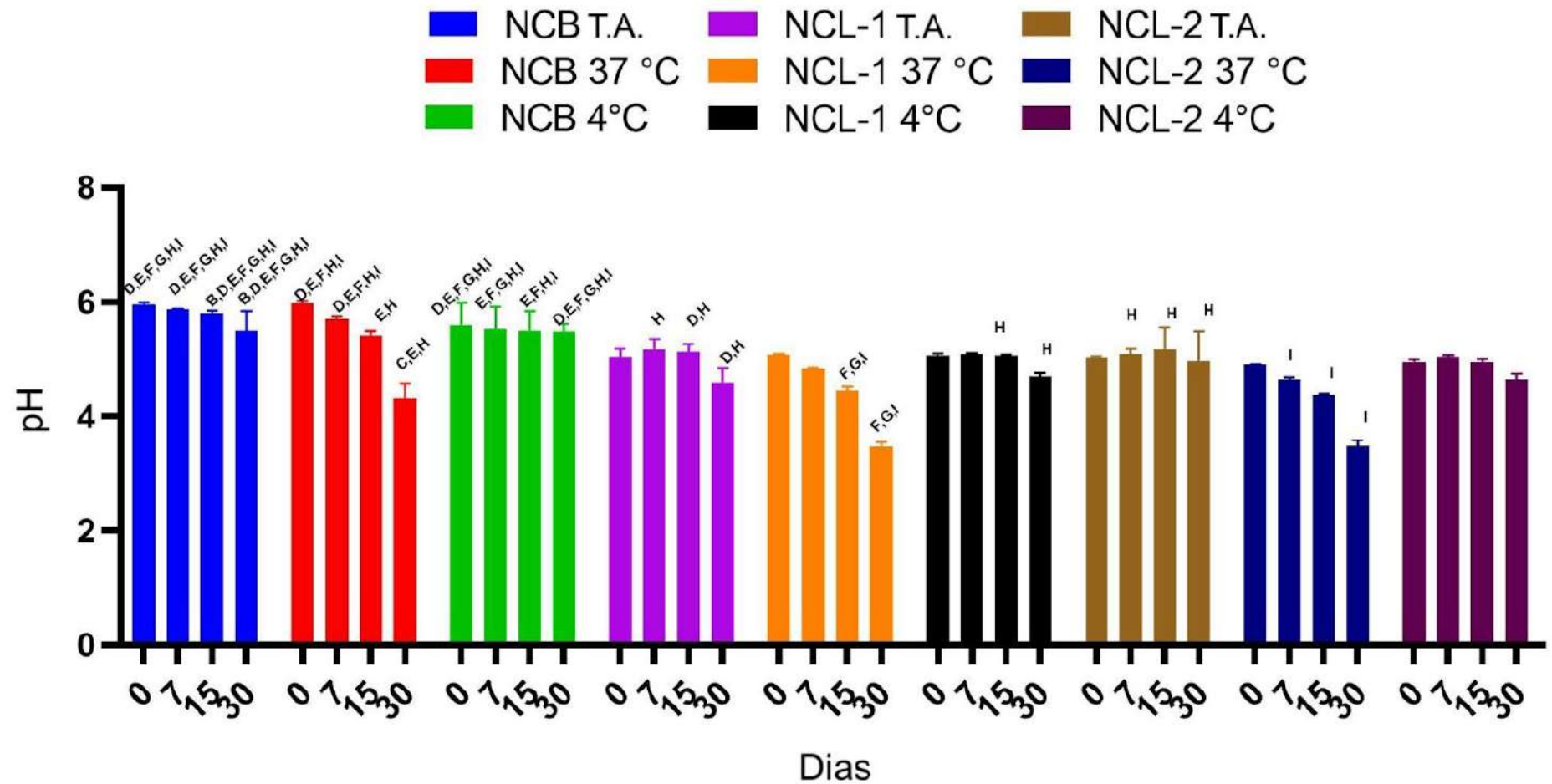
Nota: Temperatura ambiente: T.A.*p < 0.05; D) comparação com a NCL-1 armazenada a T.A.; E) comparação com a NCL-1 armazenada a 37 °C; F) comparação com a NCL-1 armazenada a 4 °C. G) comparação com a NCL-2 armazenada a T.A.; H) comparação com a NCL-2 armazenada a 37 °C; I) comparação com a NCL-2 armazenada a 4 °C.

As amostras de NCB armazenadas à temperatura ambiente, 37 °C e 4 °C apresentaram um pH próximo a 6 ao longo dos 30 dias de estudo, com a NCB a 4 °C exibindo uma menor variação no pH durante o período analisado. As diferenças significativas observadas indicam que o pH foi influenciado tanto pelas condições de armazenamento quanto pela presença de luteína (Melo *et al.* 2010; Mitra *et al.*, 2021; Nikhat *et al.*, 2022).

As amostras NCL-1 armazenadas à temperatura ambiente e à 4 °C mantiveram o pH relativamente estável ao longo do tempo, com pH próximo de 5, enquanto que, NCL-1 armazenadas a 37 °C apresentaram uma diminuição mais acentuada no pH ao longo dos dias, com valor de pH de $3,46 \pm 0,081$ no dia 30. O mesmo comportamento é observado para a amostra NCL-2, onde as amostras armazenadas à temperatura ambiente e a 4 °C mantiveram o pH próximo à 5, enquanto a 37 °C o valor de pH foi de $3,47 \pm 0,102$ no dia 30.

O Gráfico 4 demonstra que o pH das amostras de nanocápsulas é influenciado pela temperatura e pelo tempo de armazenamento. Em geral, as amostras armazenadas a 37 °C apresentaram uma diminuição mais acentuada no pH ao longo do tempo, indicando possíveis mudanças na estabilidade das nanocápsulas nessas condições, provavelmente devido à hidrólise dos triglicerídeos de cadeia média que compõem o núcleo ou ao surfactante que é liberado da interface quando os agregados poliméricos ou os produtos de degradação da luteína são influenciados pelo aumento da temperatura (Melo *et al.*, 2010; Mitra *et al.*, 2021; Nikhat *et al.*, 2022). As amostras armazenadas à temperatura ambiente e a 4 °C mantiveram um pH mais estável ao longo do período de estudo.

Gráfico 4 - Estudo de estabilidade das NCL-1, NCL-2 e NCB dependendo do pH.



Fonte: A autora.

Nota: Temperatura ambiente: T.A.*p < 0.05; B) comparação com a NCB armazenada a 37 °C; C) comparação com a NCB armazenada a 4 °C; D) comparação com a NCL-1 armazenada a T.A.; E) comparação com a NCL-1 armazenada a 37 °C; F) comparação com a NCL-1 armazenada a 4 °C. G) comparação com a NCL-2 armazenada a T.A.; H) comparação com a NCL-2 armazenada a 37 °C; I) comparação com a NCL-2 armazenada a 4 °C.

Ao final do período de análise, NCL-1 e NCL-2 armazenadas a temperatura ambiente e 37 °C apresentaram mudança de coloração do amarelo para o branco (Figura 20), que pode ser possivelmente pela oxidação da luteína que é favorecida em temperaturas de armazenamento elevadas, causando alterações físicas nas nanocápsulas.

Já foi relatado na literatura que devido às ligações duplas conjugadas e grupos hidroxilas na luteína, ela é suscetível à oxidação quando exposto ao ar e à luz gerando produtos incolores (Aparício-Ruiz, Mínguez-Mosquera & Gandul-Rojas 2011; Mitra *et al.*, 2021; Nikhat *et al.*, 2022). Enquanto as NCL-1 e NCL-2 armazenadas a 4 °C não apresentaram alteração macroscópica.

Esses achados são consistentes com os obtidos por Álvarez-Henao *et al.*, 2018 que relataram que a luteína se degrada rapidamente, diminuindo 70% em três dias, mas quando encapsulada, após 21 dias à 25 °C apenas 39% da luteína encapsulada foi degradada. Após 21 dias a 50 °C a micropartícula com luteína apresentou aproximadamente 20% da luteína encapsulada já a mistura física contendo luteína apresentou apenas 1% de luteína. O mesmo foi observado Okonogi e Riangjanapatee (2015) com nanopartículas lipídicas sólidas contendo licopeno um carotenoide semelhante à luteína, onde revelaram que a estabilidade do licopeno encapsulado é 100 vezes maior do que em solução. Esta descoberta demonstra uma melhoria significativa na estabilidade de carotenoides como a luteína quando ela é encapsulada.

O estudo de estabilidade realizado em diferentes temperaturas verificou o comportamento destas nanocápsulas. Embora essas nanoestruturas sejam sensíveis à temperatura elevadas devido ao efeito no movimento das gotículas, a tendência de agregação das gotículas é menor em comparação com formulações em escalas maiores, como as macroemulsões e/ou a veiculação de luteína sem formulação adequada (Schaffazick *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2023).

Os resultados obtidos revelaram que não houve diferença significativa nos aspectos físico-químicos das amostras analisadas (NCB, NCL-1 e NCL-2) quando armazenadas em temperatura ambiente e na geladeira à 4 °C, indicando que as nanocápsulas não sofreram alterações ao longo do tempo, sendo a forma de armazenamento adequadas para preservar as características das nanocápsulas obtidas. Não houve diferença significativa nos aspectos físico-químicos das

amostras armazenadas em temperatura ambiente e na geladeira. A PCL foi sugestiva como material encapsulante promissor, protegendo a luteína de fatores ambientais e mantendo as nanopartículas estáveis por até 30 dias.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O ácido ascórbico é reconhecido como um padrão de referência devido à sua notável capacidade antioxidante. A unidade de equivalente de ácido ascórbico (EAA) é empregada para expressar a atividade antioxidante de uma amostra, quantificando a quantidade necessária de ácido ascórbico para igualar o efeito antioxidante observado na amostra de análise. Portanto, valores elevados de equivalente de ácido ascórbico indicam uma maior atividade antioxidante na amostra analisada (Boroski *et al.*, 2015).

A avaliação da atividade antioxidante das NCL-1, NCL-2, NCB e luteína livre foram avaliadas por meio do Poder Redutor de Ferro III, inibição do cátion-radical ABTS^{•+} e DPPH[•]. Os resultados obtidos foram expressos por média e desvio padrão em equivalente de ácido ascórbico, conforme apresentados na Tabela 4, tendo como base a curva analítica construída com o padrão ácido ascórbico de cada análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 4 - Atividade antioxidante da luteína livre (LUT), nanocápsula branca (NCB), nanocápsula com luteína (NCL-1 e NCL-2).

Amostra	FRAP ($\mu\text{g AA mL}^{-1}$ amostra)*	DPPH [•] ($\mu\text{g AA mL}^{-1}$ amostra)*	ABTS ^{•+} ($\mu\text{g AA mL}^{-1}$ amostra)*
LUT	539,38 $\pm$ 10a	1186,99 $\pm$ 24,32c	418,12 $\pm$ 21,46a
NCB	48,43 $\pm$ 7.96b	2825,25 $\pm$ 19,28a	37,01 $\pm$ 3,04 c
NCL-1	267,84 $\pm$ 13.86c	2780,73 $\pm$ 7,51a	65,24 $\pm$ 0,34c
NCL-2	556,30 $\pm$ 3.84a	2966,43 $\pm$ 23,88b	148,21 $\pm$ 5,7b

Fonte: A autora.

Nota: *Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). (n = 3) de experimentos realizados em triplicata. Médias seguidas por letras diferentes (a – c) diferem estatisticamente na mesma coluna (teste de Newman – Keuls em p < 0,05). Aplicou-se o teste de Tukey nível 5% de probabilidade.

Para os três ensaios avaliados, as nanocápsulas contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) exibiram atividades antioxidantes interessantes e melhoradas em comparação com as NCB, com exceção no teste DPPH, cujos resultados são estatisticamente semelhantes (entre NCL-1 e NCB). Essa diferença pode ser

explicada devido aos efeitos estéricos do DPPH, aumentando a dificuldade de reagir com as moléculas de radicais. Portanto, hidroxilas de agentes emulsificantes presentes nas matriz da nanocápsulas como Tween 80[®], Span 80[®] e ácido caprílico também contribuem distintamente na atividade antioxidante das partículas (Shu *et al.*, 2023).

Para o ensaio de FRAP e DPPH a NCL-2 apresentou atividade melhorada da luteína em relação à luteína livre relevância da nanotecnologia na potencialização da atividade antioxidante da luteína. Para o ABTS•+ foi demonstrado maior contribuição na atividade antioxidante luteína livre em relação a NCL-1 e NCL-2 ($p < 0,05$). Mas notavelmente, a atividade antioxidante em NCL-2 para os três ensaios foi superior que a NCL-1 e NCB.

Para os três ensaios realizados, foi demonstrado a influência da concentração de luteína nas nanocápsulas, por exemplo, NCL-2 (556,30 $\mu\text{g AA mL}^{-1}$) é maior do que NCL-1 (267,84 $\mu\text{g AA mL}^{-1}$) no ensaio FRAP. Esses resultados exibem a capacidade das nanocápsulas em proteger compostos bioativos, neste caso a luteína, e manter sem prejuízo suas propriedades antioxidantes. A dependência da concentração de luteína carregada pode ser observada nos resultados exibidos da Tabela 4.

A luteína, um carotenoide oxigenado, é uma das xantofilas mais importantes reconhecida pelo seu potencial antioxidante (Sharma; Kuhad; Bhandari, 2022; Zaid *et al.*, 2022; Flieger *et al.*, 2024). A importância dos carotenoides está em seus efeitos antioxidantes, principalmente na extinção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Os ROO• são os únicos radicais livres capazes de destruir completamente o carotenoide, porque os carotenoides, incluindo a luteína, possuem ligações duplas conjugadas em sua estrutura interna (Shu *et al.*, 2023). A série de interações rotacionais e vibracionais com o solvente pode levar à liberação da nova energia adquirida, retornando a um estado não excitado e permitindo-lhes reagir e extinguir mais radicais livres (Gulcin, 2020).

A luteína, e outros carotenoides, possuem ligações duplas conjugadas que formam um sistema conjugado rico de elétrons do polieno que podem interagir com reagentes eletrofílicos, como espécies reativas de oxigênio (ROS) - espécies radicais e não radicais - contribuindo para diminuir o estresse oxidativo (Shu *et al.*, 2023; Mitri *et al.*, 2011; Cheng; Ferruzzi; Jones, 2019; Bodoki *et al.*, 2019).

Os mecanismos envolvidos nessas reações antioxidantes, geralmente, são

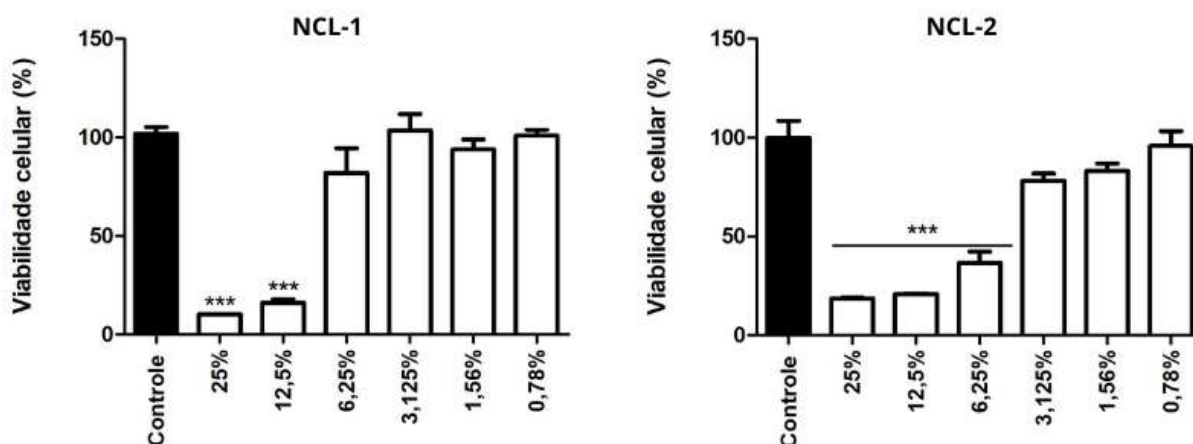
transferência de elétrons, doação de hidrogênio e adição de radicais. No entanto, é mais provável a predominância do mecanismo de transferência de elétrons (Pisoschi & Pop 2015). Pois, conhecendo os mecanismos envolvidos, justificam-se os resultados mostrados, que no ensaio FRAP demonstram claramente a contribuição da propriedade antioxidante da luteína nas nanocápsulas, devido à predominância da transferência de elétrons nesse ensaio, que avalia o poder redutor de Fe^{3+} para Fe^{2+} . Por outro lado, os ensaios DPPH• e ABTS•+ por envolver mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) e transferência de elétrons, mas por se tratarem de radicais de moléculas grandes, estáveis, estericamente impedidos, isso de certa maneira, dificulta o acesso dos antioxidantes presentes nas nanocápsulas justificando os resultados melhores observados para a luteína não encapsulada (Schaich *et al.*, 2015; Shahidi & Zhong 2015; Lichtenberg & Pinchuk 2015).

A eficácia aprimorada das nanocápsulas de luteína frente os distintos métodos, sugere que a encapsulação pode ser uma estratégia efetiva para melhorar as propriedades antioxidantes de compostos naturais, com implicações significativas para o desenvolvimento de fármacos e cosméticos (Brum, 2017; Deng *et al.*, 2020; Sahu *et al.*, 2021).

5.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A citotoxicidade das NCL-1 foi avaliada por meio do teste de viabilidade celular em fibroblastos de linhagem 3T3, por meio dos ensaios com MTT em 24 horas e em concentrações diferentes da NCL-1 e NCL-2. Os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Efeito das nanocápsulas contendo luteína (NCL-1 e NCL-2) sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, após 24 horas, pelo método do MTT.



Fonte: A autora.

Nota: Como controle negativo (controle) empregou-se apenas o veículo utilizado para diluir as amostras. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM ($n = 6$). Anova, seguida pelo teste post-hoc de tukey. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle.

Comparando com as células que receberam apenas o controle (meio DMEM) que foram padronizadas como 100% de viabilidade celular, as NCL-1, em concentrações de 25,0% a 12,5%, foi observada uma diminuição na viabilidade celular com $p < 0,001$, equivalente a concentrações de luteína de 247,50 $\mu\text{g/mL}$ e 123,75 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto isso, concentrações entre 6,25% a 0,78% não mostraram diferença significativa na viabilidade celular entre as concentrações testadas de NCL-1 em comparação com o controle, indicando que em concentrações inferiores a 123,75 $\mu\text{g/mL}$, a nanoformulação não foi citotóxica. Em contraste, a NCL-2 mostrou toxicidade de 25% a 6,25% ($p < 0,001$), o que é justificado pelo dobro da concentração de luteína em sua composição em comparação com a NCL-1. Assim, as nanocápsulas poliméricas de PCL contendo luteína não exibiram citotoxicidade significativa em concentrações inferiores a 61,87 $\mu\text{g/mL}$, indicando que as nanoformulações são seguras.

Dessa forma, uma diminuição dependente da concentração na viabilidade celular foi observada no estudo de viabilidade celular 3T3, com uma redução progressiva na porcentagem de células viáveis à medida que a concentração de NCL-1 e NCL-2 aumentava. Esses resultados sugerem uma relação dose-dependente entre a concentração de luteína e seus efeitos na viabilidade celular.

Bolla *et al.* (2020) conduziram uma investigação acerca da citotoxicidade de

nanopartículas poliméricas compostas por PLGA-PEG-biotina, as quais continham luteína, em células ARPE-19. Os resultados da análise revelaram que tanto a forma livre quanto a encapsulada da luteína não apresentaram efeitos citotóxicos em concentrações de 10, 20 e 50 µg/mL. Ademais, constatou-se que a luteína encapsulada exibiu uma menor taxa de citotoxicidade em comparação à luteína livre, sugerindo que a nanoformulação se mostrou segura, eficaz e não tóxica. Este achado é congruente com os resultados obtidos por Chittasufho, Posritong e Ariyawong (2019), os quais observaram um fenômeno similar em células ARPE-19 frente a nanopartículas de PLGA contendo luteína em um ensaio de viabilidade celular. Mesmo após um período de análise de 72 horas, a viabilidade celular permaneceu superior a 82% do controle, quando submetidas a concentrações variando de 1 a 500 µg/mL da amostra em questão.

Esses resultados somados aos dados da literatura revelaram que as nanopartículas de luteína têm boa biocompatibilidade, nenhuma citotoxicidade *in vitro*, e potencial aplicação em produtos dermocosméticos como uma estratégia para prevenir os sinais de envelhecimento da pele.

6 CONCLUSÃO

Com base nos dados coletados e analisados no presente estudo, conclui-se que a técnica de deposição interfacial de polímeros pré-formados para a elaboração de nanocápsulas poliméricas demonstrou ser notavelmente eficaz. As avaliações físico-químicas conduzidas revelaram a obtenção de partículas com dimensões nanométricas apropriadas para a permeação cutânea, apresentando um pH compatível com o da pele, distribuição de tamanho de partícula monodispersa e estabilidade eletrostática significativa. Tais características foram corroboradas por análises morfológicas, que evidenciaram partículas de forma esférica, dimensões nanométricas, e superfícies lisas e uniformes.

A difração de raios X confirmou que o método de encapsulação foi eficiente e que a luteína encontra-se prioritariamente no núcleo, reafirmando a obtenção das nanocápsulas como observado nas análises morfológicas. Enquanto as análises de FTIR confirmaram que não houve reação química que mudasse a estrutura química do fármaco ou polímero, indicando que ambos não interagem significativamente.

Os ensaios para verificar a estabilidade físico-química dos sistemas nanoparticulados demonstraram que a temperatura ambiente e a temperatura de refrigeração a 4 °C são as condições ideais de armazenamento para preservar as características físico-químicas das nanoformulações por até 30 dias.

Adicionalmente, os estudos referentes à atividade antioxidante sublinharam a importância estratégica da nanotecnologia na amplificação da eficácia antioxidante da luteína, conforme observado nos métodos de avaliação empregados.

As nanocápsulas contendo luteína mostraram-se seguras e não citotóxicas para as células 3T3 em concentrações de 61,87 µg/mL a 7,73 µg/mL. Esses resultados sugerem que as nanocápsulas de PCL têm potencial como nanocarreadores eficazes para entregar luteína topicamente à pele, possibilitando assim a entrega de seus benefícios terapêuticos. Além disso, esta pesquisa oferece *insights* valiosos para o desenvolvimento de produtos dermocosméticos incorporando nanotecnologia.

REFERÊNCIAS

- ABAMOR, E. S.; TOSYALI, O. A.; BAGIROVA, M.; ALLAHVERDIYEV, A. Nigella sativa oil entrapped polycaprolactone nanoparticles for leishmaniasis treatment. **IET Nanobiotechnology**, v. 12, n. 8, p. 1018–1026, 2018.
- ABDEL-AAL, ES. M. *et al.* Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1169-1185, 2013.
- ABRIATA, J. P. *et al.* Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. **Materials Science and Engineering**. v. 96, p. 347-355, 2019.
- ALGAN, A. H., GUNGOR-AK, A.; KARATAS, A. Nanoscale Delivery Systems of Lutein: An Updated Review from a Pharmaceutical Perspective. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 1852, p. 1-20, 2022.
- ÁLVAREZ-HENAO, M. V. *et al.* Microencapsulation of lutein by spray-drying: Characterization and stability analyses to promote its use as a functional ingredient. **Food Chemistry**. v. 256, p. 181-187, 2015.
- APARÍCIO-RUIZ, R. *et al.* Thermal degradation kinetics of lutein, b-carotene and b-cryptoxanthin in virgin olive oils. **Journal of Food Composition and Analysis** v. 24, n.6, p. 811-820, 2011.
- AZHAR, F. *et al.* Development of chitosan based β -carotene mucoadhesive formulation for skin cancer treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 253, n. 1, 126659, 2023.
- BALIĆ, A., MOKOS, M. Do We Utilize Our Knowledge of the Skin Protective Effects of Carotenoids Enough? **Antioxidants**, v. 8, n. 8, p. 1-19, 2019.
- BECERRA, M. O. *et al.* Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability. **Journal of Functional Foods**, v. 66, n. 103771, p.1-12, 2020.
- BERKER, K. I. *et al.* Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 1157–1165, 2007.
- BHATIA, S. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. *In*: BHATIA, S. **Natural Polymers Drug Delivery Systems**. 1. ed. Springer, p. 33-93, 2016.
- BODOKI, E. *et al.* Topical nanodelivery system of lutein for the prevention of selenite-induced cataract. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and medicine**, v. 15, ed.1, p.188-197, 2019.
- BOISMAL, F., *et al.* Vieillissement cutané - Physiopathologie et thérapies innovantes [Skin aging: Pathophysiology and innovative therapies]. **Médecine sciences**:

M/S, v.36, n.12, p.1163–1172, 2020.

BOLLA, P. K. *et al.* Lutein-Loaded, Biotin-Decorated Polymeric Nanoparticles Enhance Lutein Uptake in Retinal Cells. **Pharmaceutics**, v. 12, ed. 9, n. 798, 2020.

BOROSKI M.; VISENTANINER J.; COTTICA S.; MORAIS D. **Antioxidantes princípios e métodos analíticos**. 1 ed., Curitiba, Appris, 2015.

BOSE, R. J. *et al.* Biodegradable polymers for modern vaccine development. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 77, p. 12-24, 2019.

BRAND-WILLIAMS, W. *et al.* Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p.25-30, 1995.

LOPES, B.A., *et al.* Development and Characterization of Nanoemulsion Containing Volatile Oil of *Matricaria recutita* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 66,n. 101590, p. 1-12. 2023.

BRUM, A. A.S. *et al.* Lutein-loaded lipid-core nanocapsules: Physicochemical characterization and stability evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 522, p. 477-484, 2017.

CAMARGO, G. dos A. **Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação da eficiência de encapsulação de nanocápsulas poliméricas contendo tacrolimus**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa- PR. 2020.

CAMPOS, P. M. *et al.* Liquid crystalline nanodispersion functionalized with cell-penetrating peptides improves skin penetration and antiinflammatory effect of lipoic acid after in vivo skin exposure to UVB radiation. **Drug Deliv Transl Res**. v. 10, n. 6, p. 1810–28, 2020.

CARLETTO, B. **Avaliação antitumoral in vitro e in vivo de nanopartículas de PCL contendo resveratrol em modelo de melanoma murino**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa-PR, 2015.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. *et al.* Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. **Carbohydrate Polymers**. v. 85, n. 3, p. 522-528. 2011.

CARTER, P.; NARASIMHAN, B.; WANG, Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, p. 49-62, 2019.

CASTELO-BRANCO, V.N., TORRES, A.G. Total antioxidant capacity of edible vegetable oils: chemical determinants and associations with oil quality. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 24, n.1, p. 173-187, jan./fev., 2011.

CHENG, C. J., FERRUZZI, M., JONES, O. G. Fate of lutein-containing zein nanoparticles following simulated gastric and intestinal digestion. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 229-236, 2019.

CHITTASUPO, C., POSRITONG, P. & ARIYAWONG, P. Stability, Cytotoxicity, and Retinal Pigment Epithelial Cell Binding of Hyaluronic Acid-Coated PLGA Nanoparticles Encapsulating Lutein. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**. V. 20, n. 4, 2019.

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

CLOWUTIMON, W. *et al.* Development of mass transfer model for chromatographic separation of free lutein and fatty acids in de-esterified marigold lutein. **Food and Bioproducts Processing**, v. 110, p. 6-15, 2018.

DAI, X. *et al.* Decreased oxidative stress response and oxidant detoxification of skin during aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 216, n. 111878, p. 1-10. 2023.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 1-17, 2018.

DE ÁVILA, L., PRIMO, F. T. A utilização de antioxidantes orais na fotoproteção: revisão sistemática. **Vitalle – Revista de Ciências da Saúde**, v. 33, n. 2, p. 97-108, 2021.

DENG, S. *et al.* Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status. **Challenges and Opportunities. Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 1-36, 2020.

DIYANAT *et al.* Preparation and characterization of polycaprolactone nanocapsules containing pretilachlor as a herbicide nanocarrier. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 21579–21588, 2019.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, ed. 1-2, p. 675-691, 2017.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. *et al.* Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, v. 46, p. 438-450, 2012.

FERREIRA, L. M. *et al.* Diphenyl diselenide loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules with selective antimelanoma activity: Development and cytotoxic evaluation. **Materials Science & Engineering C**. v. 91, p. 1-9, 2018.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial Polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 55, p. R1-R4, 1989.

FLIEGER, J. *et al.* Skin Protection by Carotenoid Pigments. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 3, n. 1431, jan., 2024.

GHASEMI, M. *et al.* The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **Int. J. Mol. Sci**, v.22, n.12827, 2021.

GILABERTE, Y. *et al.* Anatomy and Function of the Skin. **Nanoscience In Dermatology**, [S.l.], p.1-14, 2016.

GIORDANO, E., QUADRO, L. Lutein, zeaxanthin and mammalian development: Metabolism, functions and implications for health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 647, p. 33-40, 2018.

GRANATA, G. *et al.* Essential oils encapsulated in polymerbased nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. **Food Chemistry**. v. 269, n. March, p. 286-292, 2018.

GRETHER-BECK, S. *et al.* Molecular evidence that oral supplementation with lycopene or lutein protects human skin against ultraviolet radiation: results from a double-blinded, placebo-controlled, crossover study. **The British journal of dermatology**. v. 176, n. 5, 2017.

GUNAWAN, M.; BOONKANOKWONG, V. Current applications of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as vehicles in oral delivery systems for antioxidant nutraceuticals: A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**.v. 233, n. 113608, 2024.

GULCIN, I. Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. **Archives of toxicology**, v.94,ed.3,p, 651–715.2020.

HARRISON, E. H., CURLEY, R. W. Carotenoids and retinoids: nomenclature, chemistry, and analysis. **Subcellular Biochemistry**, v. 81, p. 1-19, 2016.

HONG, Da Y. *et al.* Chitosan/poly-γ-glutamic acid nanoparticles improve the solubility of lutein. **International journal of biological macromolecules**, v. 85, p. 9-15, 2016.

HUERTA-MADRONAL, M. *et al.* Antiaging properties of antioxidant photoprotective polymeric nanoparticles loaded with coenzyme-Q10. **Biomaterials Advances**, v. 145, n. 213247, 2023.

JAISWAL, A. K. Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetable. **Academic Press**, 2020.

JANMOHAMMADI, M.; NOURBAKHSH, M. S. Electrospun polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: a review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, Filadélfia, v. 68, n. 9, p. 527-539, 2018.

JARAI, B. M. Polymeric Nanoparticles. **Nanoparticles for Biomedical Applications**, p. 308-324, 2020.

JIAO, Y. Lutein-loaded glycosylated zein nanoparticles-Preparation, characterization, and stability in functional drink. **Food Science and Technology**, v. 187, n. 115308, 2023.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAZMIERCZAK, E. **Perfil químico e avaliação da atividade antioxidante de extratos da polpa dos frutos de *Garcinia cochinchinensis***. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós- Graduação em Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa-PR, Brasil, 2022.

KOTAKE-NARA, E.; NAGAO, A. Absorption and metabolism of xanthophylls, **Marine drugs**, v. 9, n. 6, p.1024-1037, 2011.

LACATUSU, L. *et al.* Lipid nanoparticles based on omega-3 fatty acids as effective carriers for lutein delivery. Preparation and *in vitro* characterization studies. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1260-1269, 2013.

LEPHART, E. D. A review of the role of estrogen in dermal aging and facial attractiveness in women. **Journal Of Cosmetic Dermatology**. v. 17, n. 3, p. 282-288, 2018.

LIA, J. *et al.* Molecular complexes of drug combinations: A review of cocrystals, salts, coamorphous systems and amorphous solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**. v.648, n.123555, 2023.

LIA, W. *et al.* Self-assembly of green tea catechin derivatives in nanoparticles for oral lycopene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 248, p.117-124, 2017.

LICHTENBERG, D., PINCHUK, I. Oxidative Stress, the Term and the Concept. **Biochem. Biophys. Res. Commun** v. 461, n. 3, p. 441–444, 2015.

LIU, J. R., *et al.* Enhanced antioxidant bioactivity of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) products prepared using nanotechnology. **Phytomedicine**. v. 15, n. 1, p. 23-30, 2008.

LOPES, B.A., *et al.* Development and Characterization of Nanoemulsion Containing Volatile Oil of *Matricaria recutita* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 66,n. 101590, p. 1-12. 2023.

LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics Of North America**, v. 25, n. 3, p. 283-289, 2017.

MALEKI, A.; KARIMPOUR, A.; MALEKI DIZAJ, S. The role of mechanical engineering in the development of nano drug delivery systems; a review. **International Journal of Nano Dimension**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2018.

MARETTI, E. *et al.* In vivo β -carotene skin permeation modulated by Nanostructured

Lipid Carriers. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 597, n. 120322. 2021.

MCKNIGHT, G., XÁ, J., HARGEST, R. Physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**. v. 40, n. 1, p. 8-22, 2022.

MEDEIROS, I. *et al.* Safety and bioactive potential of nanoparticles containing Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.) carotenoids in an experimental model of chronic inflammation. **Biotechnology Reports**, v. 28, e00567, 2020.

MENNATI, A. *et al.* Synthesis of methoxy poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) diblock copolymers hybridized with DDAB cationic lipid as the efficient nanocarriers for in vitro delivery of lycopene into MCF-7 breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 66, n.02806, 2021.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STRØMME, M. Current Status and Future Prospects of Nanotechnology in Cosmetics, **Progress in Materials Science**, v. 57, p. 875- 910, 2012.

MITRA, S. *et al.* Potential health benefits of carotenoid lutein: An updated review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 154, n. 112328, p. 1-13, 2021.

MITRI, K. *et al.* Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. **Int J Pharm**, v. 414, n. 1-2, p. 267-275, 2011.

MORDORSKI, B.; LANDRISCINA, A.; FRIEDMAN, A. An Overview of Nanomaterials in Dermatology. **Nanoscience In Dermatology**, p. 31-46, 2016.

MOSMANN, T. *et al.* Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

NAGAVARMA, B. V. N. *et al.* Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles – a review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, p. 16-23 2012.

National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 5281243, **Lutein**. Acessado em 4 de abril de 2024. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lutein> >.

NIKHAT, A. *et al.* Enhanced transdermal delivery of lutein via nanoethosomal gel: Formulation optimization, in-vitro evaluation, and in-vivo assessment. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 73, n. 103447, 2022.

OKONOGI, S., RIANGJANAPATEE, P. Physicochemical characterization of lycopene-loaded nanostructured lipid carrier formulations for topical administration. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 478, ed.2, p.726-735, 2015.

OZTURK, K. *et al.* The influence of technological parameters on the physicochemical Properties of blank PLGA nanoparticles. **Pharmazie**, v. 65, p. 665-669, 2010.

PEREIRA, R. F. *et al.* Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. **Nanomedicine**, v. 8, n. 4, p. 60-621, 2013.

PISOSCHI, A. M., POP, A. The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review. **Eur. J. Med. Chem** v. 97, p. 55–74, 2015.

PROW, T. W. *et al.* Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 470-491, 2011.

QUAN, T. Molecular insights of human skin epidermal and dermal aging. **Journal of Dermatological Science**, v. 112, p. 48-53, 2023.

QUAN, T.; FISHER, G. J. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. **Gerontology**, v. 61, p. 427-434, 2015.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C. A. *et al.* Why Do We Expect Carotenoids to be Antioxidants *in vivo*? **Free Radical Research**, v. 26, n. 4, p. 381-398, 1997. DOI: 10.3109/10715769709097818

RIEKES, M.K. *et al.* Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering**, v. 31, p. 962-968, 2011.

ROBERTS, R. L.; GREEN, J.; LEWIS, B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 195-201, 2009.

RORTEAU, J. *et al.* Vieillesse et intégrité de la peau - De la biologie cutanée aux stratégies anti-âge [Functional integrity of aging skin, from cutaneous biology to anti-aging strategies]. **Médecine sciences: M/S**, v. 36, n. 12, p. 1155-1162, 2020.

SAHU, T. *et al.* Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical Science. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, n.102487, p. 1-15, 2021.

SALATIN, S. *et al.* Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2017.

SANTOS, J.S. **Nanopartículas**: Aplicações cosméticas e farmacêuticas. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

SCHAICH, K. *et al.* Hurdles and Pitfalls in Measuring Antioxidant Efficacy: A Critical Evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC Assays. **J. Funct**, v. 14, p. 111–125, 2015.

SCHAFFAZICK, S. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 296-302, 2006.

SCHWAB, P. M. **Efeito de membranas de carboximetilcelulose contendo nanocápsulas com ácido ferúlico na cicatrização de feridas em ratos diabéticos**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa-PR, Brasil, 2019.

SHANMUGAPRIYA, K. Astaxanthin-alpha tocopherol nanoemulsion formulation by emulsification methods: Investigation on anticancer, wound healing, and antibacterial effects. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, p. 170-179, 2018.

SHAHIDI, F., ZHONG, Y., Measurement of Antioxidant Activity. **J. Funct. Foods** 18:757–781, 2015.

SHARMA, A., KUHAD, A., BHANDARI, R. Novel nanotechnological approaches for treatment of skin-aging. **Journal of Tissue Viability**, v. 31, p. 374-386, 2022.

SHU, X. *et al.* Nanostructured lipid carriers (NLCs) stabilized by natural or synthetic emulsifiers for lutein delivery: Improved physicochemical stability, antioxidant activity, and bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 403, n. 134465, p. 1-12, 2023.

SHUTTERSTOCK.COM. Disponível em https://www.shutterstock.com/pt/image-vector/three-main-layer-human-skin-illustration-1141301618?utm_campaign=image&utm_medium=googleimages&utm_source=ipctc. Acesso em: 13, junho de 2024.

SILVA, J.T.do P. *et al.* Nanoencapsulation of lutein and its effect on mice's declarative memory. **Materials Science and Engineering C**, v. 76, p. 1005-1011. 2017.

SOLOMONS, T. W. G. & FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v. 1 e 2, 9 ed. LTC, 2009.

SOWMYA, B., HEMAVATHI, A. B.; PANDA, P. K. Poly (ϵ -caprolactone)-based electrospun nano-featured substrate for tissue engineering applications: a review. **Progress in biomaterials**, v. 10, n. 2, p. 91-117, 2021.

TALEB, S. A. A. *et al.* Promising synthesized bis (arylmethylidene) acetone - polymeric PCL emulsified nanoparticles with enhanced antimicrobial/antioxidant efficacy: *in-vitro* and *in-vivo* evaluation. **Open Nano**, v.11, n.100139, 2023.

TAN, C. Biopolymer-coated liposomes by electrostatic adsorption of chitosan (chitosomes) as novel delivery systems for carotenoids. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 774-784, 2016.

TONČIĆ, R. J. *et al.* Skin barrier and dry skin in the mature patient. **Clinics In Dermatology**, v. 36, n. 2, p. 109-115, 2018.

UNITED NATIONS. ONU quer mais apoio para população em envelhecimento. **World Population Ageing**, 12 de janeiro de 2023. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2023/01/1807992>. Acesso em: 08 fev. 2024.

VÊNUS, M., WATERMAN, J., MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**, v. 29, v. 10, p. 471-474, 2011.

VIANA, C.E. **Nanocápsulas carregadas de luteína revertem comportamento semelhante ao transtorno do espectro autista e protegem contra danos neurofisiológicos e hepatotóxicos induzido por ácido valpróico em ratas fêmeas**. Tese (Doutorado em Bioquímica), Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana-RS, Brasil, 2022.

VOCI, S. *et al.* Ascorbic acid-loaded gliadin nanoparticles as a novel nutraceutical formulation. **Food Research International**. v. 161, n.111869, p. 1-112, 2022.

WALLACE, T. C. *et al.* Dietary bioactives: establishing a scientific framework for recommended intakes. **Advances in nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 6, n.1, p. 1-4, 2015.

WANG, R. *et al.* Stability and bioactivity of carotenoids from *Synechococcus* sp. PCC 7002 in Zein/NaCas/Gum Arabic composite nanoparticles fabricated by pH adjustment and heat treatment antisolvent precipitation. **Food Hydrocolloids**, v. 117, n. 106663, 2021.

YAN, X.Y. *et al.* An overview of biodegradable nanomaterials and applications in vaccines. **Vaccine**, v. 38, n. 5, p. 1096-1104, 2020.

YINGNGAM, B. *et al.* Optimization of menthol-loaded nanocapsules for skin application using the response surface methodology. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, n. 101138, 2019.

ZAID, N. A. M, *et al.* Promising Natural Products in New Drug Design, Development, and Therapy for Skin Disorders: An Overview of Scientific Evidence and Understanding Their Mechanism of Action. **Drug design, development and therapy**, v. 16, p. 23-66, 2022.

ZANETTI, M. *et al.* Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. **Materials Science and Engineering**, v. 97, p.198–207, 2019.

Zhang, C. *et al.* Fresh, mechanical and microstructural properties of alkali-activated composites incorporating nanomaterials: A comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**. v. 384, n. 135390, 2023.

ZIELIŃSKA, A. *et al.* Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. **Molecules**, v. 25, n. 16, n. 3731, 2020.

APÊNDICE – RESUMOS APRESENTADOS DURANTE O MESTRADO

LUTEIN POLYMERIC NANOCAPSULES FOR SKIN: DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION

Thais Franceni de Oliveira^{1*}, Brenda Alves Lopes¹, Marcela Novak Gumy¹, Patrícia Mazureki Campos¹, Paulo Vitor Farago¹ and Patrícia Mathias Döll-Boscardin¹

1 – Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brazil.

thaisfranceni@gmail.com

Keywords: Nanotechnology, antioxidant, anti-aging, carotenoid.

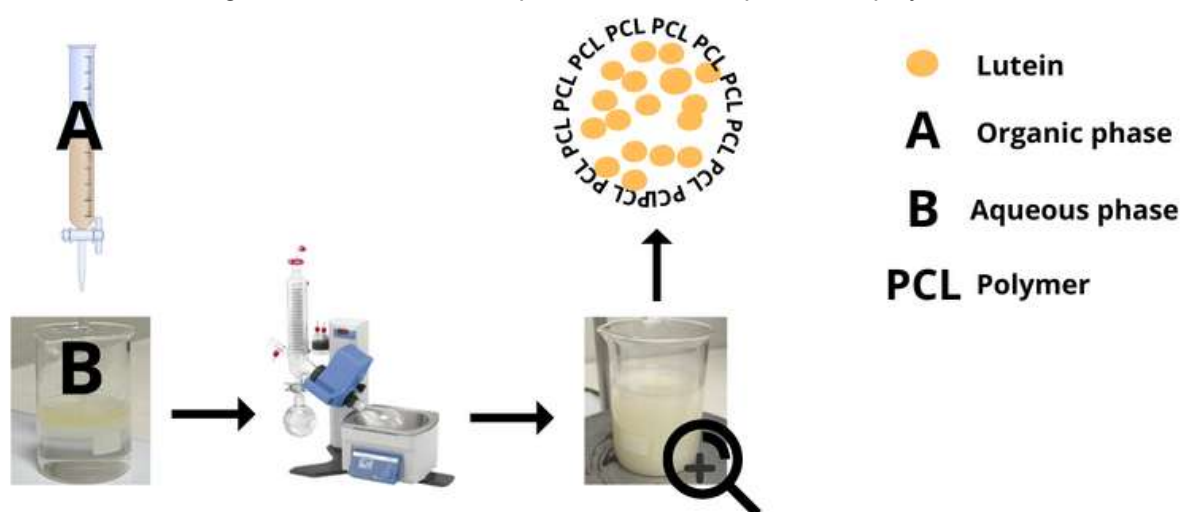
INTRODUCTION

Lutein is a natural carotenoid with strong antioxidant activity and potential use in anti-aging products. However, lutein has low water solubility which limits its biodisponibility. Developing nanotechnological delivery systems with lutein can be an interesting approach to optimize its characteristics, favor its distribution and dermic retention. Most studies involving lutein and nanomaterials are primarily focused on oral administration. Consequently, there is a limited body of research on nanodelivery systems for topical application of lutein to the skin. Therefore, its study aims to develop and characterize polymeric nanocapsules with lutein.

METHODS

The polymeric nanocapsules were obtained by the interfacial deposition method of preformed polymer (Figure 1).

Figure 1. The interfacial deposition method of preformed polymer



Font: The author.

The organic phase was composed of lutein, polycaprolactone (PCL), Span[®] 80, caprylic acid and acetone, while the aqueous phase was composed of Tween[®] 80 and water. The organic phase was dripped (1 drop/s) on the aqueous phase under magnetic stirring and heating (40 °C) kept on stirring for 40 min. Acetone was separated with a rotary evaporator until the final volume of 10mL.

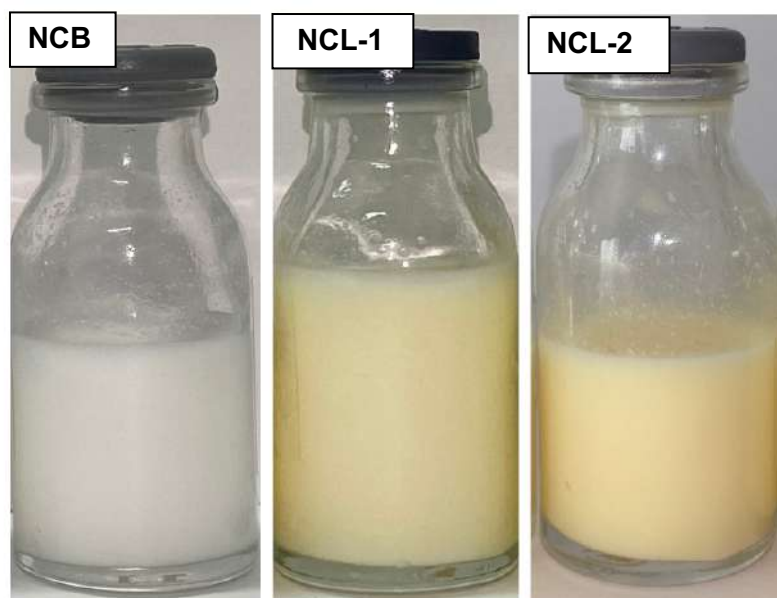
The nanocapsules were characterized by organoleptic, physicochemical and morphological aspects.

RESULTS

The results for the lutein polymeric nanocapsules show ideal characteristics, with nanometric size of 277.40 ± 7.00 nm to 296.33 ± 26.29 nm, polydispersity index with 0.214 ± 0.061 to 0.229 ± 0.038 , and good electrostatic stability of -19.16 ± 8.14 mV to -37.4 ± 3.88 and pH of 5.02 ± 0.023 to 5.97 ± 0.041 . Macroscopically, the formulations had a milky-yellow appearance and the control formulations had milky-white one. All formulations exhibited no phase separation or crystallization (Figure 2).

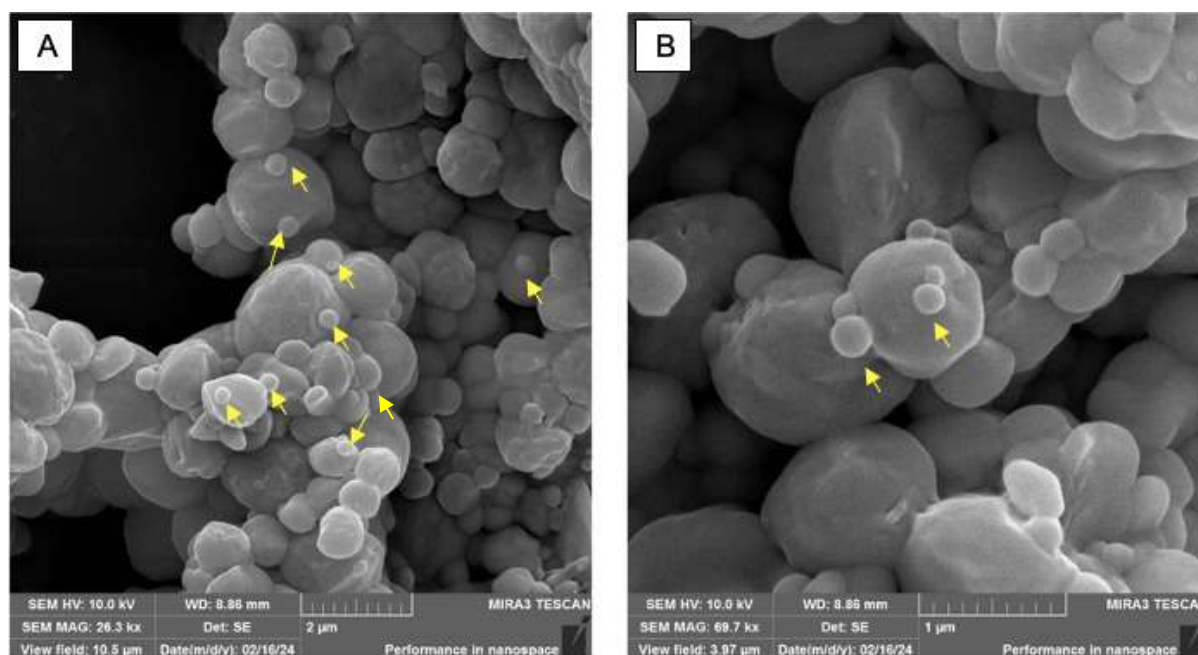
Field Emission Gun – Scanning Electron Microscope (FEG-SEM) showed nanocapsules with well-defined spheric shapes and smooth surfaces. No lutein crystals were observed on the nanocapsules' external surface, indicating its encapsulation (Figure 3).

Figure 2. Macroscopic aspects of the nanoformulations: NCB, NCL-1, NCL-2.



Font: The author.

Figure 3. Morphological analysis of lutein-containing nanoparticles by FEG-SEM under an acceleration voltage of 10 kV. Magnification of 26,300x (A); Magnification of 69,700x (B).



Font: The author.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Most studies related to nanoscale delivery systems of lutein utilize the synthetic polymer poly D,L-lactic-co-glycolic acid (PLGA) or chitosan, a natural polymer. Our investigation demonstrates the development of stable lutein-loaded nanocapsules using polycaprolactone (PCL) for topical application on the skin. This study successfully obtained lutein polymeric nanocapsules exhibiting favorable characteristics for this type of system, including well-defined spherical shapes, nanometric size, excellent electrostatic stability, and a pH like that of the skin. Therefore the lutein polymeric nanocapsules with PCL can be a good potential for topical application and future use on dermocosmetic products.