

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UEPG/UNICENTRO

AMANDA JANSEN

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO ASSOCIADA À LUTEOLINA

PONTA GROSSA

2024

AMANDA JANSEN

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO ASSOCIADA À LUTEOLINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme dos Anjos
Camargo

PONTA GROSSA

2024

J35 Jansen, Amanda
Desenvolvimento, caracterização e quantificação de nanopartículas de hidroxiapatita de cálcio associada à luteolina / Amanda Jansen. Ponta Grossa, 2024.
67 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme dos Anjos Camargo.

1. Antioxidante. 2. Bioestimulador dérmico. 3. Colágeno. 4. Flavona. 5. Rejuvenescimento. I. Farago, Paulo Vitor. II. Camargo, Guilherme dos Anjos. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321

	PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa	
---	---	---

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO **09/2024** DA MESTRANDA **AMANDA JANSEN**, REALIZADA NO DIA 28 DE NOVEMBRO DE 2024, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

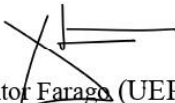
Aos vinte e oito dias do mês de novembro de dois mil e vinte e quatro, às 14h, no Auditório de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Sala 115, Bloco M, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, sob a presidência do Professor Doutor Paulo Vitor Farago, reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda **AMANDA JANSEN**, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelo Professor Doutor Paulo Vitor Farago (UEPG/PR), demais Doutores: (membros titulares): Daniela Florencio Maluf (UFPR/PR) e Patrícia Mathias Döll Boscardin (UEPG/PR); (membro suplente): Priscileila Colerato Ferrari (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de dissertação de mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: “**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO ASSOCIADA À LUTEOLINA**”. Encerrado o exame de defesa procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata aprovada. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim, Paulo Maury Redkva, Secretário Setorial dos Programas de Pós-Graduação na Área da Saúde.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: SIM ☐ NÃO ☒

Novo título: _____

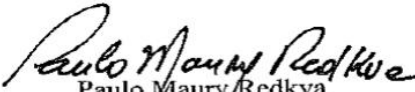

 Paulo Vitor Farago (UEPG/PR)
 Presidente

 Documento assinado digitalmente
 DANIELA FLORENCIO MALUF
 Data: 06/12/2024 11:11:19-0300
 Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

 Documento assinado digitalmente
 PATRICIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN
 Data: 06/12/2024 18:19:56-0300
 Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Daniela Florencio Maluf (UFPR/PR)
Titular

Patrícia Mathias Döll Boscardin (UEPG/PR)
Titular


 Paulo Maury Redkva
 Secretário Setorial

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
 Fone (42) 2102-8937 Email – ppgcf@uepg.br
 Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M
 Ponta Grossa – Paraná – Brasil

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Paulo Vitor Farago, pela oportunidade concedida, paciência, dedicação e conhecimento que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também pela oportunidade concedida e orientação ao longo de toda a elaboração desta dissertação.

Ao meu co-orientador, Dr. Guilherme dos Anjos Camargo, agradeço igualmente por todo suporte que contribuiu de forma decisiva para o sucesso desse projeto. Sua participação foi crucial para aprimorar o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Laboratório Multiusuários, PROPESP e Setor de Ciências Biológicas e da Saúde - SEBISA.

RESUMO

O envelhecimento resulta no acúmulo de danos moleculares e celulares ao longo do tempo. Garantindo a prevenção e desacelerando o processo de envelhecimento, empregamos o mecanismo de ação de neocolagênese utilizando os bioestimuladores de colágeno, como a hidroxiapatita (HAp), um fosfato de cálcio que desencadeia um processo inflamatório controlado que estimula o fibroblasto a produzir colágeno. Outra possibilidade é utilizar os antioxidantes (AO) para inibir as reações causadas pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres, como a luteolina (LUT), uma flavona da classe dos flavonoides, que tem sua atividade atribuída aos radicais fenólicos de sua estrutura química. A partir disso, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver, caracterizar e quantificar as nanopartículas de HAp associada à LUT para potencial uso como bioestimulador dérmico. A síntese de nanopartículas de HAp (n-HAp) foi realizada pelo método de precipitação. Foi utilizado a n-HAp para obtenção dos compósitos, adicionado a LUT e álcool etílico 99,5% em SpeedMixer® e secagem em estufa seca a 35°C por 48h. Foi desenvolvido e validado um método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação da eficiência de incorporação dos compósitos. A caracterização dos compósitos HAp-LUT foi realizada análise morfológica e de superfície avaliando o diâmetro médio, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta por espectroscopia de correlação de fótons, microscopia eletrônica de varredura (MEV-EC), e por difração de raios X (DRX), espectroscópica via espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (IVTF) e térmica por termogravimetria (TGA). Os compósitos foram sintetizados com sucesso pelo método proposto. O método analítico desenvolvido foi validado de forma adequada, e a avaliação de eficiência de incorporação mostrou eficiência de incorporação 81,50 e 95,46% para os compósitos de HAp-LUT. As análises físico químicas apresentaram diâmetro médio de 263,4 a 846,5 nm, IPD de 0,613 a 0,884, e potencial zeta de -31,5 a -5,18 mV, indicando que os compósitos são de distribuição heterogênea e com baixa estabilidade elétrica, acarretando na formação de aglomerados de nanopartículas de tamanho micrométrico. A análise morfológica e de superfície apresentou os compósitos com formato irregular e rugosidades, e estruturas alongadas de superfície lisa. A análise DRX mostrou redução nos picos de cristalinidade com consequente amorfização do fármaco. A análise estrutural por IVTF confirmou que não houve reação química entre LUT e HAp, indicando que a HAp pode servir como carreador de LUT sem interferir em sua liberação. E o TGA apresentou melhora da estabilidade térmica dos compósitos. Assim, conclui-se que o compósito HAp-LUT foi desenvolvido com sucesso e apresentou características físico-químicas adequadas para utilização como potencial bioestimulador de colágeno e ainda faz-se necessários teste posteriores de estabilidade e citotoxicidade para garantir sua segurança e eficácia.

Palavras chave: antioxidante, bioestimulador dérmico, colágeno, flavona, rejuvenescimento.

ABSTRACT

Aging results in the accumulation of molecular and cellular damage over time. To prevent and to retard the aging process, we use neocollagenesis mechanisms using collagen biostimulators, like hydroxyapatite (HAp), which is a calcium phosphate that triggers a controlled inflammatory response leading to the stimulation of fibroblasts to produce collagen. Another possibility is to use antioxidants (AO) to inhibit the reactions caused by reactive oxygen species (ROS) and free radicals, such as luteolin (LUT), a flavone from the flavonoid class, whose activity is attributed to the phenolic radicals in its chemical structure. The aim of this study was to develop, characterize and quantify calcium hydroxyapatite nanoparticles associated with LUT for potential use as a dermal biostimulator. HAp nanoparticles (n-HAp) were synthesized using the precipitation method. The n-HAp was used to obtain the composites, adding LUT and 99.5% ethyl alcohol in a SpeedMixer® and dried in a dry oven at 35°C for 48 hours. An analytical method in high performance liquid chromatography (HPLC) was developed and validated to quantify the incorporation efficiency of composites. The characterization of HAp-LUT composites, morphological and surface analysis was carried out, evaluating the average diameter, polydispersity index (IPD) and zeta potential by photon correlation spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM-FEG), X-ray diffraction (XRD), spectroscopy via Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermal spectroscopy via thermogravimetry (TGA). The composites were successfully synthesized using the proposed method. The analytical method developed was adequately validated, and the incorporation efficiency evaluation showed an incorporation efficiency of 81.50 and 95.46% for the HAp-LUT composites. The physical-chemical analyses showed an average diameter of 263.4 to 846.5 nm, IPD of 0.613 to 0.884, and zeta potential of -31.5 to -5.18 mV, indicating that the composites are heterogeneously distributed and have low electrical stability, resulting in the formation of agglomerates of micrometer-sized nanoparticles. Morphological and surface analysis showed the composites to have an irregular shape and roughness, and elongated structures with a smooth surface. XRD analysis showed a reduction in crystallinity peaks with consequent amorphization of the drug. Structural analysis by IVTF confirmed that there was no chemical reaction between LUT and HAp, indicating that HAp can serve as a carrier for LUT without interfering with its release. TGA showed an improvement in the thermal stability of the composites. Thus, it is concluded that the HAp-LUT composite was successfully developed and presented suitable physicochemical characteristics for use as a potential collagen biostimulator. Further stability and cytotoxicity tests are still needed to guarantee its safety and efficacy.

Key words: anti-aging, antioxidant, collagen, dermal biostimulator, flavone.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS.....	11
2.1	OBJETIVO GERAL.....	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1	FISIOLOGIA DA PELE.....	12
3.1.1	Fibroblasto.....	15
3.1.2	Colágeno.....	16
3.2	FISIOPATOLOGIA DO ENVELHECIMENTO.....	17
3.3	BIOESTIMULADOR DE COLÁGENO.....	20
3.3.1	Hidroxiapatita de cálcio.....	21
3.4	NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO.....	24
3.5	ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA LUTEOLINA (LUT).....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
4.2	REAGENTES E SOLVENTES.....	30
4.3	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO E OBTENÇÃO DOS COMPÓSITOS HAP-LUT.....	31
4.3.1	Liofilização.....	31
4.3.2	Teor de umidade.....	31
4.3.3	Formação dos compósitos HAp-LUT.....	32
4.4	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE HAp CONTENDO LUT.....	32
4.4.1	Seletividade.....	33
4.4.2	Linearidade.....	33
4.4.3	Homocedasticidade.....	33
4.4.4	Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD).....	33
4.4.5	Precisão.....	34

4.4.6	Exatidão.....	34
4.4.7	Robustez.....	35
4.4.8	Estabilidade.....	35
4.4.9	Eficiência de incorporação.....	35
4.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DOS COMPÓSITOS HAP-LUT.....	36
4.5.1	Mistura Física.....	36
4.5.2	Determinação do pH.....	36
4.5.3	Análises morfológicas e de superfície.....	36
4.5.3.1	<i>Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta.....</i>	<i>36</i>
4.5.3.2	<i>Análise por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-EC).....</i>	<i>37</i>
4.5.3.3	<i>Análise por difração de pó de raios X (DRX).....</i>	<i>37</i>
4.5.4	Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (IVTF).....	37
4.6	ANÁLISE TÉRMICA.....	38
4.6.1	Termogravimetria (TGA).....	38
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO E OBTENÇÃO DOS COMPÓSITOS HAP-LUT.....	39
5.1.1	Teor de umidade.....	40
5.1.2	Formação dos compósitos HAp e LUT.....	40
5.2	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE HAP CONTENDO LUT.....	40
5.2.1	Seletividade.....	41
5.2.2	Linearidade.....	42
5.2.3	Homocedasticidade.....	43
5.2.4	Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD).....	44
5.2.5	Precisão.....	45
5.2.6	Exatidão.....	45

5.2.7	Robustez.....	46
5.2.8	Estabilidade.....	46
5.2.9	Eficiência de incorporação.....	47
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DOS COMPÓSITOS HAP-LUT.....	47
5.3.1	Determinação do pH.....	47
5.3.2	Análises morfológicas e de superfície.....	48
<i>5.3.2.1</i>	<i>Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta.....</i>	<i>48</i>
<i>5.3.2.2</i>	<i>Análise por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-EC).....</i>	<i>49</i>
<i>5.3.2.3</i>	<i>Análise por difração de pó de raios X (DRX).....</i>	<i>51</i>
5.3.3	Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (IVTF).....	52
5.4	ANÁLISE TÉRMICA.....	54
5.4.1	Termogravimetria (TGA).....	54
6	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Segundo a organização mundial de saúde (2022), o envelhecimento a nível fisiológico resulta no acúmulo de danos moleculares e celulares ao longo do tempo. A pele é um dos maiores indicadores da idade de cada indivíduo e os fatores que determinam esse envelhecimento podem ser intrínsecos ou extrínsecos, e levam a uma perda de função fisiológica.

Os fatores intrínsecos são determinados pela genética, hormônios e estresse oxidativo, no qual há redução da síntese de colágeno e outros componentes da matriz extracelular, diminuindo densidade e espessura da pele, o que leva à flacidez, e perda de resistência e hidratação. Os extrínsecos estão relacionados às agressões externas, como exposição solar e radiação UV, poluição, hábitos de vida e saúde geral (Zerbinati, *et al.*, 2023; Ferreira, *et al.*, 2020; Neca, *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo se caracteriza pelo desequilíbrio de antioxidantes e oxidantes, em favor de compostos pró oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são moléculas instáveis e reativas, com par de elétrons desemparelhados, formando assim os radicais livres (RL). Ambos envolvidos no processo de envelhecimento e diversas doenças inflamatórias, pois danificam estruturas celulares como membrana e DNA (Warraich, Hussain, Kayani, 2020; Tsuchida, Kobayashi, 2020; Zargaran, *et al.*, 2022)

Garantindo a prevenção e desacelerando o processo de envelhecimento, empregamos o mecanismo de ação de neocolagênese utilizando produtos como os bioestimuladores de colágeno, que iniciam uma reação inflamatória em um local determinado. Uma vez induzida essa inflamação, será estimulada a produção de colágeno por meio dos fibroblastos (Bonin, 2019; Neca, *et al.*, 2022).

Como bioestimulador de colágeno temos a hidroxiapatita (HAp), que é um fosfato de cálcio, sendo um produto sintético, composto de um mineral presente em ossos e dentes. Inicialmente desenvolvido para o uso odontológico e médico, como revestimento de prótese ortopédica, implantes e reparos de tecidos ósseos. Após sua aprovação, foi observado a sua capacidade de estímulo de colágeno em pacientes com perda de óssea facial, sendo então aprovado em 2006 pelo *food and drug administration* (FDA) seu uso estético como correção de rugas moderadas a severas, e restauração de volume de face e outras áreas como dorso das mãos (Hartatiek, *et al.*, 2023; Liu, Tsai, Chen, 2020).

Outra possibilidade é utilizar os antioxidantes (AO) para inibir as reações causadas pelos EROs e RL, prevenindo e/ou retardando o dano celular, que pode ser endógeno ou exógeno. Os AO endógenos são presentes no corpo, e os exógenos são adquiridos a partir de compostos dietéticos minerais, e vitaminas, como C e E (Warraich, Hussain, Kayani, 2020; Zargaran, *et al.*, 2022).

Com ação AO temos diversas substâncias como beta-caroteno, ácido ascórbico, metais quelantes, flavonoides, entre outros. Os flavonoides são espécies não nutritivas presentes nas plantas, frutas, entre outros alimentos do reino vegetal, e tem sua atividade atribuída aos radicais fenólicos de sua estrutura química. Além de antioxidante, eles têm atividade anti-inflamatória e na prevenção de doenças crônicas (Santos, 2021; Zargaran, *et al.*, 2022; Theoharides, 2021).

A luteolina (LUT) é uma flavona, da classe dos flavonoides, e exibe atividade anti-inflamatória a partir da modulação do estresse oxidativo. Ela possui potencial sequestrante de RL em modelos celulares e efeito neuroprotetor, e tem sido amplamente usada no Brasil e China (Gendrisch, *et al.*, 2020; Rocchetti, *et al.*, 2023; Huang, *et al.*, 2023).

Entretanto, há uma limitação da ação e duração da HAp, sendo viável levantar a hipótese de melhorar sua forma de liberação e aumento de superfície de contato para que traga melhores resultados e satisfação, e potencializar seu efeito antienvhecimento com a associação de um ativo antioxidante em um mesmo produto, atendendo com melhor precisão as problemáticas do envelhecimento.

Sendo assim, após realização de revisão de literatura em periódicos da área, foi possível verificar que a quantidade de estudos sobre HAp com associações voltadas a estética é reduzida, sendo os existentes voltados para a área médica ou odontológica. Foram encontrados sistemas comerciais contendo 30% de microesferas de 25 a 45 μm em 70% de veículo de carboximetilcelulose de sódio em literatura, porém não relata estudos associados à LUT, o que pode congrega as vantagens de ambos os componentes da derme.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e quantificar nanopartículas de hidroxiapatita de cálcio associadas à luteolina para potencial uso como bioestimulador dérmico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e quantificar as nanopartículas de hidroxiapatita de cálcio associada à luteolina para potencial uso como bioestimulador dérmico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

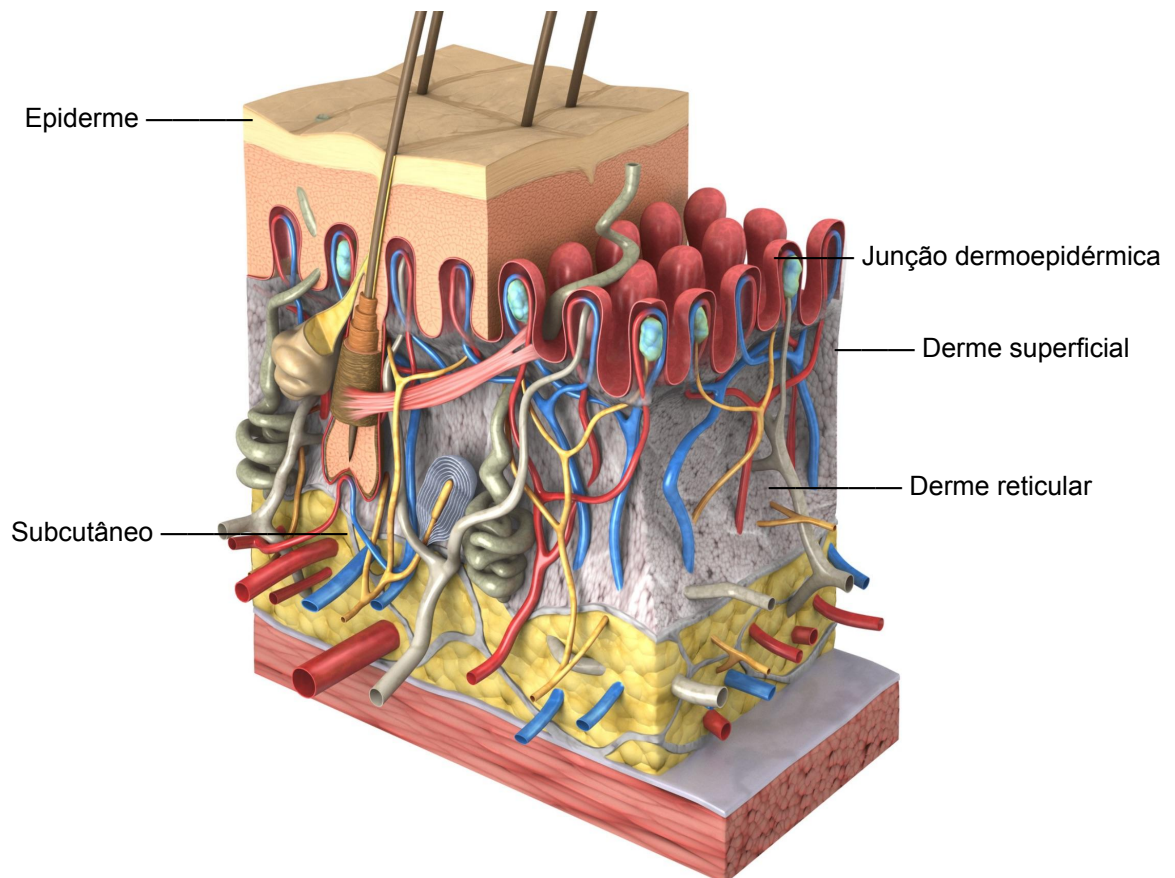
- Sintetizar as nanopartículas de hidroxiapatita de cálcio e incorporar a luteolina;
- Desenvolver e validar uma metodologia em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Proceder a determinação quantitativa de luteolina incorporada nas nanopartículas pelo método validado de HPLC;
- Efetuar a caracterização das nanopartículas de hidroxiapatita de cálcio por meio de análises morfológicas, espectroscópicas e térmica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FISIOLOGIA DA PELE

A pele é um órgão composto por um agregado de tecidos que funcionam em conjunto. Tem ação como revestimento e defesa, agindo como barreira contra agressões físicas e químicas, radiação ultravioleta, infecções e demais riscos, além de termorregulação e equilíbrio de fluídos e eletrólitos, e ainda possui receptores nervosos que identificam sensações como pressão do toque e dor. Em seu estado ideal possui potencial hidrogeniônico (pH) entre 4 e 6,8, enquanto o pH sanguíneo está entre 7,35 e 7,45. Estruturalmente ela é dividida em três camadas (Figura 1): epiderme, derme e tecido subcutâneo (Quan, 2023a; Szalay, Wertz, 2023; Zargarán, *et al.*, 2022; Marucci, *et al.*, 2022; Hashim, 2024; Busanello-Costa, *et al.*, 2020).

Figura 1. Estrutura geral da pele, onde podemos visualizar mais externo a epiderme, a junção dermoepidérmica, a derme, e a hipoderme.



Fonte: BASF, 2015.

A epiderme é avascular e composta principalmente por queratinócitos, que sintetizam a queratina e sofrem processo de diferenciação de acordo com a camada que se encontra, sendo essas divididas em 4 camadas distintas, onde a mais externa é o estrato córneo, e a mais profunda o estrato basal (Quan, 2023a; Tricarico, *et al.*, 2022; Zargaran, *et al.*, 2022; Busanello-Costa, *et al.*, 2020; Harris, 2016).

O estrato córneo é uma camada epidérmica com dez a quinze camadas de queratinócitos anucleados, chamados corneócitos, originando um epitélio estratificado e escamoso que se liga por meio de lipídios epidérmicos, formando uma camada de proteção e evitando a perda de água transepidérmica (TEWL) da pele devido aos fatores hidratantes naturais (FHN) e lipídios epidérmicos (Zargaran, *et al.*, 2022; Tricarico, *et al.*, 2022; Quan, 2023a; Busanello-Costa, *et al.*, 2020).

Já o estrato basal é a única camada capaz de divisão celular, responsável pela formação e manutenção da junção dermoepidérmica, e renovação da epiderme que ocorre em média de 15 a 30 dias, podendo variar de acordo com idade, região do corpo e outros fatores metabólicos (Azulay, 2021; Busanello-Costa, *et al.*, 2020).

Além dos queratinócitos estão presentes outras células especializadas como os melanócitos, as células apresentadoras de antígenos e as células de Merkel. Os melanócitos sintetizam a melanina, que é armazenada e secretada pelos melanossomos, sendo a melanina a proteína que dá pigmento e protege a pele dos raios ultravioletas e radicais livres. As células apresentadoras de antígenos são responsáveis pela proteção imunológica, e as células de Merkel, junto às terminações nervosas, são responsáveis pela sensação de toque e superfície (Szalay, Wertz 2023; Azulay, 2021; Brown, *et al.*, 2023; Busanello-Costa, *et al.*, 2020).

A epiderme e derme se unem através de uma membrana cuja estrutura garante à pele parte de suas propriedades mecânicas, assim como a nutrição da epiderme transferindo por capilaridade os nutrientes da derme. Essa junção se chama junção dermoepidérmica ou zona da membrana basal, possuindo até 200 nm de espessura subsequente a epiderme, onde a epiderme penetra por meio das cristas epidérmicas, ou cones interpapilares, e a derme se projeta a partir de papilas dérmicas (Harris, 2016; Azulay, 2021).

Em contraste, a derme é um tecido conjuntivo denso não modelado e vascularizado que possui inervação, além de estruturas fibrosas, filamentosas e

amorfas, onde são acomodados anexos cutâneos, como unidades pilossebáceas e glândulas sudoríparas, e componentes do sistema imunológico (Kierszenbaum, 2021; Azulay, 2021; Quan, 2023a; *et al.*, 2022).

Como componente do sistema imunológico temos os macrófagos, derivados dos monócitos da medula óssea que possuem capacidade de fagocitose, possuindo lisossomos para a quebra do material fagocitado, e numerosas vesículas fagocíticas, ou fagossomos, para armazenamento do material fagocitado. Além de apresentação de antígenos para os linfócitos e secretar citocinas como IL-1 e TNF, também auxiliam na renovação de fibras senescentes e do material da membrana extracelular (Azulay, 2021; Kierszenbaum, 2021).

Tanto epiderme quanto na derme há a atividade dos AO endógenos enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), e não enzimáticos, como glutathione (GSH), ubiquinol 10 (cQ10) e ácido úrico. Onde na epiderme a ação dos AO consiste na manutenção dos queratinócitos para manter função barreira da pele, e na derme foca em regeneração do tecido e estímulo de fibroblasto, estimando-se que a concentração na epiderme seja até 90% maior que na derme (Shindo, *et al.*, 1994).

A derme pode ser dividida em superficial ou papilar, com finos feixes de fibras elásticas, compostas de elastina, dispostos verticalmente, onde sua função é fixar a membrana basal à rede de fibras elásticas da derme; profunda ou reticular, composta por feixes de colágeno principalmente tipo I, dispostos horizontalmente, onde é abrigado os anexos cutâneos (Harris, 2016; Azulay, 2021).

Entre o colágeno dérmico e as fibras tecido elásticas está a substância fundamental amorfa composta de glicosaminoglicanas (GAGs) e proteoglicanos, que contribuem com 0,1 a 0,3% do peso seco total da derme e desempenham papel vital na manutenção da hidratação, devido à capacidade de ligação à água do ácido hialurônico, sendo a água cerca de 60% do peso total da derme (Harris, 2016; McGrath, Uitto, 2024).

A derme então se trata de uma camada irregular, densa, fibrosa e elástica, caracterizada pela presença de fibroblastos que produzem e enviam para o meio extracelular as proteínas da matriz extracelular (MEC), como colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, e algumas proteases. Essas proteínas proporcionam resistência, elasticidade e estrutura à pele (Kierszenbaum, 2021; Harris, 2016).

3.1.1 Fibroblasto

Os fibroblastos são células fusiformes e estreladas, com núcleo volumoso e citoplasma claro, que constituem o maior número de células do tecido conjuntivo, sendo responsáveis pela síntese e degradação dos componentes desse tecido. Eles raramente se dividem em pessoas adultas, exceto quando o organismo requer fibroblastos adicionais, possuindo importante papel na cicatrização e manutenção da integridade do tecido conjuntivo. Presente na derme, sua função é sintetizar e secretar proteínas e proteases da matriz e enviar para o meio extracelular, como a molécula precursora de elementos da MEC, como colágeno e elastina (Azulay, 2021; Aghakhani, Zerrouk, Niarakis, 2021; Kierszenbaum, 2021; Ferreira, *et al.*, 2022; Junqueira, Carneiro, 2023).

Os fibroblastos também produzem fatores de crescimento como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento fibroblástico (FGF), inibidores de metaloproteinases (MMPs) que degradam a MEC, como os TIMPs, e fator de crescimento dos queratinócitos (KFG), com ação na reepitelização (Azulay, 2021).

Na epitelização e cicatrização de feridas, por exemplo, as células epiteliais localizadas na pele começam a proliferar para restabelecer a barreira protetora contra perda de fluídos e infecções. Os fatores de crescimento produzidos por plaquetas e macrófagos causam esse estímulo, e os fibroblastos atuam sintetizando os fatores de crescimento, para em seguida irem até o local da ferida, serem ativados e comecem a sintetizar colágeno (Cedillo-Cortezano, *et al.*, 2024; Moreira, *et al.*, 2024; Busanello-Costa, *et al.*, 2020; Ferreira, *et al.*, 2022; Kierszenbaum, 2021).

Em resposta ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e macrófagos, os fibroblastos sintetizam uma matriz provisória de colágeno tipo III, glicosaminoglicanos e fibronectina. Entre o 7º e 14º dia, em resposta ao TGF- β os fibroblastos sintetizam colágeno tipo I, diminuem a produção de MMPs, aumentam a produção de inibidores de MMP e aumentam a produção de proteínas de adesão celular (Cedillo-Cortezano, *et al.*, 2024; Moreira, *et al.*, 2024; Busanello-Costa, *et al.*, 2020; Ferreira, *et al.*, 2022).

A recuperação da pele após uma injúria segue um padrão, onde inicialmente a MEC é composta por fibrina e fibronectina, decorrente do processo de hemostasia

e coagulação dos macrófagos. Em seguida, GAGs, proteoglicanos e outras proteínas são sintetizadas pelos fibroblastos, os quais fornecem uma estrutura preliminar desorganizada para a nova matriz. Em seguida essa matriz é substituída por uma matriz mais forte e organizada feita de colágeno (Cedillo-Cortezano, *et al.*, 2024; Moreira, *et al.*, 2024; Aghakhani, Zerrouk, Niarakis, 2021).

3.1.2 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano e constitui 30% do peso seco, e 80% do volume dérmico, sendo o principal componente da pele, conferindo base e resistência à mesma. Tem formato de fita tripla helicoidal e é formado por três cadeias polipeptídicas. Existem cerca de 27 tipos de colágenos descritos em literatura, e suas fibras variam entre 2 a 15 nm, sendo uma rede ondulada fina em derme papilar, e espessa em derme reticular. Os principais aminoácidos que compõem o colágeno são a glicina (33,5%), a prolina (12%) e a hidroxiprolina (10%) (Moreira, *et al.*, 2024; Azulay, 2021; Junqueira, Carneiro, 2023; Chugaeva, *et al.*, 2023; Feitosa, *et al.*, 2022).

A síntese de colágeno, que se inicia no núcleo do fibroblasto, depende da transcrição dos genes que codificam as cadeias do mesmo. Essa informação é traduzida no citoplasma, onde os ribossomos sintetizam um precursor de pró-colágeno que emite um sinal e permite a entrada no retículo endoplasmático rugoso, onde é transformado em pró-colágeno e passando por hidroxilações de lisina e prolina, que confere estabilidade a estrutura de tripla hélice. Após, a tripla hélice é transportada para o complexo Golgi para passar por modificações e ser liberada no meio extracelular, onde enzimas pró colágeno-peptidases removem as extremidades desse pró-colágeno e alinham em formando fibrilas (Fujii, *et al.*, 2022; Hirata, *et al.*, 2022; Ishikawa, *et al.*, 2023).

Na MEC dérmica há essencialmente dois tipos de colágeno: o colágeno tipo I e o colágeno tipo III. Na pele ilesa o colágeno I representa 80 a 90% da composição, e o tipo III representa 10 a 20%. No tecido de granulação, o colágeno tipo III representa 30% da composição da pele, e na cicatriz madura cai para 10%. (Busanello-Costa, *et al.*, 2020; Halper, 2021; Kierszenbaum, 2021).

Há também outros tipos de colágeno que auxiliam em outras funções, como colágeno tipo IV que compõe as membranas basais da junção dermoepidérmica, o

tipo VII, sendo o principal componente das fibrilas de ancoragem da junção, e o tipo XVII que é localizado na porção extracelular dos hemidesmosomos (Azulay, 2021).

O colágeno tipo I está presente em ossos, tendões, dentina e pele, e confere resistência à tração. Já o colágeno tipo III está presente na lâmina reticular das membranas basais, em sua maioria na derme papilar. Nos colágenos tipo I e III as moléculas se agregam em subunidades que se associam para formar fibrilas, que são estruturas finas e alongadas com diâmetro variável entre 20 a 90 nm. Elas contêm estriações transversais com uma periodicidade característica de 64 nm. As fibrilas se juntam para formar fibras colágenas e fibras reticulares (Kierszenbaum, 2021; Junqueira, Carneiro, 2023).

Existem vários fatores que estimulam o fibroblasto a produção de colágeno, como por exemplo os fatores de crescimento, como TGF- β , que desencadeia uma cascata de sinalização aumentando a expressão dos genes de colágeno, e FGF e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), que atuam na proliferação dos fibroblastos. Há também a estimulação mecânica, onde o estímulo promove a produção devido tensão no tecido, como ocorre no processo de cicatrização, porém o excesso de citocinas inflamatórias como IL-6, podem levar a cicatrização irregular. E minerais como cobre e zinco, e vitaminas como a vitamina C, que atuam na hidroxilação, onde por exemplo, a deficiência de vitamina C, que leva ao escorbuto, pode causar degeneração de tecido conjuntivo e produzir um colágeno defeituoso (Azulay, 2021; Junqueira, Carneiro, 2023; Chugaeva, *et al.*, 2023).

3.2 FISIOPATOLOGIA DO ENVELHECIMENTO

O envelhecimento, segundo a organização mundial de saúde (2022), resulta no acúmulo de danos moleculares e celulares, e assim, como em todos os órgãos do corpo, a pele também sofre impacto na sua fisiologia e aparência. A pele é um dos maiores indicadores da idade de cada indivíduo e os fatores que determinam esse envelhecimento podem ser intrínseco ou extrínseco (Karimi, 2023; He, *et al.*, 2023).

Os fatores intrínsecos são as mudanças fisiológicas que ocorrem naturalmente à medida que envelhecemos, determinados pela genética, hormônios e estresse oxidativo, no qual há uma redução da síntese de colágeno e outros componentes da matriz extracelular. Os extrínsecos estão relacionados às

agressões externas, como exposição solar e radiação UV, poluição, hábitos e saúde geral. O envelhecimento intrínseco geralmente causa afinamento da espessura da pele, desidratação, linhas finas e flacidez, enquanto o extrínseco leva a sulcos, perda de elasticidade e manchas (Zerbinati, *et al.*, 2023; Ferreira, *et al.*, 2020; Lee, *et al.*, 2022; Neca, *et al.*, 2022; Feitosa, *et al.*, 2022; Karimi, 2023).

Como a pele possui regeneração contínua, é necessário de energia metabólica ativa para suas necessidades energéticas, dependendo assim de trifosfato de adenosina (ATP). O ATP é produzido principalmente por meio da fosforilação oxidativa na mitocôndria, gerando como subproduto as EROs, sendo a produção intrínseca mitocondrial, maior que a produção extrínseca (Sreedhar, Aguilera-Aguirre, Singh, 2020).

O estresse oxidativo se caracteriza pelo desequilíbrio de AO e oxidantes, em favor de compostos pró oxidantes, como os EROs, que são moléculas instáveis e reativas, com um par de elétrons desemparelhados, formando assim os RL. Ambos envolvidos no processo de envelhecimento e diversas doenças inflamatórias, pois danificam estruturas celulares como membrana e DNA (Warraich, Hussain, Kayani, 2020; Tsuchida, Kobayashi, 2020; Zargar, *et al.*, 2022).

Outra causa que gera danos oxidativos são as células senescentes, que quebram de fita dupla e comprometem o reparo do DNA. Elas produzem fenótipos secretores associados à senescência (SASPs), como citocinas pró inflamatórias e imunomoduladoras. A radiação UV também é um dos principais estímulos que causam a senescência em fibroblastos, que pode agravar o envelhecimento da pele secretando IL-6 e IL-8, responsáveis pela degradação da MEC (Lee, *et al.*, 2022; Zhang, *et al.*, 2024).

Fator intimamente relacionado às células senescentes, é o encurtamento dos telômeros, estruturas de proteína de DNA que estão ao final dos cromossomos. Quando os telômeros atingem um comprimento criticamente curto, ocorre a ativação de danos ao DNA e induz a senescência celular, sendo um fenômeno associado ao envelhecimento natural e à maior incidência de doenças. Esse encurtamento pode ser acelerado por fatores extrínsecos, sendo a pele a mais afetada devido a rapidez da sua recuperação (Lin, Epel, 2022; LI, *et al.*, 2021).

Em estudo realizado por Tsuchida e Kobayashi (2020), concluiu-se que a pele da face possui variações regionais das EROs, e há aumentos em locais específicos ao decorrer da idade. Eles também encontraram correlações entre o estresse

oxidativo e as propriedades biofísicas da pele, que envolve as características biológicas, mecânicas e funcionais da pele, sugerindo que as EROs também influenciam na formação de rugas no rosto.

Outro fator que influencia no envelhecimento devido a interferência com a síntese de colágeno, é o estrogênio. Esse hormônio protege a pele e os ossos da degradação minimizando a diminuição de colágeno e densidade óssea, porém durante a menopausa a quantidade desse hormônio diminui e, com isso, há redução da proteína, o que leva a um afinamento na pele, desidratação, alteração da fibra colágena, e aparecimento de rugas (Feitosa, *et al.*, 2022).

Outras características do envelhecimento podem ser ocasionadas através de radiação UV e tabagismo, ativando as MMPs e interleucinas (IL), que degradam a MEC e o colágeno na pele, trazendo o aspecto de pele enrugada, além de sinais de envelhecimento prematuro. A MMP-1, colagenase, é capaz de causar danos às fibras de colágeno, enquanto as outras MMPs degradam seus fragmentos, como a 92 kDa gelatinase (MMP-2), estromelisina (MMP-3) e 72 kDa gelatinase (MMP-9) (He, *et al.*, 2023; Zhang, *et al.*, 2024; Zargaran, *et al.*, 2022; Karimi, 2023; Quan, 2023b; Feitosa, *et al.*, 2022).

Além das MMPs, o tabagismo altera a expressão dos TIMPs, favorecendo ainda mais a degradação e perda de colágeno na pele. Os TIMPs são 14% menor em fumantes, e os níveis sanguíneos de MMP-1 e MMP-8, que atuam degradando colágenos tipo 1, 2, 3 e 5, são maiores nesse público quando comparado em não fumantes (Zargaran, *et al.*, 2022; Karimi, 2023; Quan, 2023b; Feitosa, *et al.*, 2022).

Associado ao envelhecimento intrínseco, devido ao aumento da idade, há o aumento da incidência de pele seca, chamada de xerose ou xerodermia, com a estimativa de prevalência de 41,2 a 99,1% em idosos. Pode ser associado a diminuição do estrato córneo, aumento de pH da pele, diminuição da elasticidade, inflamação subclínica e marcadores inflamatórios alterados (Zargaran, *et al.*, 2022; Amin, *et al.*, 2024).

Também há estudos que trazem que hábitos alimentares aumentam a incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento, como dietas hipercalóricas por longos períodos, ocasionando reações de glicação e acúmulo de produtos de glicoxidação, que levam o colágeno a perda de flexibilidade e enfraquecimento das fibras. Sendo necessário uma dieta balanceada para consumir vitaminas e aminoácidos necessários para a síntese do colágeno e diminuir os danos causados

a esse, além da hidratação (Feitosa, *et al.*, 2022; Junqueira, Carneiro, 2023; Moreira, *et al.*, 2024).

A idade biológica da pele pode ser analisada pela sua estrutura incluindo espessura, firmeza e elasticidade, e perda de água transepidérmica (TEWL) para avaliar o nível de hidratação da pele. A nível molecular, a pele humana envelhecida naturalmente ou fotoenvelhecida compartilham dos mesmos danos, incluindo o acúmulo de colágeno dérmico danificado. O colágeno tem sua perda no corpo entre 18 e 29 anos, correspondendo a 1% ao ano após os 40 anos devido à diminuição da síntese de colágeno e aumento da degradação do colágeno existente, e 75 a 80% no geral depois dos 80 anos, quando comparado a adultos jovens (Zargaran, *et al.*, 2022; Neca, *et al.*, 2022; Zhang, *et al.*, 2024; Karimi, 2023; He, *et al.*, 2023).

A integridade da junção dermoepidérmica garante resistência física, suprimento de nutrientes e oxigênio. Com o envelhecimento, as fibras de ancoragem atrofiam e levam à diminuição do contato, aumento da vulnerabilidade da pele e facilitando a formação de rugas. Na derme há diminuição da síntese de componentes da MEC, glicosaminoglicanos e ácido hialurônico, tornando a derme desidratada, delgada e rígida, tendo assim baixa elasticidade e maior vulnerabilidade, gerando as rugas e flacidez (Zargaran, *et al.*, 2022; Karimi, 2023; Marucci, *et al.*, 2022;).

Essa perda de volume na pele leva a um impacto na sua função, como a diminuição da barreira de proteção, aumentando sua fragilidade, prejudicando a vascularização e a hidratação cutânea, gerando má cicatrização de feridas e resultando em neoplasias. Sendo assim, o envelhecimento da pele não é só uma preocupação estética e sim um problema de pele relacionado à idade (Quan, 2023a; Zargaran, *et al.*, 2022; Amin, *et al.*, 2024; He, *et al.*, 2023).

3.3 BIOESTIMULADOR DE COLÁGENO

O bioestimulador de colágeno é uma substância bioabsorvível e biocompatível, capaz de estimular a produção de colágeno. A neocolagênese dá início após o produto ser depositado na derme profunda, com uma reação inflamatória subclínica, o qual possui duração entre 18 meses a 2 anos a depender do tipo de bioestimulador utilizado (Neca, *et al.*, 2022).

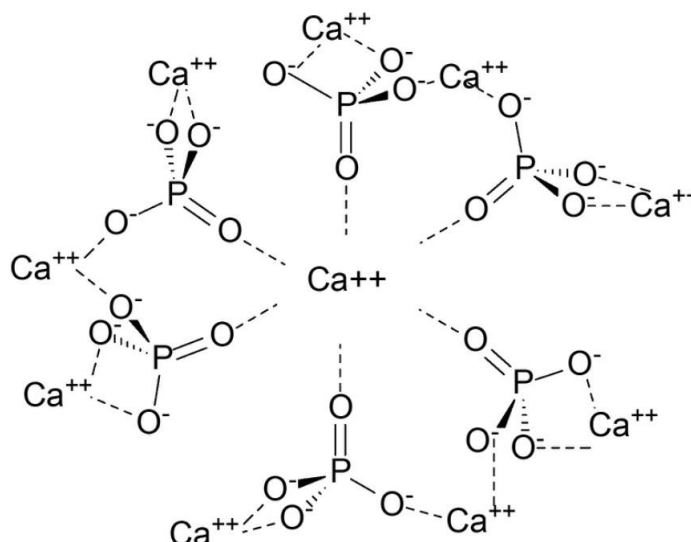
Eles substituem o colágeno que o corpo perde devido ao envelhecimento, com segurança e tolerabilidade, sendo uma opção eficaz e segura. Podem ser utilizados em face e partes do corpo sendo indicado de duas a três sessões para melhorar a flacidez cutânea, assim como redensificar o volume dérmico (Bonin, 2019; Corduff, *et al.*, 2021).

Os bioestimuladores de colágeno ajudam a devolver o contorno facial, assim como a hidratação, firmeza e sustentação da pele, sendo utilizado para melhorar a aparência, retardar o envelhecimento, tratar flacidez e perda de elasticidade da pele. Entre os tipos disponíveis no mercado temos a policaprolactona (PCL), ácido poli-L-lático (PLLA), polidioxanona (PDO) e a hidroxiapatita de cálcio (HAp), todos apresentando potencial para rejuvenescimento, estimulando colágeno e trazendo volumização. Sendo então a HAp um tipo de bioestimulador utilizado a mais de 10 anos no mercado (Neca, *et al.*, 2022; Almeida, Levy, Buzalaf, 2023; Melo, *et al.*, 2020; Bonin, 2019).

3.3.1 Hidroxiapatita de cálcio

A HAp, Figura 2, cuja fórmula molecular é representada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e a razão molar Ca/P é de 1,67, é um biomaterial cerâmico inorgânico à base de fosfato de cálcio do grupo das apatitas, nome dado ao grupo de diversos minerais com propriedades isomorfas, podendo ser também bioinerte, bioativo, biorreabsorvível, entre outros (Amorim, *et al.* 2021; Haddad, *et al.*, 2022; Nadal, *et al.*, 2022; Novella, *et al.*, 2023; Hartatiek, *et al.*, 2023).

Figura 2. Estrutura molecular da hidroxiapatita de cálcio.



Fonte: O autor.

A HAp é um produto sintético de origem não animal, composto de um mineral presente em ossos e dentes. Inicialmente foi feito para uso odontológico e médico, como uso em revestimento de prótese ortopédica, implantes e reparos de tecidos ósseos (Hartatiek, *et al.*, 2023; Liu, Tsai, Chen, 2020).

Após seu desenvolvimento e aprovação, foi observado a sua capacidade de estímulo de colágeno em pacientes com perda óssea facial, sendo então aprovado em 2006, pelo *food and drug administration* (FDA), seu uso estético como correção de rugas moderadas a severas, e restauração de volume de face e áreas como dorso das mãos (Cohen, *et al.*, 2023; Neca, *et al.*, 2022).

A HAp pura cristaliza-se sob a forma monoclinica, no entanto, em temperaturas acima de 250°C , existe a transição para forma hexagonal. Algumas impurezas, ou substituições por íons cloreto ou fluoreto, estabilizam a forma hexagonal a temperatura ambiente e por isso, geralmente monocristais naturais de HAp exibem uma conformação hexagonal. Sua densidade é de $3,16 \text{ Kg/m}^3$ e os parâmetros de rede são $a = b = 0,9423\text{nm}$ e $c = 0,6875\text{nm}$ (Aoki, 1991; Amorim, *et al.* 2021; Viana, *et al.* 2020; Lopes, 2020).

Para aplicação injetável intradérmica a HAp é administrada na forma de gel, onde a HAp encontra-se na concentração de 30% de microesferas sintéticas com diâmetro entre 25 a $45 \mu\text{m}$, e 70% de um gel veículo carreador que contém carboximetilcelulose de sódio (CMC), água estéril e glicerina. Na prática clínica a diluição é realizada 1:1 ou 1:2, o qual é hiperdiluído, utilizando de solução salina

0,9% ou salina 0,9% + lidocaína 2%, sendo esse um fármaco pertencente à classe dos anestésico (Almeida, Levy, Buzalaf, 2023; Neca, *et al.*, 2022; Nowag, *et al.*, 2022; Corduff, *et al.*, 2021).

Após a sua administração na pele, o efeito é imediato no local e gradualmente o gel carreador começa a ser dissipado, e as microesferas presentes desencadeiam a resposta inflamatória controlada acarretando no estímulo necessário do fibroblasto para produção de colágeno. As possíveis reações pós procedimento incluem os sintomas de inflamação no local de aplicação, como dor, rubor, calor e edema, sem perda de função (Almeida, Levy, Buzalaf, 2023; Cohen, *et al.*, 2023; Neca, *et al.*, 2022; Bonin, 2019).

A HAp é reconhecida como corpo estranho, atraindo macrófagos para a área da injúria que serão ativados para remover partículas estranhas e iniciar a reparação tecidual no local. Na fagocitose o macrófago engloba as partículas com suas vesículas, chamadas de fagossomos, e dentro deles as enzimas lisossomais e EROs quebram a HAp e seus componentes básicos que poderão ser utilizados pelo corpo ou excretados, sendo esses os íons de cálcio e fosfato. O processo é facilitado pela presença de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias (Barbosa, Vasconcelos, 2020).

Os macrófagos conseguem fagocitar partículas de até 5 μm , porém, caso haja a presença de material de maior dimensão, eles podem se juntar e formar as células gigantes de corpo estranho (CGCEs), onde há redução da atividade fagocitária e aumento de capacidade degradativa causado pelas EROs na superfície do material. Além disso, os CGCEs secretam fator de crescimento de fibroblasto que leva ao encapsulamento fibroso em torno do material devido a deposição de colágeno (Barbosa, Vasconcelos, 2020; Chen, *et al.*, 2023).

Segundo sugere Chen e colaboradores (2023), os macrófagos possuem dois fenótipos, o M1 pró inflamatório, e M2 de reparação tecidual. Após a lesão, a população de macrófagos predominante é M1, que secretam fatores pró inflamatórios como IL-1 e TNF- α , e EROs e de nitrogênio, incluindo NO e superóxido, que são tóxicos para microrganismos mas também prejudiciais para o tecido celular ao redor. Os macrófagos M2, alternativamente ativados, tem capacidade anti-inflamatória e efeito antagonista para resposta de M1, o que dá início a fase de remodelação do tecido e o processo de cicatrização (Li, *et al.*, 2020; Barbosa, Vasconcelos, 2020).

Estudos mais antigos já haviam sugerido o efeito do HAp para aumento da derme, como o estudo feito por Eppeley e colaboradores (1994), onde foi testado a aplicação em 14 ratos Sprague Dawley fêmeas, sendo aplicado 1,5mL de HAp no abdômen, que apresentou visível aumento de 3 a 4 mm da pele. As peles foram retiradas e examinadas em lâmina histológica com 1 e 12 meses após a aplicação de HAp. Após 1 ano o material apresentava extensa formação de fibroblastos e colágeno, com ausência de infiltrado de neutrófilos e linfócitos, e verificou-se a ausência de CGCE apesar do tamanho das partículas (80-120 μ m), podendo se especular em modificação de atividade dos macrófagos devido ao efeito da superfície das estruturas.

A HAp promove efeito imediato de volume que permanece por uma média de 12 meses, sendo capaz de remodelar a matriz extracelular a partir do estímulo da produção de colágeno, o que contribui com a maior duração e capacidade de sustentação da HAp. A degradação dos cristais de HAp são observados em torno de quatro meses, como produção de colágeno, e 24 meses após a aplicação os cristais foram completamente absorvidos pelos macrófagos (Almeida, Levy, Buzalaf; Cohen, *et al.*, 2023).

Deve-se ressaltar os efeitos adversos que aparecem em estudos, como por exemplo a revisão de Guida e Galadari (2024), o qual foi encontrado em 5.081 tratamentos um total de 3% de eventos adversos, sendo a maioria a ocorrência de nódulos. Essa complicação pode ocorrer em caso de aplicação sob áreas dinâmicas, como área periorbital e perioral, e lábios, as quais não são áreas recomendadas pelos fabricantes.

3.4 NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO

A nanopartícula (NP) é uma alternativa tecnológica biocompatível e é biodegradável, não imunogênica e não tóxica. A importância da NP começou quando pesquisadores analisaram a relação entre o tamanho e influência nas propriedades físico-químicas do fármaco. Essas partículas atraíram interesse em todos os ramos médicos e farmacêuticos por conta de sua capacidade de entregar os ativos numa dosagem menor da convencional, com alta eficiência terapêutica e menores efeitos adversos, acarretando assim melhor adesão ao tratamento, sendo

mais seguros, eficazes e precisos (Wang, *et al.*, 2023; Araruna, *et al.*, 2020; Regis, Silva, Guedes, 2021; Guedes, Lima, Dantas, 2024).

As NPs são utilizadas em grande escala na encapsulação de princípios ativos principalmente devido a sua liberação modificada, mantendo maior tempo em circulação, e seu potencial de melhorar a estrutura de fármacos pouco solúveis em água melhorando sua biodisponibilidade e entrega do ingrediente ativo (Guedes, Lima, Dantas, 2024; Koniuch, *et al.*, 2023).

Para aplicação desse sistema na área médica, é exigido que as NPs tenham tamanho menor que 1000 nanômetros, alto valor de magnetização e baixa distribuição de tamanho da partícula (Camargo, 2020).

Entretanto, a redução do tamanho à nanoescala pode ocasionar mudanças em suas propriedades, pois as NPs possuem grande relação de volume e superfície, sendo um dos fatores responsáveis por novas propriedades físicas e químicas. Portanto um fármaco em macroescala pode ser perfeitamente seguro e não tóxico, enquanto em nanoescala penetra facilmente a pele e corrente sanguínea para sua eventual ação (Camargo, 2020; Aguilar-Hernández, *et al.*, 2023; Regis, Silva, Guedes, 2021; Ferreira, Ferreira, 2022).

A HAp é amplamente utilizada como material médico e odontológico, e considerando que a HAp está presente no osso em formato nanométrico, os avanços nas nanotecnologias permitiram o desenvolvimento de materiais de nanométricos como base de hidroxiapatita (Kavasi, *et al.*, 2021; Wu, *et al.*, 2024).

Na década de 90, os pesquisadores começaram a explorar as nanopartículas de HAp (n-HAp) como carreadores. A n-HAp possui maior solubilidade e melhor biocompatibilidade, apresentando também bioatividade quando comparado a HAp de tamanho maior. Elas tem sido utilizadas como veículos devido à sua afinidade com DNA, proteínas e medicamentos, onde a maior quantia e calibre de poros indica maior capacidade de adsorver quantidades maiores de moléculas terapêuticas e controle preciso sobre a cinética de liberação de drogas (Mondal, *et al.*, 2023; Pushpalatha, *et al.*, 2023; Arab, *et al.*, 2024; Ochoa, Lara, Beltrán, 2021; Wu, *et al.*, 2024).

As n-HAp também atuam aumentando a biodisponibilidade de medicamentos pouco solúveis, como o estudo citado por Ochoa, Lara e Beltrán (2021) que correlaciona a influência do tamanho das partículas onde n-HAp contendo partículas de 100 nm e adsorviam mais que partículas de 1 µm. Atribuído à diferença na área

de superfície, onde nanopartículas possuem área de superfície de contato mais altas do que as partículas em microescala.

Existem vários métodos para sintetizar a HAp, cada um oferecendo um controle diferente sobre suas propriedades, como tamanho de partícula, morfologia, cristalinidade, homogeneidade e porosidade e tamanho de poros. As formas de sintetizar são: precipitação, sol-gel, hidrotérmico, sonoquímico (utilizando ultrassom), deposição biomimética e deposição eletroquímica (Mondal, *et al.*, 2023).

Uma característica relevante da n-HAp é a capacidade de substituição de íons, como Mg^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+}/Fe^{3+} , Zn^{2+} , entre outros, para troca iônica em seus locais aniônicos (PO_4^{3-} , OH^-) e catiônicos (Ca^{2+}), alterando estabilidade da estrutura. A alteração por íons magnéticos como Fe^{2+} , abriu aplicações como terapias anticancerígenas, onde o ferro causa danos às mitocôndrias e membranas de células cancerígenas. Outra modificação na superfície de n-HAp por ácido hialurônico pode direcionar a entrega de doxorubicina, droga usada para tratamento de câncer, para as mitocôndrias e núcleos das células de câncer de fígado. A alteração por Mg^{2+} e Sr^{2+} podem substituir o Ca^{2+} na rede cristalina, levando a melhor resistência mecânica (Inam, *et al.*, 2024; Kargozar, *et al.*, 2022; Mondal, *et al.*, 2023).

Na medicina regenerativa é aplicada na engenharia de tecidos ósseos, como tratamento para sensibilidade e cáries, e, mais recentemente, na regeneração de tecidos moles com capacidade antibacteriana (Inam, *et al.*, 2024; Arab, *et al.*, 2024).

Pushpalatha e colaboradores (2023), mostraram que a n-HAp combinada com nanopartículas de óxido de zinco (n-ZnO) para ação antibacteriana apresentaram essa ação quando expostos a *Staphylococcus aureus*. E em estudo citado por Arab e colaboradores (2024), foi usado flúor de sódio (NaF) para impregnar os os poros de n-HAp para tratamento dentário, apresentando uma liberação contínua e lenta sem efeito citotóxico.

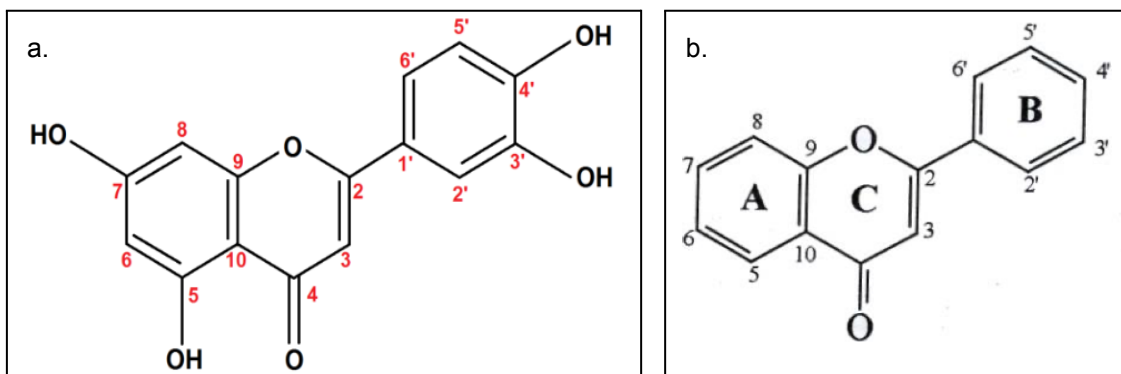
Outros sistemas com n-HAp em literatura mostraram sistemas carreadores, contendo diferentes polissacarídeos para preparo, com ações diversas, utilizando da n-HAp como reforço cerâmico. Costa e colaboradores (2024) demonstraram o uso de ciprofloxacino para aplicação em implantes ortopédicos, e eficiência de incorporação e de liberação prolongada de outros fármacos como diclofenaco, tetraciclina e sulfadiazina de prata, e vancomicina, com uso como antiinflamatório, antioxidante, antibacteriano e/ou estimulador da formação óssea.

De 2020 até o presente momento, a n-HAp tem sido investigada para usos como adsorvente reciclável, biomateriais ortopédicos, materiais biomédicos e médicos, cicatrização de feridas da pele, entre outros, proporcionando aplicações para diversas áreas da tecnologia futura (Mondal, *et al*, 2023).

3.5 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA LUTEOLINA (LUT)

A luteolina (LUT), representada na Figura 3a, é uma flavona da classe dos flavonoides (Figura 3b), encontrada em muitas plantas e apresenta atividade antiinflamatória e antioxidante, a partir da modulação do estresse oxidativo (Theoharides, 2021).

Figura 3. Estrutura química da luteolina (a) e estrutura química base dos flavonoides e sua numeração (b).



Fonte: Santos, 2021; Galego, 2014.

Foi nomeada e isolada em 1829 por Michel Eugène Chevreul, um químico francês. Em 1864, foi determinada sua fórmula empírica por Heinrich Hlasiwetz e Leopold Pfaundler, químicos austríacos, e em 1896, Arthur George Perkin, um químico inglês propôs sua estrutura correta, que foi confirmada em 1900 por um químico suíço-polonês, Stanislaw Kostanecki, e sintetizada por sua equipe, sendo ela $C_{15}H_{10}O_6$ (Bangar, *et al.*, 2023).

Dentro da classificação dos flavonoides é considerada uma tetra-hidroxiflavona, no qual apresenta grupos hidroxil localizados nas posições 3', 4', 5 e 7, formando assim o 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona, com nomenclatura IUPAC 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4H-chromen-4-one e registro CAS número 491-70-3. Apresenta aspecto de pó fino amarelo claro, com ponto de fusão de

329,5°C, e ebulição entre 616 a 617°C, massa molecular 286,24 g/mol, pKa de 6,57 e base de -5,4 e área da superfície polar de 107,22 Å². É altamente higroscópica e não fotossensível. O coeficiente de partição (log P) é 2,53 e possui baixa solubilidade em água, de 0,138 mg/mL a 25 °C, e maior solubilidade em solventes orgânicos como o dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol (Santos, 2021; Rocchetti, *et al.*, 2023; Huang, *et al.*, 2023; NCBI, 2004; Wishart, *et al.*, 2022; Knox, *et al.*, 2024).

Ela possui potencial sequestrante de RL em modelos celulares e efeito neuroprotetor, e tem sido amplamente usada no Brasil e China. Ainda, regula mediadores inflamatórios e citocinas *in vivo* e *in vitro*, sendo as citocinas as principais responsáveis por inflamações agudas e crônicas. A LUT é capaz de inibir as interleucinas (IL), o TNF, o interferon (IFN) e as demais citocinas pró inflamatórias, além de aumentar o nível de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Gendrisch, *et al.*, 2020; Rocchetti, *et al.*, 2023; Huang, *et al.*, 2023).

Rocchetti e colaboradores (2023), mostraram o potencial anticarcinogênico de LUT em diversas áreas como câncer de mama, melanoma, leucemia e outros. Ela é capaz de suprimir a angiogênese em células cancerígenas, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e MMPs, além de diminuir a degradação da MEC, e induzir apoptose, atuando com atividade anti-inflamatória e na superprodução de EROs.

Gendrisch e colaboradores (2020), apontaram o uso de flavonoides como a LUT, em estudos de cicatrização de feridas *in vivo*, a qual se mostrou benéfica, além de doenças inflamatórias da pele, como psoríase e dermatites atópicas e de contato, mostrando capacidade da LUT inibir ou interferir em vias de sinalização pró-inflamatória em diferentes tipos de células. Também tem potencial em doenças induzidas por UV, como câncer de pele e fotoenvelhecimento (Cedillo-Cortezano, *et al.*, 2024).

A radiação UV induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias de queratinócitos e fibroblastos, e aumenta a produção de MMP-1 e hialuronidase, que fragmenta o colágeno e o ácido hialurônico (AH) respectivamente, sendo esses responsáveis por desempenhar o papel de retenção da hidratação na célula. Essas citocinas são inibidas por LUT, além de inibir também a expressão de adenosina cíclica monofosfato e adenil ciclase, a partir do alfa-MSH em células de melanoma (Gendrisch, *et al.*, 2020; Manzoor, *et al.*, 2019).

A síntese de LUT depende da metodologia aplicada e propriedades bioquímicas das moléculas naturais. A extração é feita a partir de plantas como brócolis, cebolas, folhas de cenoura, flor de crisântemo, casca de maçã, entre outros, onde nos vegetais é encontrado em torno de 37,96 mg LUT a cada 100 g, e se dá com uso de solvente orgânico com longo tempo de extração em altas temperaturas. Outras formas de extração são por microondas, enzimas, ultrassom-microondas, hidrodestilação, soxhlet, maceração e ultrassom (Conti, *et al.*, 2021; Manzoor *et al.*, 2019).

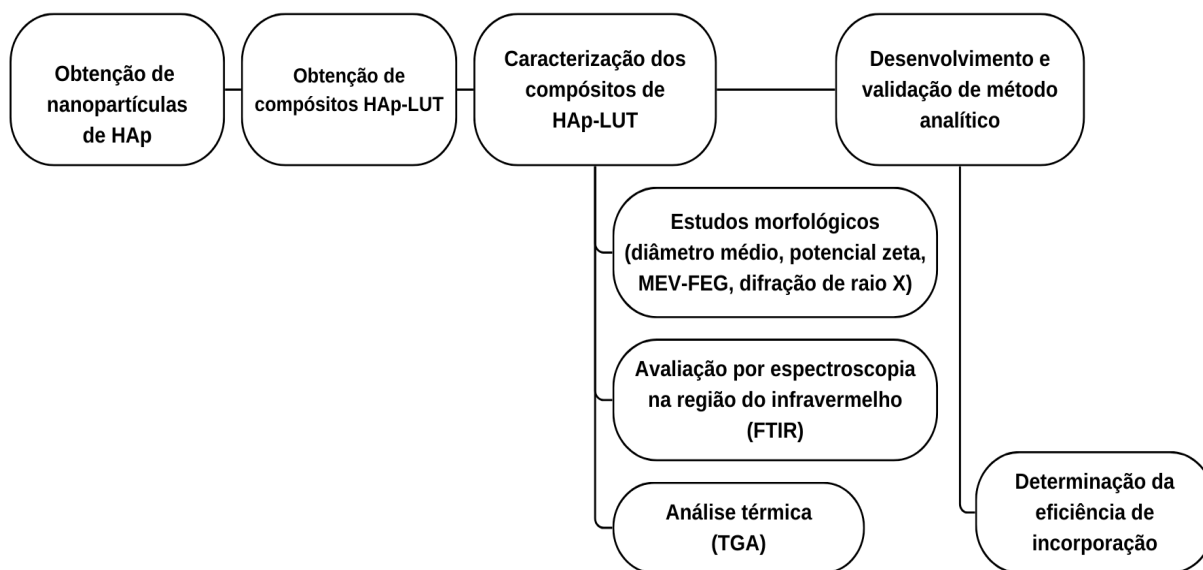
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O presente trabalho teve início com a síntese das nanopartículas de hidroxiapatita (HAp), e posteriormente, sua associação à luteolina (LUT). Em seguida, foram realizadas as análises de caracterização por métodos morfológicos, espectroscópicos e térmicos das amostras dos compósitos HAp-LUT.

A quantificação do fármaco incorporado nas partículas foi realizada por meio da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjos de diodo (HPLC-DAD), previamente desenvolvido validado de acordo com a Resolução 166, de 24 de julho de 2017, avaliando, assim, a eficiência de incorporação da LUT. As etapas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 4.

Figura 4. Fluxograma das etapas da pesquisa.



Fonte: O autor

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

Luteolina ($C_{15}H_{10}O_6$, pureza 98,6%, peso molecular 286,24g/mol) foi adquirida da Active Caldic (fabricante Fine Pharma, China).

Água destilada, hidróxido de amônio (NH_4OH), ácido fosfórico (H_3PO_4), adquiridos do laboratório Êxodo Científica e nitrato de cálcio PA ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$), adquiridos do LabSynth (LabSynth, Brasil), para sintetizar as n-HAp.

Os produtos foram utilizados sem nenhum tipo de purificação.

Água ultrapurificada pelo sistema de ultrapurificação em equipamento Milli-Q (Merck, Integral 5, Darmstadt, Alemanha).

Para a quantificação analítica em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), utilizou-se metanol (CH₃OH) grau HPLC/UV (Hexis Científica, Phillipsburg, Estados Unidos).

4.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO E OBTENÇÃO DOS COMPÓSITOS HAP-LUT

A síntese de nanopartículas de HAp (n-HAp) foi realizada pelo método de precipitação a partir do cálculo da relação molar estequiométrica de Ca/ P de 1,67, necessária para a produção de hidroxiapatita de cálcio (Silva, *et al.*, 2024). A reação foi realizada dentro de uma capela, onde para a Fase 1 foi adicionado 228 mL de água destilada, 165 mL de NH₄OH e 7 mL de H₃PO₄, sob agitação magnética (TE-0851, TECNAL®) a 50 °C. Após, foi preparado uma nova solução, Fase 2, contendo 250 mL de água destilada e 66,5 g de Ca(NO₃)₂.4H₂O, a qual foi gotejada 150 mL lentamente sob a Fase 1, sob agitação vigorosa. Após completo gotejamento, aumentou-se a temperatura de 50°C para 100°C, por um período de 60 minutos ainda sob agitação vigorosa e as amostras foram armazenadas em recipientes de vidro para posterior liofilização.

4.3.1 Liofilização

A amostras sintetizadas foram congeladas em ultra freezer a -86°C (Nu9668GC, NUAIRE), onde permaneceram por 48h. Em seguida, foram submetidas à liofilização (LD 1500, TERRONI), por um período de 72h, para obtenção das n-HAp.

4.3.2 Teor de umidade

O teor de umidade das amostras sintetizadas de n-HAp foi avaliado em analisador de umidade por infravermelho (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto,

Japão), a fim de realizar fator de correção das proporções das amostras para incorporar em compósito HAp-LUT.

4.3.3 Formação dos compósitos HAp-LUT

Para a formação dos compósitos foi considerado o valor de umidade encontrado em n-HAp e adicionado a LUT nas concentrações de 1, 10 e 20% da amostra. A LUT, n-HAp e álcool etílico absoluto 99,5% foram misturados e triturados utilizando o SpeedMixer® (Hauschild Speedmixer®, DAC 150.1 FV-K, Landrum, South Caroline), sob agitação de 3.500 rpm por 3 h (Silva, *et al.*, 2024). Após esse processo, os compósitos HAp-LUT com aspecto pastoso foram levados para secagem em estufa seca a 35°C por 48h. Para fins comparativos, foi preparado uma amostra sem a adição da LUT (L0) como controle, e L1, L2 e L3 nas concentrações determinadas.

4.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE HAp CONTENDO LUT

Para desenvolvimento do método foi utilizado o fármaco puro LUT solubilizado em álcool metílico (CH₃OH, metanol) grau HPLC na concentração de 1 mg/mL. Foi utilizado uma coluna C₁₈ (Shim-pack CLC-ODS M, SHIMADZU), com tamanho de partícula de 5 µm, 150 mm de comprimento e 4,6mm de diâmetro interno. O comprimento de onda do detector de arranjo de diodo (λ) foi definido para 254 nm.

A taxa de fluxo foi de 1 mL/min, volume de injeção 5 µL, e temperatura do forno de 25°C. A fase móvel consistiu de água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (Fase A) e metanol (Fase B) na proporção 40:60 (v/v) em um tempo de corrida de 8 min, em método isocrático.

Os parâmetros avaliados para a validação foram seletividade, linearidade, homocedasticidade, limite de quantificação e detecção, precisão, exatidão, robustez e estabilidade da amostra, e a validação foi realizada de acordo com a RDC 166/2017 (Brasil, 2017).

4.4.1 Seletividade

A seletividade foi determinada pela análise do cromatograma das nanopartículas de HAp (L0) em comparação com o cromatograma da LUT com a intenção de confirmar que a formulação e o processo de preparo não interferem na quantificação do fármaco.

4.4.2 Linearidade

Para a linearidade, as amostras foram preparadas a partir de solução mãe na concentração de 1 mg/mL, em seguida foi preparado soluções de trabalho nas concentrações de 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,6 mg/mL.

A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram obtidos. A análise de regressão linear ocorreu pelo método dos mínimos quadrados e o coeficiente angular foi testado por análise de variância (ANOVA), com $p < 0,05$.

4.4.3 Homocedasticidade

Para avaliar a homocedasticidade foi elaborado um gráfico de dispersão, também chamado tipo *scatter plot*, que apresentou a relação dos valores preditos no eixo X, e dos valores residuais no eixo Y (Moreira, *et al.*, 2020).

O teste de Breusch-Pagan foi utilizado para testar a hipótese nula, H_0 , de que as variâncias dos erros são iguais, versus hipótese alternativa, H_1 ou H_A , de que as variâncias tem ao menos uma média diferente (Moreira, *et al.*, 2020).

4.4.4 Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados, por meio da relação entre o desvio padrão dos coeficientes lineares e a média dos coeficientes angulares das curvas (S), utilizando fatores multiplicadores sugeridos pela ICH (2005), conforme as equações 1 e 2.

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{S} \quad (1)$$

$$LD = 3,3 \times \frac{DP}{S} \quad (2)$$

Onde **DP** = desvio-padrão, e **S** = coeficiente angular da curva analítica (**x**).

4.4.5 Precisão

Para determinar a repetitividade do método analítico, triplicatas na concentração menor, média e maior (n=9) foram individualmente preparadas, nas mesmas condições de operação, mesmo analista, mesma instrumentação e mesmo dia. O resultado foi expresso em termos de coeficiente de variação (**CV**) de acordo com a equação 3 abaixo, onde **DP** é o desvio padrão da série de medições e **CMD** a concentração média determinada.

$$CV (\%) = (DP / CMD) \times 100 \quad (3)$$

A precisão intermediária foi avaliada por meio das mesmas nove réplicas, que também foram individualmente preparadas, em dois dias diferentes, no mesmo laboratório e por operadores diferentes. Em seguida, foi calculado o CV interdia utilizando a Equação 3. A análise estatística dos resultados foi realizada por Teste-t com $p < 0,05$.

4.4.6 Exatidão

Para a exatidão foi utilizado o método de recuperação da quantidade conhecida do analito da amostra. Para isso, as amostras foram preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas diluídas de uma mesma solução mãe, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações, sendo 3 réplicas (triplicata) de 3 concentrações diferentes, baixa, média e alta. A exatidão foi expressa pela equação 4, no qual o resultado esperado deve ser entre 95 a 105% (Brasil, 2017).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média obtida}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (4)$$

4.4.7 Robustez

Para os testes para robustez as amostras foram submetidas a diferentes condições de temperatura da coluna analítica e variação da composição da fase móvel. A temperatura da coluna analítica foi alterada de 25 °C para 22 °C e 28 °C. A variação da composição da fase móvel variou 40:60 (v/v), sendo 60% para fase B com metanol, para 59% e 61%. Os resultados dos parâmetros foram analisados por meio do CV e recuperação do analito (%) e comparados com os valores obtidos em condições padrão. A significância dos resultados foi verificada por ANOVA com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

4.4.8 Estabilidade

Para trazer confiabilidade aos resultados analíticos, foi necessário ter certeza de que os componentes das amostras em questão não sofreram decomposição durante o processo de estoque e preparo das amostras. Assim, pode-se utilizar dos estudos de estabilidade durante a validação do método para confirmar a integridade das amostras.

Segundo Oliveira e Gaitani (2019), a estabilidade foi realizada como um dos ensaios de robustez, expondo a amostra a temperatura ambiente de no mínimo 6 horas, e os resultados desses testes foram comparados aqueles obtidos de soluções preparadas recentemente. Para esse teste, a amostra foi preparada na concentração de 0,4mg/mL e armazenada por 24 horas em temperatura ambiente, sem abrigo de luz.

4.4.9 Eficiência de incorporação

A eficiência de incorporação (EI%) foi mensurada de forma indireta pela diferença entre a concentração total e a concentração de fármaco livre.

Para isso, realizou-se o preparo das amostras, em triplicata, calculando o valor dos compósitos de hidroxiapatita e luteolina (L1, L2 e L3). Após pesagem das amostras, essas foram solubilizadas em álcool metílico, e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, retirou-se 500 µL para novo tubo, e acrescentou-se

500 µL de álcool metílico. Por fim, a amostra foi filtrada em filtro de poro 0,22 µm e analisada no método desenvolvido (Ding, *et al.*, 2022; Wang, *et al.*, 2021).

Para encontrar a eficiência de incorporação foi usado a equação 5.

$$EI (\%) = \left(\frac{\text{Concentração teórica} - \text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}} \right) \times 100 \quad (5)$$

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DOS COMPÓSITOS HAP-LUT

4.5.1 Mistura Física

A mistura física entre LUT e as n-HAP foi preparada para realização de estudo de caracterização comparativo, na proporção, em massa, de 1:1 (HAp:LUT).

4.5.2 Determinação do pH

A determinação do pH da n-HAP foi realizada em um potenciômetro digital (Analyser pH, modelo 300 M, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas soluções logo após a síntese de n-HAP, anterior ao processo de refrigeração, liofilização e formação dos compósitos.

Os resultados foram analisados em quadruplicata e a média $\pm$ desvio padrão entre os resultados foi considerada.

4.5.3 Análises morfológicas e de superfície

4.5.3.1 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta

O diâmetro médio de partícula e o índice de polidispersão (IPD) da LUT, n-HAp e HAp-LUT foram analisados por espectroscopia de correlação de fótons (Zs90, Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Reino Unido) após a diluição de uma alíquota da suspensão de nanopartículas em água ultrapura (1:500).

Cada amostra foi analisada em triplicata e a média foi utilizada para análise dos compósitos L0, L1, L2 e L3.

4.5.3.2 *Análise por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-EC)*

A avaliação morfológica e de superfície dos compósitos, das nanopartículas preparadas e dos materiais isolados, foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (FEG-SEM, ESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca).

As amostras foram depositadas em *stubs* de carbono, e submetidas à metalização com ouro em um metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, empregou-se voltagem de aceleração de 15 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.5.3.3 *Análise por difração de pó de raios X (DRX)*

A difração de pó de raios X foi realizada para avaliar a mudança de cristalinidade da estrutura das amostras.

Foram realizadas análises do fármaco puro (LUT), da n-HAp (L0), da mistura física (MF) e dos compósitos HAp-LUT (L1, L2 e L3). As amostras foram examinadas em difratômetro de raios X XRD-6000 (SHIMADZU), *scan* de 30 steps, e 2θ de 5° a 80° , usando a geometria de Bragg-Brentano com a radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$), corrente de 40mA e voltagem de 40kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.5.4 **Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (IVTF)**

A amostras de LUT, n-Hap e compósitos HAp-LUT foram analisadas por espectroscopia na região do IVTF (IR Prestige-21, SHIMADZU, Quioto, Japão) utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de amostra para 196 mg de KBr em grau espectroscópico (2%, m/m), na faixa de 400 a 4.000cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 64 scan/min^{-1} .

4.6 ANÁLISE TÉRMICA

4.6.1 Termogravimetria (TGA)

A estabilidade térmica do fármaco puro, da n-HAp, da MF e dos compósitos HAp-LUT, foi estudada por meio das curvas de termogravimetria (TGA), usadas para obter informação da degradação térmica de material.

Amostras contendo 10 mg foram submetidas a uma faixa de temperatura entre 20° C e 850° C. Para isso, após ser previamente aferido com sulfato de cobre penta-hidratado, foi empregado uma termobalança (TGA-50, SHIMADZU), em atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL/min, empregando uma razão de aquecimento de 10 °C/min. Foram registradas as curvas termogravimétricas e derivadas, e também foi calculada a composição dos resíduos dos compósitos obtidos ao final do TGA.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média das triplicatas $\pm$ desvio padrão. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA) será usada para comparações estatísticas, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism® e R.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO E OBTENÇÃO DOS COMPÓSITOS HAP-LUT

As n-HAp foram sintetizadas de maneira satisfatória de acordo com o método proposto, apresentando aspecto de flocos pulverulentos de coloração branca após a liofilização. Os compósitos de HAp-LUT foram formados de acordo com a metodologia proposta, apresentando coloração amarelada devido incorporação de LUT, com aspecto de grumos devido potencial altamente higroscópico. A importância da incorporação de LUT, um anti-inflamatório, na n-HAp se dá ao possível auxílio na diminuição do processo inflamatório intenso que é gerado após a aplicação intradérmica da HAp, produzindo um colágeno íntegro.

A Figura 5 representa a partícula isolada do compósito HAp-LUT, onde na amostra ela apresentou aglomerados dessas partículas.

Figura 5. Imagem feita a partir de inteligência artificial para representar uma n-HAp com superfície porosa, onde dentro desses poros houve a incorporação de LUT, formando o compósito HAp-LUT.



Fonte: O autor.

5.1.1 Teor de umidade

As análises foram realizadas em quadruplicata, conforme Tabela 1, e o valor médio entre as amostras foi considerado, sendo então a umidade 10,47% para as nanopartículas de HAp.

Tabela 1. Avaliação de teor de umidade das amostras de n-HAp, em quadruplicata, em balança de infravermelho a 160°C, apresentando média de 10,47% $\pm$ 1,72.

Amostras	Umidade HAp (%)
1	11,29
2	9,83
3	8,06
4	12,70

Fonte: O autor.

5.1.2 Formação dos compósitos HAp e LUT

A Tabela 2 apresenta a composição de n-HAp e LUT para formação dos compósitos HAp-LUT.

Tabela 2. Composição HAp-LUT por amostra, com massa corrigida de acordo com a umidade presente na amostra de n-HAp (10,47%).

	HAp (%)	LUT (%)	HAp (mg)	LUT (mg)
L0	100%	0%	111,69 mg	0 mg
L1	99%	1%	110,57 mg	3,33 mg
L2	90%	10%	100,52 mg	33,3 mg
L3	80%	20%	89,35 mg	66,6 mg

Fonte: O autor.

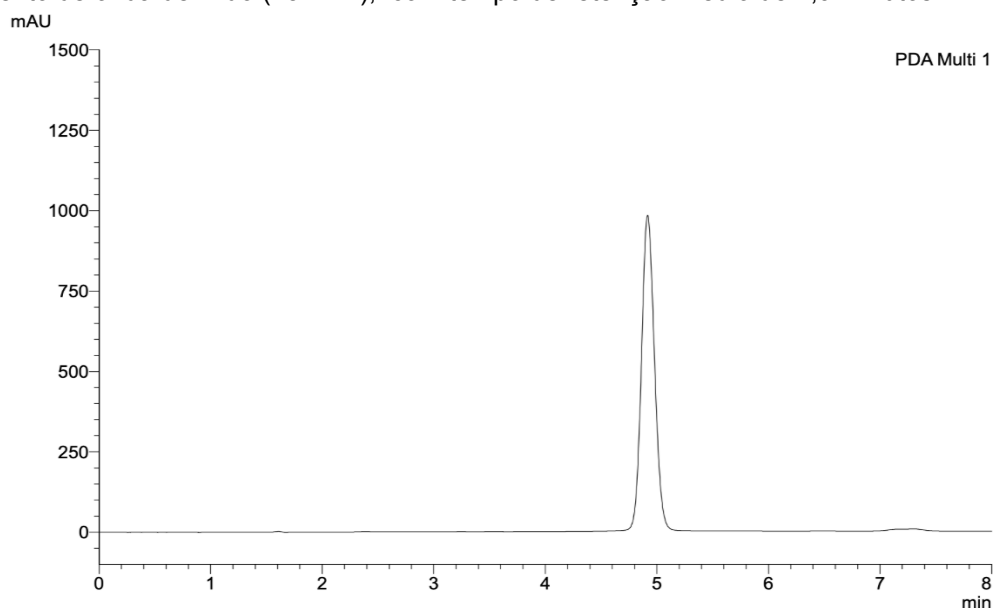
5.2 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE HAP CONTENDO LUT

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos - HPLC-DAD, com método desenvolvido e previamente validado conforme preconizado na Resolução da ANVISA, RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017 e com as recomendações da conferência internacional de harmonização de requisitos técnicos para produtos farmacêuticos de uso humano (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use – ICH*) (2023), que fornece as diretrizes que

compreende os parâmetros de validação, incluindo seletividade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e robustez (Brasil, 2017).

A Figura 6 mostra o cromatograma da LUT 0,4 mg/mL, mostrando pico cromatográfico bem definido, com tempo de retenção médio de 4,9 min.

Figura 6. Eluição cromatográfica do método desenvolvido da concentração de 0,4 mg/mL no comprimento de onda definido (254 nm), com tempo de retenção médio de 4,9 minutos.

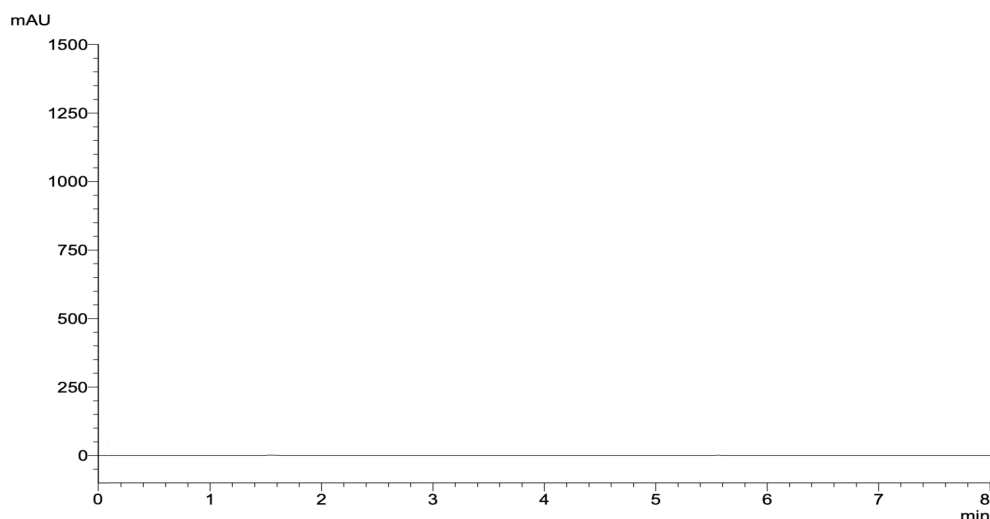


Fonte: O autor.

5.2.1 Seletividade

A eluição realizada com amostra sem presença de LUT, a qual foi determinada a amostra L0 como branco, não apresentou nenhum pico de absorção, conforme Figura 7, ou seja, resultado negativo para outras substâncias que não a luteolina.

Figura 7. Eluição cromatográfica do método desenvolvido com amostra preparada de nanopartículas de HAp (L0), não apresentando pico de absorção conforme determina o método



Fonte: O autor.

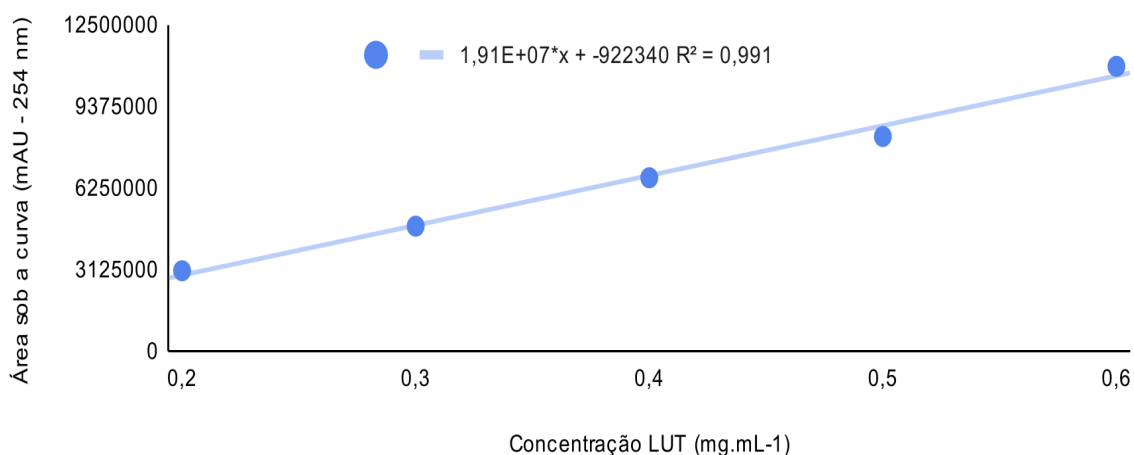
A seletividade é a capacidade de um método distinguir um analito em um meio não puro, e quanto o método é capaz de produzir resposta para apenas um analito ou fármaco puro (Oliveira, Gaitani, 2019).

Resultando em um método seletivo, sendo capaz de identificar apenas o fármaco puro na presença dos outros constituintes da formulação.

5.2.2 Linearidade

Foram obtidos os seguintes resultados para as curvas analíticas, sendo $y = (19085817) x + (-922339,6)$, apresentando um coeficiente de correlação linear (r) de 0,991, conforme o gráfico de dispersão apresentado na Figura 8, o qual indica a linearidade do método na faixa de concentração de 0,2 a 0,6 mg/mL.

Figura 8. Gráficos de dispersão representando a curva analítica para resultado da linearidade da média das amostras nas concentrações de 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,6 mg/mL, no comprimento de onda definido (254 nm).



Fonte: O autor.

5.2.3 Homocedasticidade

A homocedasticidade é um conceito estatístico que se refere à condição em que a variância dos erros/ resíduos é constante ao longo de todas as observações no conjunto de dados. Ou seja, os erros tem a mesma dispersão ou variabilidade para todos os valores. A homocedasticidade é usada para garantir a validade das inferências estatísticas decorrente das análises entre as variáveis, usando alguns testes como teste F, Breusch-Pagan e outros (Corbin, et al., 2023).

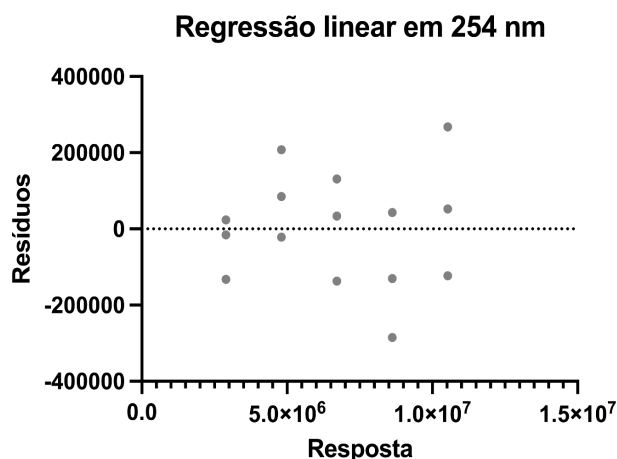
O teste F realizado a partir da análise de variância de uma via, *one-way* ANOVA, mostrou resultados de estatística F igual a 0,002072, o valor-p de 0,0997 e valor de R^2 igual a 0,000345.

O valor F baixo indica que a variabilidade entre grupos é baixa quando comparada à variabilidade dentro dos grupos. O valor-p ficou acima do nível de significância, $\alpha \geq 0,05$ ou 5%, indicando que não há evidência para rejeitar H_0 , onde todas as médias dos grupos são iguais (Corbin, et al., 2023). O R^2 mede a proporção de variação total explicada pelo modelo, ou seja, apenas 0,0345% de variação nos dados é explicada pelo tratamento entre os valores, reforçando a conclusão de que as diferenças entre os grupos não são significativas.

O gráfico de dispersão, que se encontra na Figura 9, mostra os pontos em relação a valores e resíduos dispersos aleatoriamente em torno de uma linha

horizontal, indicando presença de homocedasticidade. Caso os pontos formassem um funil ou cone, apresentaria a presença de heterocedasticidade.

Figura 9. Gráfico de dispersão apresentando presença de homocedasticidade, com pontos dos valores e resíduos dispersos, no comprimento de onda definido (254 nm).



Fonte: O Autor.

O teste estatístico de Breusch-Pagan mostrou resultado de 0,6183, sugerindo assim que não há evidências suficientes para concluir que há heterocedasticidade nos resíduos dos modelos de regressão, não rejeitando a H_0 dos conjuntos. Sendo assim, podemos concluir que os resultados mostram a evidência de que há homocedasticidade nos valores de todas as amostras da nossa curva.

5.2.4 Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)

O limite de quantificação determinado foi $LQ = 0,15 \text{ mg/mL}$, e o limite de detecção determinado foi $LD = 0,05 \text{ mg/mL}$, para o comprimento de onda determinado.

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito a ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis em uma amostra. E o limite de detecção (LD) é a menor concentração que pode ser detectada, porém não é necessariamente quantificada sob as condições do método desenvolvido (Moreira, *et al.*, 2020). Sendo assim, as concentrações entre $0,2 \text{ mg/mL}$ a $0,6 \text{ mg/mL}$ estão acima do limite de quantificação, que determina o limite mínimo a ser definido no método, e limite de detecção.

5.2.5 Precisão

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da repetitividade e precisão intermediária realizadas com as concentrações baixa, média e alta, sendo 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL e 0,6 mg/mL, onde o valor para CV expresso resultou abaixo de 5% em todas as concentrações analisadas. Sendo assim, o método foi considerado preciso.

Tabela 3. Valores de repetitividade e precisão intermediária em suas respectivas concentrações 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL e 0,6 mg/mL, e o CV abaixo de 5%.

	Concentração (mg/mL)	CV%
Repetitividade	0,2	2,70
	0,4	3,01
	0,6	3,13
Precisão intermediária	0,2	0,67
	0,4	2,05
	0,6	4,76

Fonte: O autor

5.2.6 Exatidão

Os resultados obtidos das concentrações baixa, média e alta, sendo elas 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL e 0,6 mg/mL, conforme a Tabela 4, apresentaram resultados de CV abaixo de 5%, e a porcentagem de recuperação entre 95 e 105% conforme esperado para exatidão. Sendo assim, o método desenvolvido foi considerado exato.

Tabela 4. Valores de exatidão apresentados nas 3 faixas de concentração avaliadas, sendo elas 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL e 0,6 mg/mL.

Concentração (mg/mL)	CV%	% de recuperação
0,2	0,67	104,47
0,4	2,05	98,86
0,6	4,76	103,17

Fonte: O autor

5.2.7 Robustez

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5, onde podemos avaliar que o CV apresentou resultados abaixo de 5%, e a porcentagem de recuperação está dentro dos valores de recuperação aceitáveis em função da concentração do fármaco, entre 95 a 105% (Oliveira, Gaitani, 2019).

Isso indica que os resultados continuaram os mesmos, sem nenhum tipo de alteração, demonstrando que o método foi robusto em ambas as alterações realizadas, de temperatura de coluna e concentração de fase móvel (%).

Tabela 5. Valores representando a robustez das amostras nas concentrações de 0,4 mg/mL, em temperaturas de 22°C e 28°C, e fluxo de fase móvel (B) de 59% e 61%.

		CV%	Recuperação (%)
Temperatura da coluna	22°C	2,33	99,8939
	28°C	2,41	99,9405
Concentração de fase móvel	59%	2,59	100,3575
	61%	2,09	100,6485

Fonte: O autor

5.2.8 Estabilidade

Os resultados obtidos, conforme mostra a Tabela 6, apresenta o CV abaixo de 5%, e porcentagem de recuperação dentro dos valores aceitos, sendo esses entre 95 e 105%. Isso indicou que não houve alteração entre os resultados de teste obtido de soluções recentes e teste de solução exposta a temperatura ambiente por 24 h, resultando na estabilidade do analito e, portanto, o mesmo pode ser utilizado até 24h após realizado.

Tabela 6. Valores representando a estabilidade das amostras na concentração de 0,4 mg/mL.

Concentração (mg/mL)	CV%	Recuperação (%)
0,4	0,40	99,30

Fonte: O autor

5.2.9 Eficiência de incorporação

Os resultados obtidos para as amostras L1, L2 e L3 estão descritos na Tabela 7, onde os valores encontrados das amostras foram representados pela eficiência de incorporação indireta, sendo esses valores entre 82,90 e 95,16% para os compósitos.

Tabela 7. Tabela de eficiência de incorporação indireta das amostras de compósitos de HAp-LUT (L1, L2 e L3), com os valores da EI%.

Compósitos	EI%
L1	94,88
L2	95,16
L3	82,90

Fonte: O autor.

Os valores dos compósitos mostraram alta % de incorporação de LUT, sugerindo que a LUT incorporou nos poros da n-HAp adequadamente, sendo L2 o melhor valor encontrado. O compósito L3 apresentou menor % quando comparado a L1 e L2, provavelmente levando a saturação de incorporação dos poros de n-HAp devido a maior concentração de LUT dos compósitos.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DOS COMPÓSITOS HAP-LUT

5.3.1 Determinação do pH

A Tabela 8 representa os resultados de quatro amostras diferentes da n-HAp após a síntese, anterior ao processo de formação dos compósitos.

Tabela 8. Resultado do pH de quatro amostras analisadas após a síntese de n-HAp, sendo a média $9,03 \pm 0,02$.

Amostra	pH
1	9,05
2	9,00
3	9,03
4	9,05

Fonte: O autor.

A diminuição do pH da solução abaixo de 9 pode conduzir a uma formação da estrutura de HAp deficiente em íons de Ca^+ . E conforme Suryanarayanan, *et al.* (2021) retrata em estudo descrito anteriormente, pH 9 torna a HAp mais estável e estável em temperaturas acima de 1000°C . Sendo assim, a média entre os resultados encontrados de pH nas amostras de nanopartículas de HAp sintetizadas foi de $9,03 \pm 0,02$, valor mais comumente utilizado conforme mostram outros autores (Mondal, *et al.*, 2023).

5.3.2 Análises morfológicas e de superfície

5.3.2.1 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta.

Tabela 9. Diâmetro médio, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta de nanopartículas de hidroxiapatita (n-HAP, L0) e compósitos hidroxiapatita-luteolina (HAp-LUT - L1, L2 e L3).

Amostras	Diâmetro de partícula (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
L0	$406,4 \pm 1,70$	$0,728 \pm 1,34$	$-31,5 \pm 2,46$
L1	$263,4 \pm 1,42$	$0,679 \pm 0,38$	$-6,12 \pm 0,47$
L2	$388,9 \pm 1,73$	$0,613 \pm 2,32$	$-5,18 \pm 0,40$
L3	$846,5 \pm 2,82$	$0,884 \pm 1,90$	$-10,3 \pm 0,80$

Fonte: O autor.

Em relação ao diâmetro médio de partícula, foram registrados tamanhos que se enquadram na escala nanométrica, estando abaixo do valor de 1000 nm (EKER, *et al.*, 2024).

O alto IPD indicou uma distribuição mais heterogênea das partículas, sendo considerado resultado $\leq 0,5$ para maior grau de homogeneidade, sendo considerados monodispersos, e acima de 0,5 considera as partícula de natureza heterogênea (Delehedde, *et al.*, 2024).

Em relação ao potencial zeta, é geralmente negativo em pH alto e se torna cada vez mais positivo com a diminuição do pH, e seu valor absoluto fornece informação sobre a estabilidade elétrica da superfície da partícula. Para $|\zeta|$ acima de

± 30 mV, a alta carga elétrica que se forma causa forte força repelente, evitando maior agregação de partículas e consequentemente provendo um sistema de melhor estabilidade (Li, *et al.*, 2022; Collini, Jackson, 2023).

Os compósitos contendo a luteolina (L1, L2 e L3) apresentaram valores negativos próximos a 0, indicando a possibilidade de ocorrer a formação de partículas maiores devido a menor estabilidade do nanossistema, causando aglomeração de partículas (Collini, Jackson, 2023).

5.3.2.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-EC)

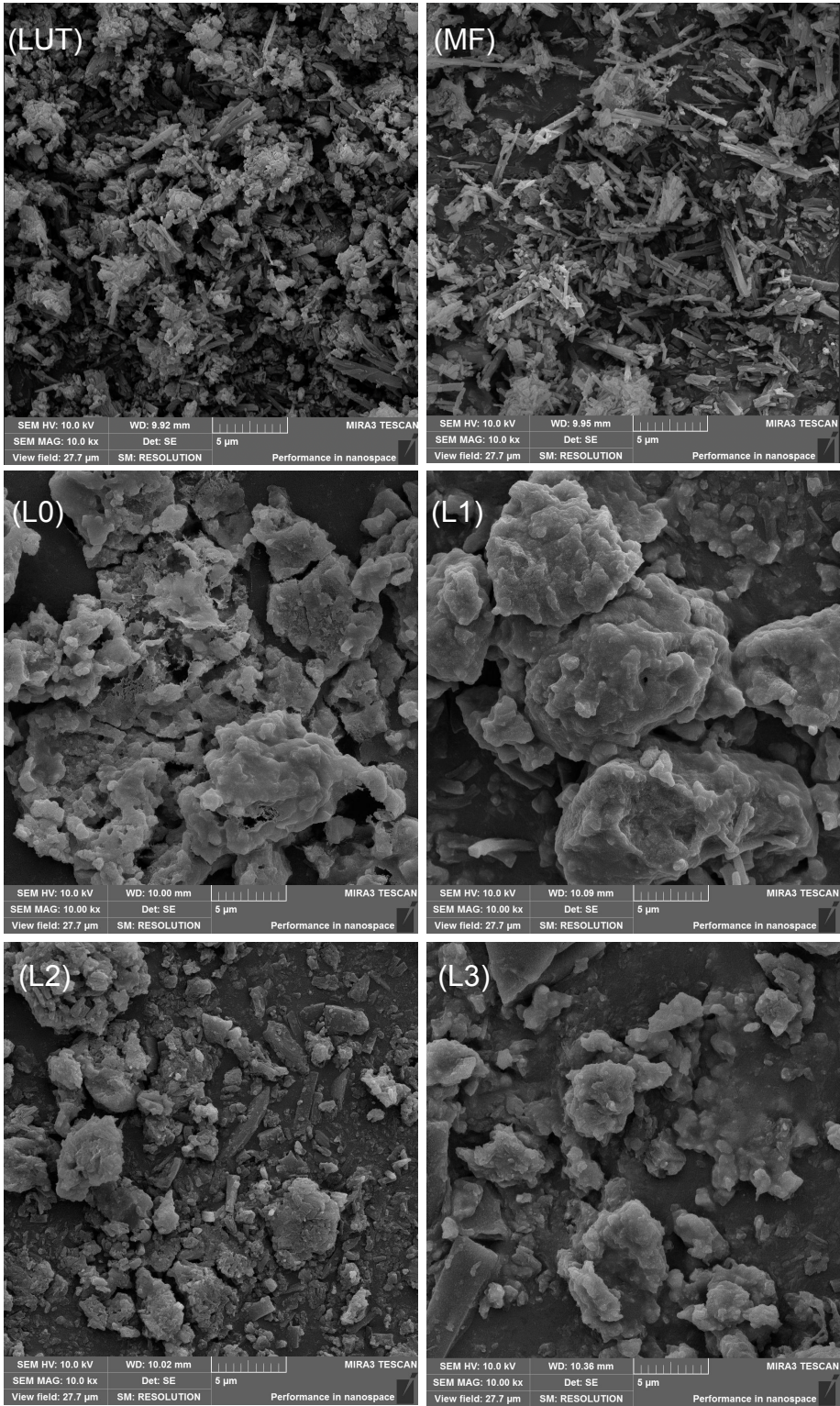
As fotomicrografias realizadas do fármaco puro (LUT), da n-HAp, da MF e dos compósitos HAp-LUT após secagem, estão representadas na Figura 10.

Em relação a LUT pura, foi possível observar que a mesma é organizada em estruturas aglomeradas, alongadas e de superfície lisa, como esperado e citado em literatura (Ding, *et al.*, 2024; Santos, *et al.*, 2022).

A análise da amostra de HAp obtida pelo método de precipitação apresentou nanopartículas aglomeradas e irregulares com rugosidades, semelhante a variedade morfológica de partículas citadas por outros autores (Wulandari, *et al.*, 2023; Florea, *et al.*, 2023; Pupo, *et al.*, 2022). A MF apresentou as estruturas alongadas de superfície lisa, e os compósitos HAp-LUT apresentaram principalmente aglomerados de partículas irregulares e estruturas alongadas de superfície lisa.

Estas imagens mostraram que o aglomerado de nanopartículas resultou em um sistema microestruturado obtido a partir do método de precipitação, indicando que devido a instabilidade elétrica da superfície, visualizada no potencial zeta, as partículas se aglomeraram após o preparo, garantindo assim a dimensão adequada para uso dérmico devido a alta superfície de contato para ativação de fibroblastos, evitando a opsonização por macrófagos.

Figura 10. Análise MEV-EC de luteolina (LUT) e mistura física (MF), compósitos de hidroxiapatita-luteolina L0, L1, L2 e L3, em aumento de 10.000x.

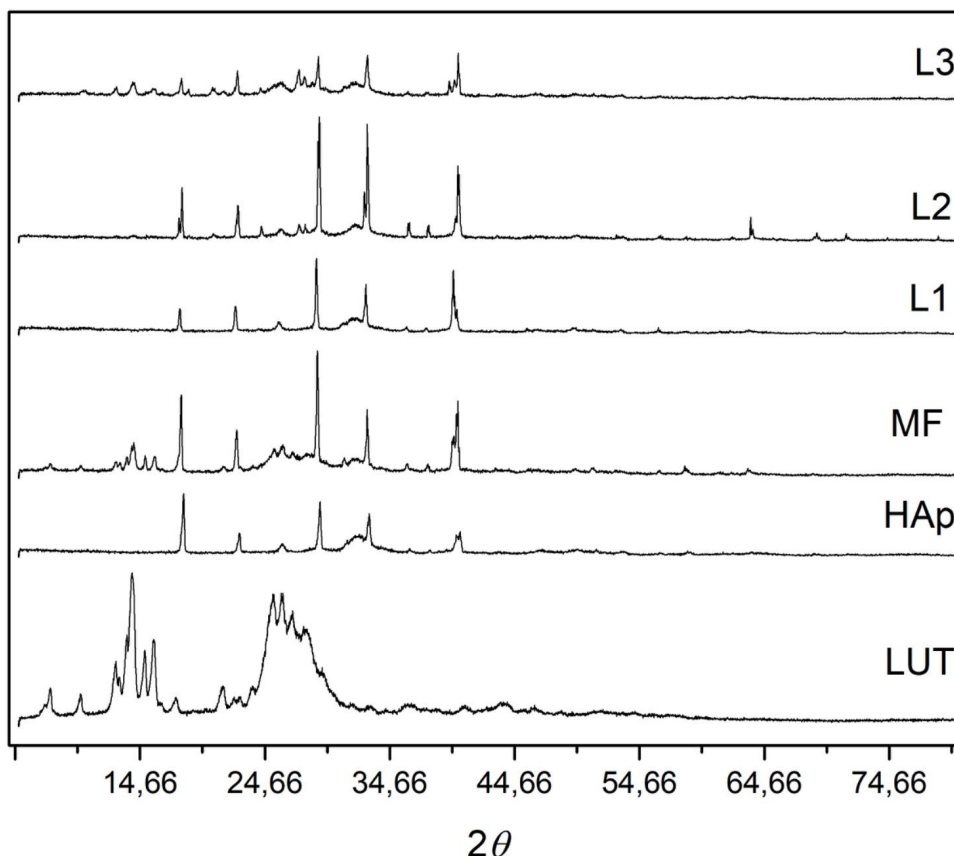


Fonte: O Autor.

5.3.2.3 Análise por difração de pó de raios X (DRX)

A Figura 11 resume os padrões da análise de DRX de LUT, n-HAP, MF e HAp-LUT.

Figura 11. Padrões de DRX de luteolina (LUT), nanopartículas de hidroxiapatita (HAp), mistura física (MF) e compósitos de nanopartícula de hidroxiapatita-luteolina (L1, L2 e L3).



Fonte: O autor.

O fármaco puro (LUT) apresentou picos de difração intensos nos ângulos de Bragg 2θ igual a $7,39^\circ$, $9,90^\circ$, $12,65^\circ$, $13,65^\circ$, $14,90^\circ$, $15,65^\circ$, $21,16^\circ$ e $26,41^\circ$, com vários picos de cristalinidade na região entre $20,16^\circ$ a $31,67^\circ$, semelhante aos picos observados também por outros autores (Santos, 2021; Wang, *et al.*, 2019), confirmando a estrutura cristalina dos flavonoides caracterizada por picos nítidos e bem definidos.

O padrão das nanopartículas de hidroxiapatita apresentou uma única fase cristalina, com picos característicos em $18,10^\circ$, $22,60^\circ$, $25,85^\circ$, $28,86^\circ$, $31,86^\circ$, $33,11^\circ$

e 40,12°, correspondendo à HAp encontrada na literatura (Pupo, *et al.*, 2019; Wulandari, *et al.*, 2023; Florea, *et al.*, 2023; Pupo, *et al.*, 2021).

A MF e os compósitos HAp-LUT demonstraram padrões de difração cristalinos semelhantes a n-HAp. Estes resultados indicam que o procedimento proporcionou uma diminuição notável dos picos de difração cristalina dos flavonoides, levando à amorfização do fármaco, onde a L2 apresenta picos melhores definidos tanto de LUT quanto HAp, quando comparado aos outros compósitos.

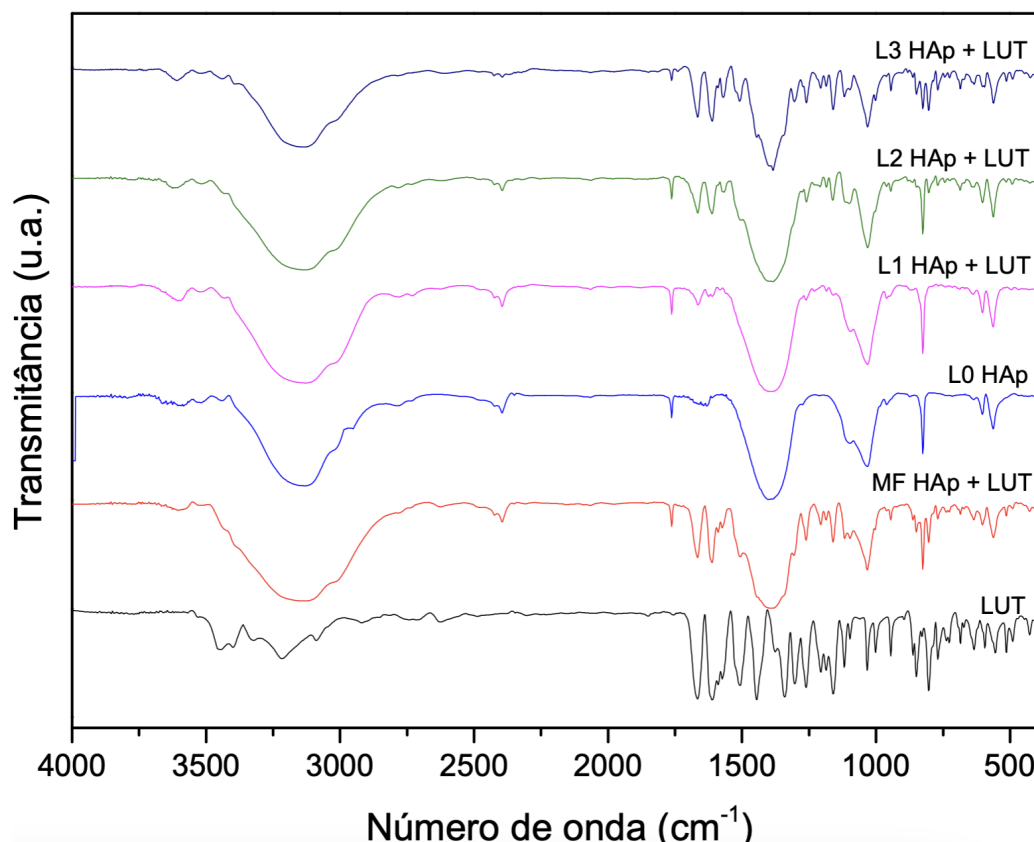
Devido a estrutura cristalina da LUT, sua incorporação no compósito pode mostrar diferença no grau de cristalinidade, ou formação de um polimorfo, levando a mudança na sua solubilidade e biodisponibilidade (Santos, 2021; Wang, *et al.*, 2019).

A preparação de compósitos contendo flavonoides como sólidos amorfos, quando comparado à estrutura cristalina original do fármaco, pode facilitar o processo de dissolução que é desejável principalmente porque os flavonoides apresentam baixa solubilidade em meio aquoso (Chiang, *et al.*, 2023).

5.3.3 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (IVTF)

A avaliação espectroscopia na região do infravermelho por transformada de fourier (IVTF) foi utilizada como ferramenta para determinar o tipo de interação entre LUT e HAp e a modificação na estrutura das partículas. Os espectros de IVTF da LUT, n-HAp, MF e os compósitos HAp-LUT estão representados na Figura 12.

Figura 12. Espectro IVTF de luteolina (LUT), mistura física (MF) e compósitos de nanopartícula de hidroxiapatita-luteolina (L0, L1, L2 e L3).



Fonte: O autor.

A LUT (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) é uma flavona do grupo dos flavonoides, e sua molécula contém três fragmentos principais – grupo hidroxila fenólicos, grupos hidroxila (O-H) e carbonila (C=O) (Santos, 2021; Rajhard, *et al.*, 2021; Ding, *et al.*, 2024). A LUT é representada com banda em 3420 cm^{-1} atribuída à vibração de alongamento do grupo O-H; bandas de absorção relacionadas ao estiramento do C=O em 1676 cm^{-1} , e do grupo hidroxila fenólico em 1280 cm^{-1} . A banda em 1157 cm^{-1} , está relacionada à vibração de estiramento do C-O-C, e a vibração de alongamento do grupo carbonila em 1661 cm^{-1} . Valores semelhantes foram encontrados por outros autores (Santos, *et al.*, 2022; Mehmood, *et al.*, 2022).

Os espectros de IVTF do n-HAp, MF e HAp-LUT mostraram padrões semelhantes. Bandas largas em 3432 e 1642 cm^{-1} foram atribuídas à água adsorvida, enquanto o pico agudo em 3570 cm^{-1} foi atribuído à vibração de estiramento dos íons OH^- da rede e o pico médio agudo em 631 cm^{-1} foi atribuído a vibração de O-H. As bandas características encontradas em 1457 , 1414 e 1416 cm^{-1} , representam o carbonato (CO_3^{2-}). Algumas bandas típicas para fosfato (PO_4^{3-})

apareceram em 440, 568, 602, 964, 1041 e 1093 cm^{-1} . Estas atribuições confirmam que estes produtos nanoparticulados foram sintetizados com sucesso e eram consistentes com HAp encontrada em literatura e por outros autores (Florea, *et al.*, 2023; Pupo, *et al.*, 2019; Wulandari, *et al.*, 2023; Pupo, *et al.*, 2021).

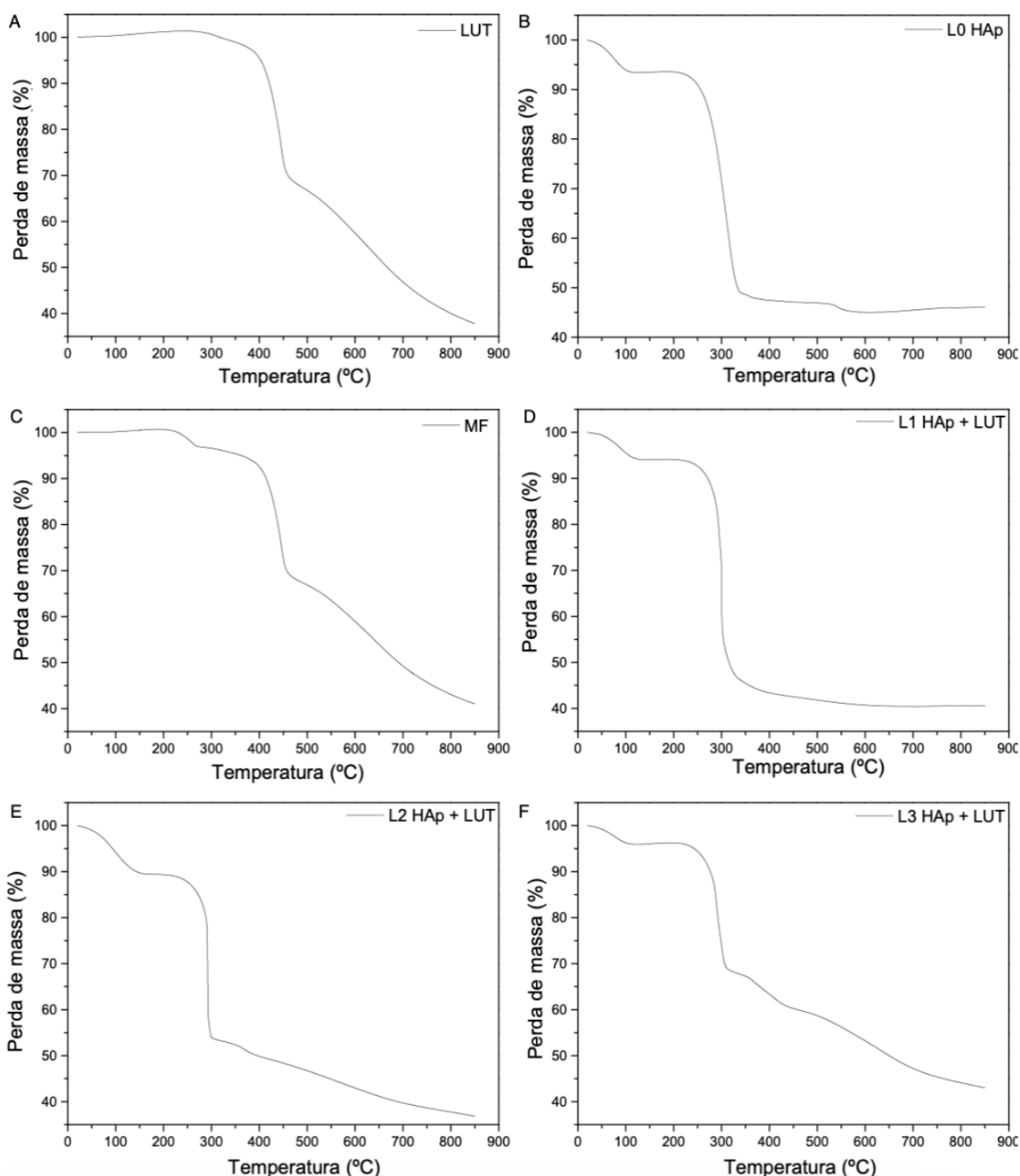
Os compósitos mostraram uma sobreposição dos sinais das matérias-primas isoladas e nenhuma banda nova foi evidenciada para estas formulações, indicando nesse sentido que nenhuma reação química ocorreu durante o processo de formação dos compósitos e, portanto, a LUT pode ser carregada pela HAp sem alterar sua liberação pelo sistema.

5.4 ANÁLISE TÉRMICA

5.4.1 Termogravimetria (TGA)

A Figura 13 resume as etapas de degradação térmica verificadas para LUT puro, MF, HAp-LUT e n-HAp.

Figura 13. Curvas TGA de luteolina (LUT), mistura física (MF) e compósitos de nanopartícula de hidroxiapatita-luteolina (L0, L1, L2 e L3), mostrando perda de massa (%) em relação a temperatura, de 20 a 850° C.



Fonte: O autor.

A Figura 13A demonstra a curva de estabilidade térmica ou a taxa de perda de massa para LUT, onde foi possível verificar que o fármaco possui radical fenol cuja estabilidade térmica é relativamente fraca. Duas etapas de degradação puderam ser vistas, apresentando perda de peso inicial em torno de 300 °C até um pouco antes de 450 °C, com perda de massa abrupta que segue até a total fusão do

composto. Valores semelhantes foram encontrados por outros autores (Mehmood, *et al.*, 2022; Zafar, *et al.*, 2023; Tawornchat, *et al.*, 2021).

A Figura 13B mostra a curva TGA das nanopartículas de HAp, com uma perda inicial em torno de 100 °C, provavelmente devido a vaporização das moléculas de água da amostra, e em sequência há uma perda abrupta em torno de 250 °C até um pouco mais de 325 °C, não havendo perda de massa significativa até a temperatura final de 850 °C. Valores semelhantes foram encontrados por outros autores com a HAp pura, sendo as amostras analisadas de microesferas (Wulandari, *et al.*, 2023). Uma possível diferença entre outros estudos pode-se dar devido a nanoestruturação das partículas, que pode levar a alteração de algumas características.

As Figuras 13C-F mostram os estudos TGA para MF (Figura 13C) e os compósitos HAp-LUT (Figuras 13D, E e F), demonstraram que a estabilidade térmica da LUT se mistura com a n-HAp, melhorando a estabilidade térmica nos compósitos, ocorrendo menor perda de massa conforme o aumento % de LUT total no compósito, sendo sua degradação semelhante da n-HAp, ocorrendo perda abrupta em torno de 300 °C. Com diferença apenas da MF (Figura 13C) mostrou uma primeira perda de massa em aproximadamente 200 °C. Apenas a L3 mostrou termograma semelhante a LUT, sugerindo que há excesso de fármaco na formulação deste compósito e, portanto, menos estabilidade térmica que os compósitos L1 e L2.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, a síntese das nanopartículas de hidroxiapatita ocorreu corretamente, e a incorporação de luteolina para formação dos compósitos HAp-LUT obteve sucesso de acordo com o método proposto.

O método analítico foi desenvolvido e validado de forma adequada, de acordo com o preconizado na RDC nº 166 da ANVISA (2017), e a avaliação de eficiência de incorporação mostrou eficiência de incorporação 81,50 e 95,46% para os compósitos de HAp-LUT.

As análises físico químicas apresentaram diâmetro médio de 263,4 a 846,5 nm, IPD de 0,613 a 0,884, e potencial zeta de -31,5 a -5,18 mV, indicando que os compósitos são de distribuição heterogênea e com baixa estabilidade elétrica, acarretando na formação de aglomerados de nanopartículas de tamanho micrométrico.

A análise morfológica e de superfície por MEV-EC apresentou os compósitos com formato irregular e rugosidades, e estruturas alongadas de superfície lisa. A análise DRX mostrou redução nos picos de cristalinidade com consequente amorfização do fármaco.

A análise estrutural por IVTF confirmou que não houve reação química entre LUT e HAp, indicando que a HAp pode servir como carreador de LUT sem interferir em sua liberação. E o TGA apresentou melhora da estabilidade térmica dos compósitos.

Assim, conclui-se que o compósito L2 apresentou características físico químicas, morfológicas e térmicas mais adequadas para continuidade dos estudos. Contudo, faz-se necessário estabelecer perfil de liberação do fármaco, assim como seu potencial citotóxico, para garantir sua segurança e eficácia para uso como bioestimulador de colágeno.

REFERÊNCIAS

AGHAKHANI, S.; ZERROUK, N.; NIARAKIS, A. Metabolic Reprogramming of Fibroblasts as Therapeutic Target in Rheumatoid Arthritis and Cancer: Deciphering Key Mechanisms Using Computational Systems Biology Approaches. **Cancers**, v. 13, n. 1, p. 35, Jan, 2021.

AGUILAR-HERNÁNDEZ, G.; *et al.* Nanosuspensions as carriers of active ingredients: Chemical composition, development methods, and their biological activities. **Food Research International**, v. 174, Volume 174, part 1, e113583, Dec, 2023.

ALMEIDA, E.P.M.; LEVY, F.M.; BUZALAF, M.A.R. “RichBlend” protocol for full-face filling and collagen biostimulation. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 71, e20230014, 2023.

AMIN, R; *et al.* Effects of a leave-on product on the strength of the dermoepidermal junction: An exploratory, intraindividual, randomized controlled trial in older adults with dry skin. **Health Science Reports**, v. 7, n. 3, e1985, 2024.

AMORIM, M.O.; *et al.* Synthesis and characterization of niobium-doped fish scale-derived hydroxyapatite by physical ultrasound interference. **Cerâmica**, v. 67, n. 381, p. 23–27, Jan/ Mar, 2021.

AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. Tokyo: Japanese Association of Apatite Science - JAAS, 1991. 214p.

ARAB, S.; *et al.* On the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells by a fabricated porous nano-hydroxyapatite substrate loaded with sodium fluoride. **BMC Oral Health**, v. 14, n. 24, e1218, Oct, 2024.

ARARUNA, F.B.; *et al.* Nanopartículas de prata à base de amido de mesocarpo do babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng.): características e potencialidade. In: PEÑA, A.V. **Tópicos em ciências da saúde**. Nova Xavantina: Pantanal Editora, 2020. p. 16-41.

AZULAY, R.D. **Dermatologia**, 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Applications of the Neutral Red Cytotoxicity Assay to *In Vitro* Toxicology. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 18, p. 129–144, 1990.

BANGAR, S.P.; *et al.* Luteolin: A flavone with myriads of bioactivities and food applications. **Food Bioscience**, v. 52, 102366, Apr, 2023.

BARBOSA, J.N.; VASCONCELOS, D.P. Handbook of Biomaterials Biocompatibility - Chapter 3: Macrophage response to biomaterials. **Biomaterials**, p. 43-52, 2020.

BASF. Personal Care and Nutrition GmbH: Scientific Illustrations, Mar, 2015. Disponível em: <<https://www.personal-care.basf.com/news-media/news-releases/>>

news-detail/2015/03/02/cross-section-of-the-skin#:~:text=The%20dermal%20epidermal%20junction%20is,mechanical%20support%20for%20the%20epidermis>. Acesso em: 28 de outubro de 2024.

BONIN, A.C.R. **Bioestimuladores de Colágeno Hidroxiapatita de Cálcio**. Monografia (pós graduação). São Paulo, SP: Faculdade Sete Lagoas, 2019.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Resolução **RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<https://www.in.gov.br>>. Acesso em: 13 de março de 2024.

BROWN, T.L.; *et al.* Dermal appendage-dependent patterning of zebrafish *atoh1a*+ Merkel cells. **eLife**, v. 12, e85800, Jan, 2023.

BUSANELLO-COSTA, M.; *et al.* Benefits of Epidermal Growth Factor (EGF) associated with LED photobiomodulation therapy in tissue repair of skin wounds. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e9909109369, Oct, 2020.

CAMARGO, G.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, 2020.

CEDILLO-CORTEZANO, M.; *et al.* Use of Medicinal Plants in the Process of Wound Healing: A Literature Review. **Pharmaceuticals**, v. 17, p. 303, Feb, 2024.

CHEN, J.; *et al.* Macrophage Polarization Related to Biomimetic Calcium Phosphate Coatings: A Preliminary Study. **Materials**, v. 16, ed. 1, p. 332, 2023.

CHIANG, C.W.; *et al.* Development of an Amorphous Solid Dispersion Formulation for Mitigating Mechanical Instability of Crystalline Form and Improving Bioavailability for Early. **Molecular Pharmaceutics**, v. 20, n. 5, Apr, 2023.

CHUGAEVA, U.Y.; *et al.* Effects of L-ascorbic acid (C₆H₈O₆: Vit-C) on collagen amino acids: DFT study. **Amino Acids**, v. 55, p. 1655–1664, Oct, 2023.

COHEN, S.R.; *et al.* Radiessse rescue: A preliminary study for a simple and effective technique for the removal of calcium hydroxyapatite-based fillers. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 43, n. 3, p. 365–369, 2023.

COLLINI, H.; JACKSON, M.D. Zeta potential of crude oil in aqueous solution. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 320, 102962, Oct, 2023.

CONTI, P.; *et al.* Powerful anti-inflammatory action of luteolin: Potential increase with IL-38. **BioFactors**, v. 47, p. 165–169, 2021.

CORBIN, N.; *et al.* Statistical analyses of motion-corrupted MRI relaxometry data computed from multiple scans. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 398, 109950, Oct, 2023.

CORDUFF, N.; *et al.* Pan-Asian Consensus on Calcium Hydroxyapatite for Skin Biostimulation, Contouring, and Combination Treatments. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 14, n. 8, p. E76-E85, Aug, 2021.

COSTA, W.B.; *et al.* Polysaccharide Hydroxyapatite (Nano)composites and Their Biomedical Applications: An Overview of Recent Years. **ACS Omega**, v. 2, ed. 9, n. 28, p. 30035-30070, Jul, 2024.

DELEHEDDE, C.; *et al.* Enhancing natural killer cells proliferation and cytotoxicity using imidazole-based lipid nanoparticles encapsulating interleukin-2 mRNA. **Molecular Therapy Journal**, v. 35, n. 3, 102264, set, 2024.

DINIZ, R.A.; *et al.* Atividade antitumoral e inibitória de topoisomerase II- α humana do flavonoide luteolina isolado de *Prosopis juliflora*. **Research Society and Development**, v. 11, n. 5, e47811528220, Abr, 2022.

DING, Z.; *et al.* Characterisation of spray dried microencapsules with amorphous lutein nanoparticles: Enhancement of processability, dissolution rate, and storage stability. **Food Chemistry**, v. 383, 132200, Jul, 2022.

DING, L.; *et al.* Improved anti-cancer effects of luteolin@ZIF-8 in cervical and prostate cancer cell lines. **Heliyon**, v. 10, n. 6, e28232, Mar, 2024.

EKER, F.; *et al.* A Comprehensive Review of Nanoparticles: From Classification to Application and Toxicity. **Molecules**, v. 29, n. 15, p. 3482, 2024.

ELMOWAFY, M.; *et al.* Influence of Stabilizer on the Development of Luteolin Nanosuspension for Cutaneous Delivery: An In Vitro and In Vivo Evaluation. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1812, Oct, 2021.

EPPLEY, B.L.; *et al.* Effects of a positively charged biomaterial for dermal and subcutaneous augmentation. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 18, p. 413–416, 1994.

FEITOSA, P.W.G.; *et al.* Endogenous synthesis of collagen and its relation to aging: A systematic review. **ID on line Revista de psicologia**, v. 16, n. 60, p. 495-514, Mai, 2022.

FERREIRA, A.S.; *et al.* Suplementação de colágeno e outras formas de tratamento no combate ao envelhecimento cutâneo. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v.12, e4653, 2020.

FERREIRA, M.S.S.; *et al.* Análise clínica e histológica de feridas cirúrgicas de cadelas tratadas com um composto fitoterápico de *Calendula officinalis*, *Aloe vera*, *Symphytum officinale* L., *Vitis vinifera*, D-Pantenol e Benzoato de Denatônio. **Medicina Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 8–17, Abr, 2022.

FERREIRA, V.E.N.; FERREIRA, V.R. Nanotecnologia e medicamentos: a necessidade de uma regulamentação jurídica brasileira para a proteção do direito fundamental à saúde. **Revista Thesis Juris**, v. 11, n. 2, p. 297-324, Jul/ Dez, 2022.

FEYNMAN, R. There's plenty of room at the bottom. *In*: HEY, A. **Feynman and computation (e-book)**: Part 2. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2019. p. 22-36.

FLOREA, A.D.; *et al.* Remineralization Induced by Biomimetic Hydroxyapatite Toothpastes on Human Enamel. **Biomimetics**, v. 8, n. 6, p. 450, Sep, 2023.

FUJII, K.K.; *et al.* The Thermal Stability of the Collagen Triple Helix Is Tuned According to the Environmental Temperature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2040, Feb, 2022.

GALEGO, F.I.F. **Contributo para o design de formas farmacêuticas: polimorfismo e co-cristais do flavonoide Luteolina**. Dissertação (mestrado) - Universidade de Coimbra: Coimbra, Portugal, 2014.

GENDRISCH, F.; *et al.* Luteolin as a modulator of skin aging and inflammation. **BioFactors**, v. 47, p. 170–180, Dec, 2020.

GUEDES, C.P.; LIMA, M.E.M.; DANTAS, L.A. Os desafios da nanotecnologia em medicamentos. *In*: PESSOA, D.L.R. **Farmácia: fronteiras na pesquisa e desenvolvimento**. Ponta Grossa: Atena, 2024. p. 37-50.

GUIDA, S.; GALADARI, H. A systematic review of Radiessse/calcium hydroxylapatite and carboxymethylcellulose: evidence and recommendations for treatment of the face. **International Journal of Dermatology**, v. 63, p. 150-160, 2024.

HADDAD, S.; *et al.* Evaluation of the biostimulatory effects and the level of neocollagenesis of dermal fillers: a review. **International Journal of Dermatology**, v. 61, p. 1284–1288, 2022.

HALPER, J. Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Elastin, Fibrillins, Fibulins, Matrilins, Tenascins and Thrombospondins. *In*: HALPER, J. **Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases**: Advances in Experimental Medicine and Biology. 2. ed. vol 1348. Switzerland: Springer, 2021. p. 105-126.

HARRIS, M.I.N.C. *Pele: do nascimento à maturidade*. São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2016.

HARTATIEK, H.; *et al.* Effect of Aging Time and Sonication Treatment on Hydroxyapatite Structure from Limestone. **Applied Mechanics and Materials**, v. 915, p. 3-9, Aug, 2023.

HASHIM, I.A. Blood gases and acid-base homeostasis. *In*: HASHIM, I.A. **Tutorials in Clinical Chemistry**. Elsevier, 2024. p. 419-438.

HE, T.; *et al.* Age-related changes in dermal collagen physical properties in human skin. **Plos One**, v. 18, n. 12, e0292791, Dec, 2023.

HIRATA, Y.; *et al.* Endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of procollagen III via conventional vesicular and tubular carriers. **Molecular Biology of the Cell**, v. 33, n.3., ar21, Mar, 2022.

HUANG, L.; KIM, M.Y.; CHO, J.Y. Immunopharmacological Activities of Luteolin in Chronic Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2136, Jan, 2023.

INAM, H.; *et al.* Magnetic Hydroxyapatite Nanoparticles in Regenerative Medicine and Nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 28, ed. 25, n. 5, 2809, Feb, 2024.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Harmonised guideline: validation of analytical procedures Q2(R2)**. Final version, Nov, 2023.

ISHIKAWA, Y.; *et al.* Local Net Charge State of Collagen Triple Helix Is a Determinant of FKBP22 Binding to Collagen III. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 20, p. 15156, Oct, 2023.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica, texto e atlas (e-book)**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

KARGOZAR, S.; *et al.* Hydroxyapatite Nanoparticles for Improved Cancer Theranostics. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 13, n. 3, e100, Jul, 2022.

KARIMI, N. Approaches in line with human physiology to prevent skin aging. **Frontiers in Physiology**, v. 14, e1279371, Oct, 2023.

KAVASI, R.M.; *et al.* In Vitro Biocompatibility Assessment of Nano-Hydroxyapatite. **Nanomaterials**, v. 28, ed. 28, n. 5, 1152, Apr, 2021.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2021.

KNOX, C.; *et al.* **DrugBank 6.0: the DrugBank Knowledgebase for 2024**. Nucleic Acids Research, v. 52, D1, DB15584, Jan, 2024. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB15584>>. Acesso em: 8 de abril de 2024.

KONIUCH, N; *et al.* Structure of polymeric nanoparticles encapsulating a drug - pamoic acid ion pair by scanning transmission electron microscopy. **Heliyon**, v. 9, n. 6, e16959, 2023.

LEE, J.H.; PARK, J.; SHIN, D.W. The Molecular Mechanism of Polyphenols with Anti-Aging Activity in Aged Human Dermal Fibroblasts. **Molecules**, v. 27, n. 14, p. 4351, Jul, 2022.

LI, M.; *et al.* Macrophage polarization plays roles in bone formation instructed by calcium phosphate ceramics. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, ed. 9, p. 1863-1877, Jan, 2020.

LI, Z.; *et al.* Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. **Biogerontology**, v. 22, n. 2, p. 165-187, Apr, 2021.

LI, Z.; *et al.* Effect of maltodextrin on the oxidative stability of ultrasonically induced soybean oil bodies microcapsules. **Frontiers of Nutrition**, v. 30, n. 9, 1071462, Nov, 2022.

LIN, J.; EPEL, E. Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 73, 101507, Jan, 2022.

LIU, Y.C.; TSAI, M.F.; CHEN, Y.F. Near Complete Recovery of Visual Acuity After Calcium Hydroxylapatite Injection–Related Vision Loss: A Case Report and Literature Review. **Annals of Plastic Surgery**, v. 84, n. 1 Jan, 2020.

LOPES, C. S. **Síntese e caracterização da hidroxiapatita porosa obtida pela adição de amido**. 2020. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia de Materiais) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2020.

MANZOOR, M.F.; *et al.* Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, e12974, Apr, 2019.

MARUCCI, G.; *et al.* The possible role of the nucleoside adenosine in countering skin aging: A review. **BioFactors**, v. 48, n. 5, p.1027-1035, Aug, 2022.

MCGRATH, J.A.; UITTO, J. Foundations of Dermatology: Structure and Function of the Skin. *In*: GRIFFITHS, C.E.M.; *et al.* **Rook's Textbook of Dermatology - 4 Volume Set**. 10. ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2024. p. 1-50.

MEHMOOD, S; *et al.* Study on synthesis of cross-linked poly(cyclotriphosphazene-co-luteolin) nanospheres and their properties for controlled drug delivery. **Colloid and Polymer Science**, v. 300, p. 861-871, Jun, 2022.

MELO, F.; *et al.* Minimally Invasive Aesthetic Treatment of the Face and Neck Using Combinations of a PCL-Based Collagen Stimulator, PLLA/PLGA Suspension Sutures, and Cross-Linked Hyaluronic Acid. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 5, n. 13, p. 333-344, May, 2020.

MONDAL, S.; *et al.* Hydroxyapatite: A journey from biomaterials to advanced functional materials. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 321, e103013, Nov, 2023.

MOREIRA, T.D.; *et al.* New insights into biomaterials for wound dressings and care: Challenges and trends. *In*: CAPP, E.; NIENOV, O.H. **Progress in Organic Coatings**, v. 187, e108118, Feb, 2024. p. 203-204.

MOREIRA, M.S.; *et al.* Regressão linear simples e múltipla. **Bioestatística quantitativa aplicada**. Porto Alegre: UFRS, 2020.

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

NADAL, J.M., *et al.* **Desenvolvimento tecnológico, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo* de compósito de hidroxiapatita e capsaicina para uso em géis clareadores dentais**. Tese (Pós Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2022.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 5280445, Luteolin**, Apr, 2024. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Luteolin>>. Acesso em: 8 de abril de 2024.

NECA, C.S.M.; *et al.* O uso de bioestimuladores de colágeno à base de hidroxiapatita de cálcio. **e-Acadêmica**, v. 3, n. 2, e7332237, 2022.

NOVELLA, I.; *et al.* The Influence of Polyvinyl Alcohol Porogen Addition on the Nanostructural Characteristics of Hydroxyapatite. **Materials**, v. 16, n. 18, p. 6313, 2023.

NOWAG, B.; *et al.* Calcium hydroxylapatite microspheres activate fibroblasts through direct contact to stimulate neocollagenesis. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 22, p. 426-432, Dec, 2022.

OCHOA, S.L.; LARA, W.O.; BELTRÁN, C.E.G. Hydroxyapatite Nanoparticles in Drug Delivery: Physicochemistry and Applications. **Pharmaceutics**, v. 9, ed. 13, n. 10, 1642, Oct, 2021.

OLIVEIRA, A.R.M.; GAITANI, C.M. **Controle de qualidade**. 1ª Edição, Rio de Janeiro: Atheneu, 2019. v. 11. (e-book) 20.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Tópicos de Saúde: Envelhecimento e saúde**. Genebra: OMS, 2022.

PUPO, Y.M.; *et al.* Effect of hydroxyapatite morphology and quaternary ammonium polymer co-inclusion on bond strength, cytotoxicity, and cell morphology of self-etching adhesive. **International Journal of Adhesion and Adhesives**. v. 92, p. 7-15, 2019.

PUPO, Y.M.; *et al.* Effect of hydroxyapatite microspheres, amoxicillin–hydroxyapatite and collagen–hydroxyapatite composites on human dental pulp-derived mesenchymal stem cells. **Materials**, v. 14, n. 24, e7515, Dec, 2021.

PUSHPALATHA, C.; *et al.* Nanohydroxyapatite in dentistry: A comprehensive review. **The Saudi Dental Journal**, v. 7, ed. 35, n. 6, p. 741–752, Jun, 2023.

QUAN, T. Molecular insights of human skin epidermal and dermal aging. **Journal of Dermatological Science**, v. 112, e. 2, p. 48-53, Nov, 2023a.

QUAN, T. Human skin aging and the anti-aging properties of retinol. **Biomolecules**, v. 13, n. 11, p. 1614, Nov, 2023b.

RAFIE, S.M.M; NORDIN, D. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticle. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 136-148, 2017.

RAJHARD, S.; *et al.* Solubility of luteolin and other polyphenolic compounds in water, nonpolar, polar aprotic and protic solvents by applying FTIR/HPLC. **Processes**, v. 9, n. 11, p. 1952, Oct, 2021.

RAMALHO, K.A. **Uso do ácido hialurônico no sulco nasogeniano**. Trabalho de conclusão de curso (Pós graduação em Harmonização Orofacial) - Faculdade Sete Lagoas, Santos, 2021.

REGIS, L.H.V.; SILVA, A.F.; GUEDES, J.P.M. Nanotecnologia em fármacos no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, e32101522294, Nov, 2021.

REPETTO, G.; PESO, A.D.; ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ citotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008.

ROCCHETTI, M.T.; *et al.* Multi-Faceted Role of Luteolin in Cancer Metastasis: EMT, Angiogenesis, ECM Degradation and Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 8824, May, 2023.

SANTOS, A.E. **Micronização da luteolina utilizando o processo gas antisolvent: Caracterização das partículas e determinação da solubilidade e dissolução**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

SANTOS, A.E; *et al.* Micronization of luteolin using supercritical carbon dioxide: Characterization of particles and biological activity in vitro. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 181, e105471, 2022.

SHINDO, Y.; *et al.* Enzymic and Non-Enzymic Antioxidants in Epidermis and Dermis of Human Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, ed. 1, p. 122-124, Jan, 1994.

SILVA, K.L.D.; *et al.* Preparation and Characterization of a Novel Hydroxyapatite-Capsaicin Composite Intended for the In-Office Dental Bleaching Use. **Preprints**, 2024061197, June, 2024.

SREEDHAR, A.; AGUILERA-AGUIRRE, L.; SINGH, K.K. Mitochondria in skin health, aging, and disease. **Cell Death & Disease**, v. 11, article n. 444, 2020.

SURYANARAYANAN, V.; *et al.* Electrochemical mineralization of iron-tannate stain on HAp and bovine enamel-A non-peroxide approach. **Heliyon**, v. 7, n. 6, e07296, Jun, 2021.

SZALAY, S.; WERTZ, P.W. Protective Barriers Provided by the Epidermis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3145, Feb, 2023.

TAWORNCHAT, P.; *et al.* Polymerized Luteolin Nanoparticles: Synthesis, Structure Elucidation, and Anti-Inflammatory Activity. **ACS Omega**, v. 6, n. 4, Jan, 2021.

THEOHARIDES, T.C. Luteolin: The wonder flavonoid. **BioFactors**, v. 47, p. 139-140, Apr, 2021.

TRICARICO, P.M.; *et al.* Aquaporins Are One of the Critical Factors in the Disruption of the Skin Barrier in Inflammatory Skin Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 4020, Apr, 2022.

TSUCHIDA, K.; KOBAYASHI, M. Oxidative stress in human facial skin observed by ultraweak photon emission imaging and its correlation with biophysical properties of skin. **Scientific Reports**, v. 10, article 9626, Jun, 2020.

VIANA, J.R.; *et al.* Análise comparativa da síntese de hidroxiapatita via estado sólido. **Revista Matéria**, v. 25, n. 1, e-12588, 2020.

WANG, C.; *et al.* Emerging nanotechnological approaches to regulating tumor vasculature for cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 362, p. 647-666, Oct, 2023.

WANG, L.; *et al.* Preparation and characterization of luteolin nanoparticles for enhance bioavailability and inhibit liver microsomal peroxidation in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 57–64, 2019.

WANG, M.; *et al.* Multi-wavelength spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water by oxidative coloration of ABTS via Fenton reaction. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 27063–27072, Jul, 2019.

WANG, X.; *et al.* Effects of lutein particle size in embedding emulsions on encapsulation efficiency, storage stability, and dissolution rate of microencapsules through spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 146, p. 111430, Jul, 2021.

WARRAICH, U.; HUSSAIN, F.; KAYANI, H.U.R. Aging - Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. **Biochemistry, Molecular and Cell Biology**, v. 6, n. 5, e04107, May, 2020.

WISHART, D.S.; *et al.* **HMDB 5.0**: The Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. D1, HMDB 05800, Mar, 2022. Disponível em:

<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0005800#biological_properties>. Acesso em: 8 de abril de 2024.

WU, S.C.; *et al.* Enhancing Bioactivity and Mechanical Properties of Nano-Hydroxyapatite Derived from Oyster Shells through Hydrothermal Synthesis. **Nanomaterials (Basel)**, v. 30, ed. 14, n. 15, e1281, Jul, 2024.

WULANDARI, W.; *et al.* The Effect of Alginate Concentration on Crystallinity, Morphology, and Thermal Stability Properties of Hydroxyapatite/Alginate Composite. **Polymers**, v. 15, n. 3, p. 614, Jan, 2023.

ZAFAR, A.; *et al.* Bioactive Luteolin Entrapped Chitosan-PLGA Nanoparticles: Formulation Optimization to In-Vivo Preclinical Evaluation. **Journal of Cluster Science**, v. 34, p. 437-449, 2023.

ZARGARAN, D.; *et al.* Facial skin ageing: Key concepts and overview of processes. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 44, n. 4, p. 414-420, Aug, 2022.

ZERBINATI, N.; *et al.* Investigation on the Biological Safety and Activity of a Gluconolactone-Based Lotion for Dermocosmetic Application. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 5, pg. 655, 2023.

ZHANG, J.; *et al.* Aging in the dermis: Fibroblast senescence and its significance. **Aging Cell**, v. 23, n. 2, e14054, Feb, 2024.

ZULKIFLI, M.Z.A.; *et al.* Synthesis of Polycaprolactone-Hydroxyapatite (PCL-HA) biodegradable nanofibres via an electrospinning technique for tissue engineering scaffolds. **Jurnal Kejuruteraan**, v. 33, n. 4, p. 935-941, Nov, 2021.