



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

LUÍSA MIOTTO BORELLI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES
DE MIRISTATO DE ISOPROPILA CONTENDO ASTAXANTINA PARA
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Araraquara, SP

2023

LUÍSA MIOTTO BORELLI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES
DE MIRISTATO DE ISOPROPILA CONTENDO ASTAXANTINA PARA
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

Coorientadora: Stéphanie Rochetti do Amaral

Araraquara, SP

2023

B731d Borelli, Luísa Miotto.
Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões de
miristato de isopropila contendo astaxantina para aplicações
biotecnológicas / Luísa Miotto Borelli. – Araraquara: [s.n.], 2023.
38 f. : il.

Orientador: Fernando Lucas Primo.
Coorientadora: Stéphanie Rochetti do Amaral.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Nanotecnologia. 2. Nanoemulsão. 3. Astaxantina. 4. Miristato
de isopropila. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Amaral,
Stéphanie Rochetti do, coorient. III. Título.

RESUMO

Dentro da nanotecnologia, as nanoemulsões (NE) ganham destaque atuando como veículos de compostos ativos e sistemas de liberação controlada, possuindo a capacidade de melhorar o direcionamento, a permeabilidade e a retenção de ativos e de fármacos. As NE apresentam várias características favoráveis a aplicações na farmácia e medicina, podendo melhorar a biodisponibilidade e estabilidade de drogas. Neste trabalho, a intenção foi o desenvolvimento de nanoemulsões carregadas com astaxantina de origem biotecnológica (ATX), pigmento antioxidante com propriedades interessantes para aplicação em diversas áreas da saúde. Como núcleo lipofílico alternativo, foi utilizado miristato de isopropila, um éster biocompatível. Os nanomateriais desenvolvidos foram caracterizados através da medida de espalhamento dinâmico de luz (DLS), e os resultados mostraram uma NE vazia, para fins comparativos, com tamanho elevado (quase 500 nm) e monodispersa ($PDI < 0,25$), e de uma NE incorporada com ATX de excelente tamanho (≤ 100 nm), porém com característica polidispersa ($PDI > 0,95$), ambas com potencial Zeta < -30 mV, que é um indicativo de estabilidade das formulações. Através do método espectroanalítico desenvolvido, foram observadas a manutenção dos perfis 2D e 3D de emissão de fluorescência entre as amostras da ATX livre e nanoencapsulada, bem como obtidas imagens e gráficos 3D pertinentes. A curva espectroanalítica da mesma foi obtida na ordem de 0,993, através da qual foi realizada quantificação da ATX incorporada na NE, que evidenciou uma taxa de incorporação de 6,964%. Por fim, o ensaio de citotoxicidade realizado com células de fibroblastos murinos (3T3-NIH) indicou citotoxicidade nas amostras de ATX livre e biocompatibilidade nas amostras de NE/ATX, através da análise das diferenças estatísticas significativas. Os resultados, no entanto, também mostraram viabilidades maiores que 100% e desvios um pouco altos, demonstrando a necessidade da realização de novas análises. Dessa forma, os resultados, apesar de evidenciarem algumas limitações da ATX, relacionadas à sua incorporação, que poderiam ser corrigidas aperfeiçoando-se a metodologia, mostraram-se promissores para o desenvolvimento de pesquisas futuras na área.

Palavras-chave: Nanotecnologia, nanoemulsão, astaxantina, miristato de isopropila.

ABSTRACT

Within nanotechnology, nanoemulsions (NE) are highlighted acting as vehicles of active compounds and controlled release systems, having the ability to improve targeting, permeability and retention of actives and drugs. EN have several characteristics favorable to applications in pharmacy and medicine, and can improve the bioavailability and stability of drugs. In this work, the intention was the development of empty and loaded nanoemulsions with astaxanthin of biotechnological origin (ATX), an antioxidant pigment with interesting properties for application in several areas of health. As an alternative lipophilic core, isopropyl myristate, a biocompatible ester, was used. The developed nanomaterials were characterized by measuring dynamic light scattering (DLS), and the results showed an empty NE with high size (almost 500 nm) and monodisperse ($PDI < 0.25$), and an NE incorporated with ATX of excellent size (≤ 100 nm), but with a polydisperse characteristic ($PDI > 0.95$), both with Zeta potential < -30 mV, which is indicative of stability of the nanoemulsions. Through the developed spectroanalytical method, the maintenance of the 2D and 3D fluorescence emission profiles between free and nanoencapsulated ATX samples was observed, as well as obtained pertinent 3D images and graphics. Its standard calibration curve was obtained in the order of 0.993, through which quantification of the ATX incorporated in the NE was carried out, which showed an incorporation rate of 6.964%. Finally, the cytotoxicity assay performed with murine fibroblast cells (3T3-NIH) indicated cytotoxicity in free ATX samples and biocompatibility in NE/ATX samples, through the analysis of statistically significant differences. The results, however, also showed viability greater than 100% and somewhat high deviations, demonstrating the need for further analysis. Thus, the results, despite showing some limitations of ATX, related to its incorporation, which could be corrected by improving the methodology, showed to be promising for the development of future research in the area.

Keywords: Nanotechnology, nanoemulsion, astaxanthin, isopropyl myristate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação do perfil de liberação entre sistemas convencionais e sistemas de liberação controlada de fármacos.	11
Figura 2 - Tipos de nanocarreadores, dispostos na ordem cronológica. NLS = nanocarreador lipídico sólido; CLN = carreador lipídico nanoestruturado.	11
Figura 3 - Representação esquemática de gotícula de nanoemulsão O/A.	13
Figura 4 - Estrutura química da astaxantina - ATX.	15
Figura 5 - Tamanho do mercado de astaxantina, por produto, de 2016 a 2027 em milhões de dólares.	16
Figura 6 - Modelo esquemático da metodologia de síntese das NE/ATX.	20
Figura 7 - Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho de partículas, Pdl e potencial Zeta em função do tempo para NE/ATX.	24
Figura 8 - Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho de partículas, Pdl e potencial Zeta em função do tempo para NE vazia.	25
Figura 9 - Espectro de absorção da Astaxantina livre em diferentes concentrações, variando de 5-40 µg/mL.	27
Figura 10 - Curva padrão de calibração da Astaxantina livre em 490 nm, correlacionando a concentração e a absorbância, com equação de reta de $y = 0.0196x + 0.0107$ e $R^2 = 0,9993$.	27
Figura 11 - Comparação entre os espectros 2D de emissão de fluorescência da ATX em sua forma livre (ATX livre) e dentro da NE (ATX/NE), com excitação em 490 nm e emissão variando de 520 a 650 nm.	29
Figura 12 - Gráfico 3D de espectroscopia de fluorescência de ATX livre em metanol.	30
Figura 13 - Gráfico 3D de espectroscopia de fluorescência de ATX/NE em metanol.	30
Figura 14 - (a) Espectroscopia de fluorescência $E_m \times E_x$ da ATX livre (b) Curva de emissão da ATX livre com excitação fixa de 448 nm (c) Curva de excitação da ATX livre com emissão fixa de 568 nm.	31
Figura 15 - (a) Espectroscopia de fluorescência $E_m \times E_x$ da NE/ATX (b) Curva de emissão da ATX/NE com excitação fixa de 445 nm (c) Curva de excitação da NE/ATX com emissão fixa de 605 nm.	31

Figura 16 - Ensaio de Citotoxicidade in vitro de NE/ATX na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ de ATX, NE/vazia e DMSO em linhagens de fibroblastos de murino NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658) utilizando resazurina, onde CT= controle; A= 2,5% NE/ATX; B= 5% NE/ATX; C= 10% NE/ATX; D= 15% NE/ATX; E= 25% NE/ATX; F= 50% NE/ATX; G= 25% ATX livre; H= 50% ATX livre. Foi determinada significância estatística através do teste de análise de variância One-way ANOVA, com 95% de significância, seguido de pós teste Tukey t-test para múltiplas comparações (*p<0,05).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados referentes aos valores médios de tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta das NE preparadas no período de 45 dias. 24

Tabela 2 - Dados referentes aos valores médios de tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta da NE/ATX, comparando a amostra inicial com as amostras após 15 dias armazenadas em diferentes temperaturas (7°C e 25°C). 26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATX	Astaxantina
ATX/NE	Astaxantina nanoencapsulada
CLN	Carreador Lipídico Nanoestruturado
DLS	Dynamic Light Scattering (Espalhamento Dinâmico da Luz)
DMEM	Dulbecco MEM
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPO	European Patent Office
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Fase aquosa
FL	Fase lipofílica
HDL	High Density Lipoprotein
LDL	Low Density Lipoprotein
MI	Miristato de Isopropila
MMP	Metaloproteinase
NC	Nanocarreadores
NE	Nanoemulsão
NE/ATX	Nanoemulsão contendo astaxantina
NE vazia	Nanoemulsão sem princípio ativo
NLS	Nanocarreador Lipídico Sólido
O/A	Óleo em água
PdI	<i>Polydispersity index</i> (Índice de Polidispersividade)
UV	Ultravioleta
2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões
ζ	Potencial Zeta

SUMÁRIO

1. Introdução	10
1.1 Nanotecnologia.....	10
1.1.1 Nanocarreadores	11
1.1.2 Nanoemulsões	13
1.2 Astaxantina.....	14
1.2.1 Características gerais.....	14
1.2.2 Mercado	15
1.2.3 Aplicações Biológicas.....	16
1.2.4 Análise de Inovação tecnológica: Propriedade Intelectual e patentes	19
2. Objetivos	19
2.1 Objetivos Gerais	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1 Materiais.....	20
3.2 Métodos.....	20
3.2.1 Síntese de nanoemulsões poliméricas para associação de astaxantina pelo método de emulsificação espontânea sob pressão reduzida	20
3.2.2 Caracterização físico-química das nanoemulsões.....	21
4. Resultados e Discussão	23
4.1 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico, Potencial Zeta e Índice de Polidispersão	23
4.2 Teste de estabilidade térmica	26
4.3 Espectroscopia de absorção no UV-Visível	26
4.3.1 Construção da curva de calibração espectro-analítica da astaxantina	26
4.4 Espectroscopia de emissão de fluorescência (2D e 3D)	28
4.5 Ensaio de Citotoxicidade	32
5. Conclusão	34
6. Referências Bibliográficas	35

1. Introdução

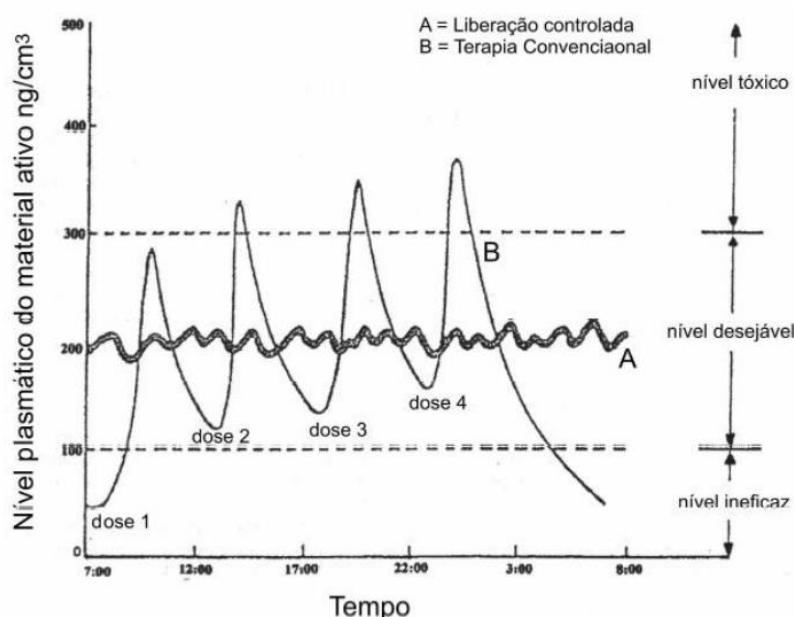
1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia consiste no estudo, entendimento e desenvolvimento de materiais em escala nanométrica, podendo proporcionar novos usos para materiais já conhecidos comercialmente (HUPFFER; LAZZARETTI, 2019). Segundo Gu *et al.* (2013), o desenvolvimento e aplicação da Nanotecnologia em algumas áreas, como por exemplo, a veiculação de fármacos, são capazes de alterar por completo o tratamento de várias doenças, e por esse motivo, a indústria farmacêutica tornou-se cada vez mais interessada nos avanços nanotecnológicos. Isso se deve, em especial, ao fato de que os nanomateriais demonstram potencial no desenvolvimento de novas formulações, anteriormente impossíveis, além de oferecer novas ferramentas diagnósticas (GU *et al.*, 2013).

A utilização de elementos em nanoescala possibilita uma variedade de novas aplicações, novos materiais e novas tecnologias, visto que um material pode apresentar propriedades físico-químicas diferentes se utilizado em escala nanométrica, comparado ao mesmo material em escala convencional. Esse fato é denominado com efeito de tamanho (HUPFFER; LAZZARETTI, 2019). Além disso, a redução de partículas para a nanoescala causa o aumento da área superficial do material, sendo importante para sua reatividade química e funcionalidade (HUPFFER; LAZZARETTI, 2019).

Outro destaque dos produtos nanotecnológicos é a propriedade que possuem de liberação controlada do fármaco, cujo perfil de liberação é mostrado na Figura 1. Essa característica é altamente desejável em sistemas terapêuticos mais eficazes, pois garantem a baixa toxicidade, a utilização de doses menores e proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades do organismo (PORTO *et al.*, 2020).

Figura 1 - Comparação do perfil de liberação entre sistemas convencionais e sistemas de liberação controlada de fármacos.



Fonte: Bizerra e Silva (2015)

1.1.1 Nanocarreadores

Os nanocarreadores (NC) existem nos mais diversos tipos, diferindo em suas características físico-químicas, comportamento no organismo e composição. A Figura 2 mostra alguns dos principais tipos de nanocarreadores, dispostos na ordem cronológica de sua descrição na literatura.

Figura 2 - Tipos de nanocarreadores, dispostos na ordem cronológica. NLS = nanocarreador lipídico sólido; CLN = carreador lipídico nanoestruturado.



Fonte: Apolinário *et al.* (2020)

Uma breve descrição de cada tipo de NC é vista abaixo:

- a) **Nanopartículas Metálicas:** são partículas elaboradas a partir de diferentes materiais metálicos em escala nanométrica (APOLINÁRIO *et al.*, 2020).
- b) **Microemulsões:** são sistemas líquidos, opticamente isotrópicos e termodinamicamente estáveis, formados uma fase polar e uma fase apolar e um ou mais tensoativos (APOLINÁRIO *et al.*, 2020).
- c) **Lipossomas:** são estruturas vesiculares com interior aquoso delimitado por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, podendo conter colesterol para aumentar a rigidez (APOLINÁRIO *et al.*, 2020).
- d) **Dendrímeros:** são estruturas quase esféricas que apresentam um alto número de subgrupos funcionais reativos e espaços interiores protegidos. São altamente ramificados, tridimensionais e monodispersos, assemelhando-se à estrutura de uma árvore (TOPAN, 2016).
- e) **Micelas:** são nanoestruturas formadas a partir da autoagregação de tensoativos, poliméricos ou não, que sendo anfifílicos, acarretam a formação de um núcleo hidrofóbico rodeado por porção hidrofílica (APOLINÁRIO *et al.*, 2020).
- f) **Nanoemulsão:** semelhantes às microemulsões, as nanoemulsões também são dispersões coloidais, formadas pelas fases polar e apolar. No entanto, elas são termodinamicamente instáveis, dessa forma, podendo ocorrer a separação de fases ao longo do tempo. Apesar disso, elas costumam apresentar boa estabilidade cinética (APOLINÁRIO *et al.*, 2020).
- g) **Nanocarreadores Lipídicos Sólidos:** são nanoesferas compostas de um núcleo lipídico sólido (0.1-30%), o qual é disperso em fase aquosa por tensoativos. Elas se apresentam sólidas tanto à temperatura ambiente quanto biológica (APOLINÁRIO *et al.*, 2020).
- h) **Nanoesferas:** consideradas sistemas matriciais, as nanoesferas são estruturas sólidas formadas por uma densa rede polimérica sem núcleo líquido, podendo acarretar a liberação retardada de fármacos presos no interior da malha polimérica.
- i) **Carreadores Lipídicos Nanoestruturados:** são considerados uma modificação das nanopartículas lipídicas sólidas, cujos núcleos podem conter lipídios sólidos e líquidos a temperatura ambiente (APOLINÁRIO *et al.*, 2020).

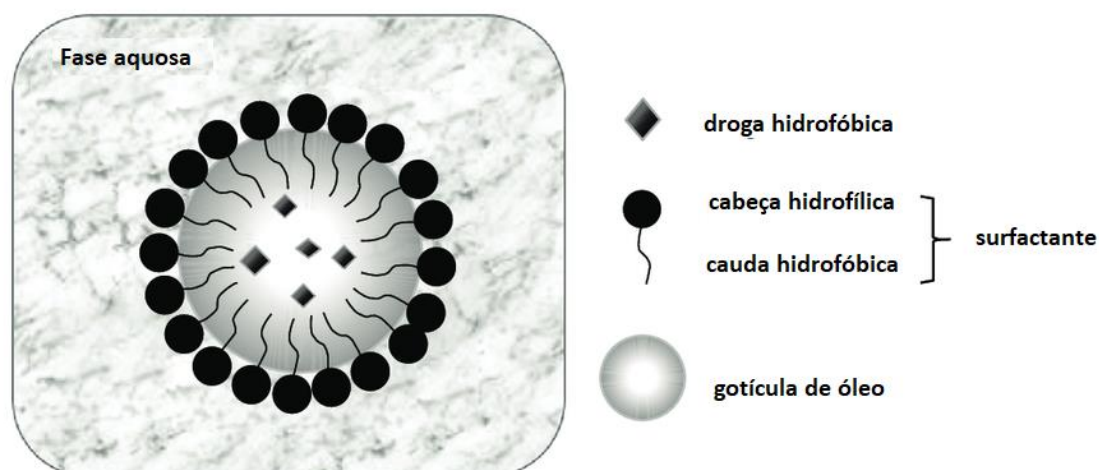
- j) **Polimerossomas:** são considerados análogos estruturais dos lipossomas, também vesiculares, porém com bicamada polimérica, a qual é formada a partir da autoagregação de copolímeros anfifílicos (APOLINÁRIO *et al.*, 2020).
- k) **Nanocápsulas:** são compostas por um interior oleoso rodeado por uma monocamada polimérica, mostrando-se muito úteis na encapsulação de fármacos hidrofóbicos. São consideradas um sistema reservatório (APOLINÁRIO *et al.*, 2020).

No presente trabalho, os NC empregados são as nanoemulsões, cujas características são vistas com mais detalhes no item a seguir.

1.1.2 Nanoemulsões

Por definição, as NEs, ou emulsões de tamanho em nanoescala, são sistemas dispersos formados pela mistura de dois líquidos imiscíveis, que são estabilizados e homogeneizados com auxílio de agentes emulsificantes (tensoativos/surfactantes). Suas gotículas costumam apresentar uma distribuição de tamanho uniforme (20-500 nm) (MOGHASSEMI *et al.*, 2022). As NEs, representadas na Figura 3, são uma ferramenta da nanotecnologia muito utilizadas na veiculação de compostos ativos, capazes de melhorar o direcionamento, a permeabilidade e a retenção de ativos e de fármacos (SABIR *et al.*, 2021).

Figura 3 - Representação esquemática de gotícula de nanoemulsão O/A.



Fonte: adaptado de Yukuyama (2016)

As NE apresentam inúmeras vantagens se comparadas às emulsões tradicionais, que incluem maior área interfacial, estabilidade cinética, absorção mais rápida e a possibilidade de melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade do fármaco (MOGHASSEMI *et al.*, 2022). Além disso, as NEs apresentam boa estabilidade a longo prazo, apresentam métodos simples de síntese e podem ser produzidas em uma variedade de formulações, como espumas, cremes, líquidos e sprays (MOGHASSEMI *et al.*, 2022).

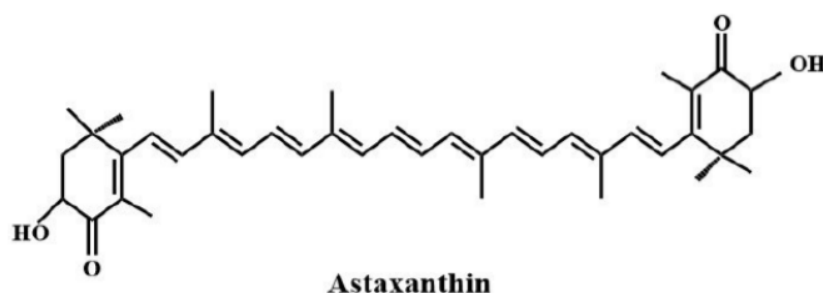
1.2 Astaxantina

1.2.1 Características gerais

A astaxantina (ATX), cujo nome químico é 3,3'-diidroxib,β-caroteno-4,4'-diona, é um pigmento carotenóide lipossolúvel com propriedades antioxidantes 10 vezes mais poderosas que do β-caroteno. Isso é explicado pela sua estrutura molecular (Figura 4), formada por uma cadeia linear de polieno e dois anéis β terminais, com uma hidroxila e carbonila apresentadas em cada anel (STACHOWIAK; SZULC, 2021). A ATX elimina espécies reativas de oxigênio (ERO) e outras espécies reativas (como de enxofre e carbono) diretamente, tanto doando elétrons quanto ligando-se ao radical livre para formar um produto não reativo. Além disso, a presença de uma série de ligações conjugadas na região central apolar da ATX permite que a molécula remova os radicais livres (elétrons de alta energia) do interior das células do organismo. Sendo assim, a ATX protege as membranas celulares contra ERO e danos oxidativos (PEREIRA *et al.*, 2021).

Além disso, a presença de 11 ligações duplas conjugadas em sua estrutura molecular é o que lhe confere sua coloração avermelhada característica (STACHOWIAK; SZULC, 2021).

Figura 4 - Estrutura química da astaxantina – ATX.



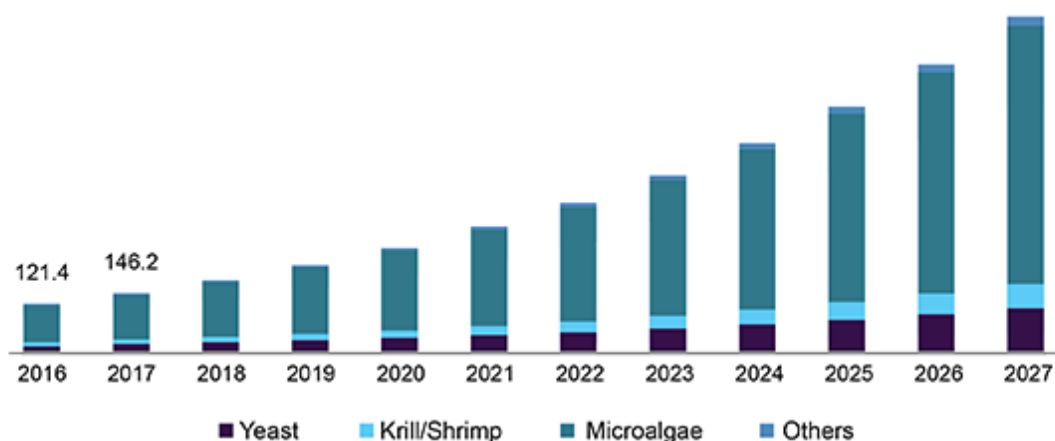
Fonte: Santos (2020)

ATX é naturalmente encontrada em peixes como o salmão do Atlântico, truta arco-íris, charuto do Ártico e dourada, em crustáceos como krill, camarão e lagosta, em aves peraltas como flamingo e íbis, e em alguns microrganismos, plânctons e algas (STACHOWIAK; SZULC, 2021). Este composto possui características muito interessantes para aplicações na área da saúde, que incluem prevenção do estresse oxidativo, regeneração celular, efeitos neuroprotetores, antiproliferativos, anti-inflamatórios, antiapoptóticos, antidiabéticos, anticancerígenos e protetores da pele (CHANG; XIONG, 2020).

1.2.2 Mercado

Em 2019, o tamanho do mercado global de astaxantina foi estimado em US\$ 1,0 bilhão e estudos sugerem que o mesmo deve crescer em um ritmo acelerado nos próximos anos (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). A produção de ATX a partir de fontes naturais, como algas ou leveduras, tornou-se uma das atividades mais populares no setor biotecnológico, devido aos baixos custos de manutenção e à grande demanda em aplicações em rações, alimentos, farmacêuticos e nutracêuticos, o que contribui muito para o crescimento desse segmento no mercado (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). Assim sendo, a Figura 5 mostra uma projeção de crescimento do mercado de ATX nos Estados Unidos para os próximos anos.

Figura 5 - Tamanho do mercado de astaxantina, por produto, de 2016 a 2027 em milhões de dólares.



Fonte: Grand View Research (2020)

No entanto, existe uma dificuldade da utilização da ATX em sua forma livre, pois a mesma apresenta baixa biodisponibilidade e alta hidrofobicidade, resultando em uma baixa absorção de ATX pelo organismo humano (KHALID *et al.*, 2017). Encapsular a ATX em sistemas de liberação, como por exemplo, nanodispersões, lipossomas e nanoemulsões, seria uma possível solução para esses impasses, visto que, segundo Khalid *et al.* (2017), diversos estudos já provaram o aumento de biodisponibilidade e funcionalidade da ATX encapsulada.

1.2.3 Aplicações Biológicas

1.2.3.1 Doenças Cardiovasculares

Doenças cardiovasculares são doenças relacionadas aos vasos sanguíneos e ao coração, como por exemplo, insuficiência cardíaca, doença cardíaca congênita e doença cerebrovascular (KUMAR *et al.*, 2021). Muitas doenças cardiovasculares estão relacionadas a espécies reativas de oxigênio (ERO). Assim sendo, as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes da ATX são capazes de reduzir significativamente o nível de estresse oxidativo e o tempo de trânsito sanguíneo (KUMAR *et al.*, 2021; MEDHI; KALITA, 2021). Além disso, a ATX consegue reduzir os níveis de triglicerídeos e colesterol LDL (*low density lipoprotein*), que são gorduras que, em excesso, depositam-se nos vasos sanguíneos, bem como aumentar o colesterol HDL (*high density lipoprotein*), o colesterol “bom”, responsável por levar o colesterol dos tecidos para o fígado, para que seja eliminado (MEDHI; KALITA, 2021).

1.2.3.2 Diabetes

Diabetes mellitus, conhecida popularmente apenas como diabetes, refere-se a um grupo de distúrbios metabólicos que é reconhecido pelo alto nível de açúcar no sangue que se mantém por longos períodos. Estudos epidemiológicos recentes indicam uma correlação inversa entre o nível de carotenóides no plasma sanguíneo e a incidência de diabetes mellitus (MEDHI; KALITA, 2021). Sabe-se que o estresse oxidativo, causado principalmente por hiperglicemia induzida por ERO, tem um efeito prejudicial na progressão do diabetes. Dessa forma, a atividade antioxidante superior da ATX pode compensar o dano oxidativo através de diversos mecanismos, como a eliminação de radicais livres, dificultando a peroxidação de lipídios e extinção do oxigênio singlete basal (JAFARI *et al.*, 2022).

1.2.3.3 Doenças Oculares

ATX pode ser usada no tratamento de doenças oculares induzidas por estresse oxidativo, incluindo DMRI (degeneração macular relacionada à idade), olho seco devido ao envelhecimento, alergias, inflamações, entre outras. A ATX ajuda a proteger as células da retina contra danos oxidativos e luz ultravioleta, bem como aliviar os sintomas de fadiga ocular, através da inibição de produção de ERO e de morte celular da retina (JAFARI *et al.*, 2022; MEDHI; KALITA, 2021).

1.2.3.4 Doenças Neurológicas

As doenças neurológicas são patologias que acometem o sistema nervoso central e periférico. Tratando-se de um poderoso antioxidante com propriedades restauradoras, antissépticas, antienvelhecimento e anti-inflamatórias, a ATX pode ser utilizada no tratamento e prevenção de muitas doenças neurológicas, como dor neuropática, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, demência e Doença de Huntington (JAFARI *et al.*, 2022; MEDHI; KALITA, 2021). Isso se deve ao fato de que, embora doenças neurológicas tenham diferentes agentes causadores, muitas delas compartilham características bastante semelhantes, como a liberação de metais redox combinada com oxigênio e níveis de ERO em células de aumento neuronais causada pelo estresse mitocondrial (MEDHI; KALITA, 2021).

1.2.3.5 Saúde da pele

Muitos estudos avaliaram a eficácia da ATX na pele e demonstraram que ela melhora a elasticidade, textura e teor de umidade da pele, além de diminuir rugas e sinais visíveis de envelhecimento (JAFARI *et al.*, 2022). A pele humana é diariamente exposta à radiação ultravioleta da luz solar, que produz ERO e consequentemente degrada a saúde da pele. Esse estresse oxidativo pode acarretar irregularidades do tom de pele, envelhecimento prematuro, bem como diminuir as proteínas essenciais da pele (KUMAR *et al.*, 2021). Além disso, com o envelhecimento, a pele pode sofrer várias alterações, como quebra do DNA, baixa síntese de antioxidantes, resposta inflamatória e MMPs (metaloproteinases), causando a quebra do colágeno e da elastina, juntamente com outros eventos oxidativos, que podem gerar resistência à tração e a elasticidade, causando manchas senis, rugas e interrupção na matriz dérmica celular (KUMAR *et al.*, 2021). Esses problemas de pele podem ser tratados pela administração tópica ou oral de ATX, um potente antioxidante e anti-inflamatório capaz de suprimir a formação de rugas e o espessamento da pele, aumentar as fibras de colágeno e a densidade dos capilares, inibir a ERO e influenciar a cinética do reparo do DNA (JAFARI *et al.*, 2022; KUMAR *et al.*, 2021).

1.2.3.6 Câncer

O câncer é essencialmente o crescimento de células malignas. Muitas pesquisas evidenciam os efeitos anticancerígenos da ATX em vários tipos de câncer, incluindo leucemia, câncer de pele, de bexiga, de cólon, de próstata, de mama, câncer oral, e carcinoma hepatocelular (JAFARI *et al.*, 2022; MEDHI; KALITA, 2021). Estudos revelaram que a ATX apresenta atividade anticancerígena por vários mecanismos, como inibição do crescimento celular, interferências no ciclo celular e indução de apoptose, sendo capaz de reduzir a expressão de proteínas anti-apoptóticas e aumentar a expressão de proteínas pró-apoptóticas (FARAONE, *et al.* 2020; JAFARI *et al.*, 2022). Neste contexto, o tratamento com ATX pode ser considerado como um potencial substituto de tratamento de câncer em pacientes que apresentam resistência à terapia convencional.

1.2.4 Análise de Inovação tecnológica: Propriedade Intelectual e patentes

Baseado nas patentes encontradas no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) e no banco de dados da European Patent Office (EPO), vê-se que a astaxantina geralmente é utilizada na sua forma livre, em fármacos, cosméticos, produtos alimentícios e rações. As patentes de Lockwood (2018) e Sharoni e Levy (2002) foram as únicas patentes nacionais encontradas em que a ATX é utilizada em preparações farmacêuticas para o tratamento de câncer. Em ambos os casos, no entanto, a ATX encontra-se associada a outros carotenóides, como betacaroteno, cataxantina, zeaxantina e luteína, e licopeno.

A nível mundial, existem várias patentes nas quais a ATX é aplicada ao tratamento de câncer. A patente de Li (2020), por exemplo, utiliza ATX e ginsenosídeo Rg3 para a produção de uma droga utilizada no tratamento de câncer de fígado, e a patente de Shepherd (2021) propõe um método no qual se adiciona astaxantina glucosídica a um material transportador, como pílula ou óleo, para o tratamento de várias doenças, em especial o câncer.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e caracterizar nanoemulsões contendo ATX (NE/ATX) e na sua forma sem princípio ativo (NE vazia), utilizando o éster miristato de isopropila (MI) como núcleo lipofílico inovador.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver nanoemulsões associadas com astaxantina
- Caracterizar físico-quimicamente as nanoemulsões, com e sem astaxantina, utilizando espectroscopia UV-Visível, testes de estabilidade e medidas de espalhamento dinâmico da luz (DLS), potencial Zeta (ζ) e índice de polidispersão (Pdl).
- Avaliar o perfil de citotoxicidade de NE/ATX e ATX livre em cultura celular de fibroblastos murinos

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

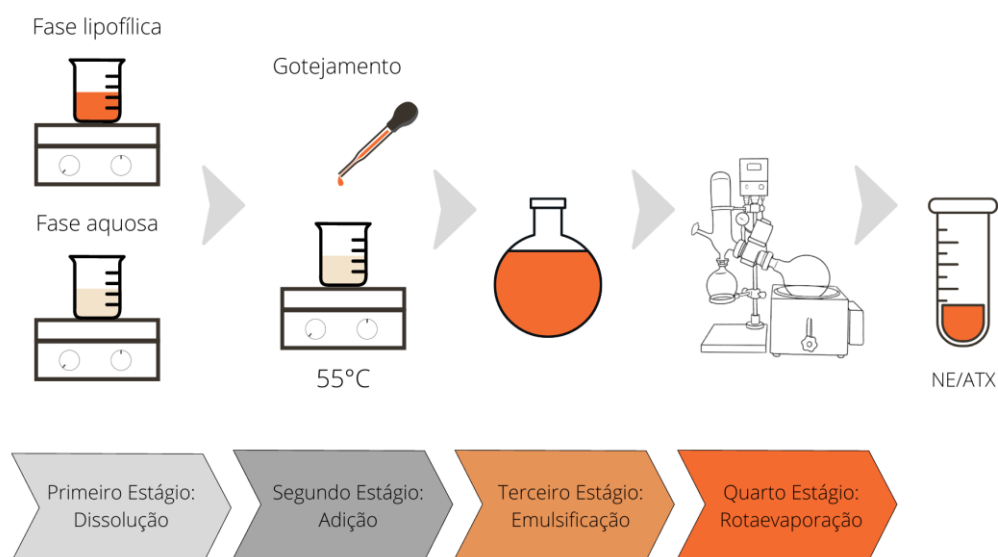
A água utilizada para o preparo das formulações foi do tipo ultrapura obtida do sistema Gehaka Master System All Wfi, São Paulo. Para o preparo das NE, os seguintes reagentes químicos foram utilizados: Pluronic F68 (Sigma Aldrich), Acetona e dimetil-sulfóxido (J. T. Baker, São Paulo, Brasil), lecitina de soja Lipoid S100 (LIPID Ingredients & Technologies, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), água ultrapura obtida do sistema E-Pure Barnstead (Millipore, Cotia, São Paulo), Miristato de Isopropila (J. T. Baker, São Paulo, Brasil) e Astaxantina (Sigma Aldrich).

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese de nanoemulsões poliméricas para associação de astaxantina pelo método de emulsificação espontânea sob pressão reduzida

As nanoemulsões foram preparadas pelo método descrito por Paula *et al.* (2017), que pode ser visto esquematicamente na Figura 6.

Figura 6 - Modelo esquemático da metodologia de síntese das NE/ATX.



Fonte: Autora

A formulação foi preparada utilizando banho termostático na temperatura de 55°C com o auxílio de reatores camisados para termostatização, os quais estavam conectados ao banho de circulação, mantendo um fluxo contínuo de aquecimento e agitação magnética. Estes reatores são específicos para aquecimento de tubos cônicos do tipo Falcon 50 e o sistema foi submetido à agitação magnética moderada, constante a 400 rpm, aproximadamente.

O processo de preparo da formulação se baseou na mistura de fases lipofílica (FL) e aquosa (FA). Preparou-se a FL em tubo tipo Falcon P50, aquecido nos reatores camisados a 55°C e com agitação magnética moderada. Posteriormente foram adicionados 10 mL de acetona e 75 mg de lecitina de soja de alta pureza (Lipoid S100), mantendo-se as condições iniciais de temperatura e agitação. Após a total homogeneização do Lipoid, foram adicionados 100 µL de uma solução de 50 mg/mL de ATX em Dimetilsulfóxido (DMSO), previamente preparada, e em seguida, 250 µL de Miristato de Isopropila. Simultaneamente, FA foi preparada através da mistura de 20 mL de água ultrapura (do tipo Milli-Q) com 75 mg do tensoativo aniônico Pluronic F-68 (Kolliphor P188), mantendo também as mesmas condições iniciais de temperatura e agitação magnética.

Após o término da homogeneização de ambas as fases, a FL foi adicionada por gotejamento à FA, a fim promover a primeira fase da emulsificação. Ao finalizar o gotejamento, manteve-se a temperatura a 55°C e a agitação magnética constante durante 20 minutos. Em seguida, todo o solvente orgânico (acetona) foi retirado do meio através de técnica de rotaevaporação à pressão reduzida para obtenção de 10 mL da nanoemulsão final.

3.2.2 Caracterização físico-química das nanoemulsões

3.2.2.1 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico, Potencial Zeta e Índice de Polidispersão

O diâmetro hidrodinâmico das gotículas das NE foi determinado através da técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*). Esse procedimento foi realizado no equipamento Zetasizer (Nano-ZS, Malvern Instruments, Reino Unido), no Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade. Os tamanhos das gotículas foram avaliados na ausência e presença de ATX, para a verificação da influência direta da incorporação desta na formulação.

Também foram realizadas análises de Potencial Zeta (ζ) e do Índice de Polidispersão (Pdl) das amostras, que foram diluídas em água ultrapura em proporção de 1:100, para posterior leitura nas cubetas de acrílico específicas do equipamento.

3.2.2.2 Teste de estabilidade térmica

Os parâmetros mencionados no item 3.2.2.1 foram monitorados em amostras de NE/ATX separadas, mantidas à 7°C e 25°C, respectivamente, durante 15 dias.

3.2.2.3 Espectroscopia de absorção no UV-visível

A ATX nanoencapsulada foi quantificada por espectroscopia de absorção, utilizando um espectrofotômetro de UV-Visível Thermo. Primeiramente, foi desenvolvida a curva padrão de calibração. Uma solução estoque de 300 µg/mL de ATX em DMSO foi preparada, e usada para a realização de diluições sucessivas (5 - 40 µg/mL) para construção da curva espectroanalítica em DMSO. Esta curva foi utilizada posteriormente para quantificação da ATX associada à NE. Assim, foi preparada uma solução adicionando-se 200 µL de NE/ATX a 4,8 mL de DMSO, a qual foi submetida a um sistema com agitação moderada e banho termostatizado a 55°C durante 15 minutos e, em seguida, a mais 15 minutos em banho ultrassônico, para garantir a digestão da formulação em DMSO. Por fim, a absorbância da amostra foi lida e pôde-se quantificar a concentração de ATX nanoencapsulada.

3.2.2.4 Espectroscopia de emissão de fluorescência no UV-visível (2D e 3D)

A ATX livre foi quantificada por espectroscopia de fluorescência em 2D e 3D, utilizando um Espectrofluorímetro RF-6000 Shimadzu. Uma solução de 75 µg/mL de ATX em Metanol foi preparada e colocada em uma cubeta de quartzo de 4 faces polidas para leitura de fluorescência. Para a análise, foi estabelecido um protocolo com excitação na faixa de 400 a 480 nm, emissão na faixa de 510 a 670 nm, velocidade de escaneamento de 6000 nm/s e fendas de excitação e emissão de 3,0/20,0 nm.

3.2.2.5 Protocolo de cultivo celular

Linhagens de células de fibroblastos murinos (3T3-NIH, ATCC® CRL-1658) foram cultivadas em frascos para cultura de 75 cm², com utilização do meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino a 10%, e incubadas a 37°C, com atmosfera úmida a 5,0% de CO₂. As células foram cultivadas até atingir a confluência, e posteriormente, tratadas com uma solução de tripsina 0,05% Gibco® para soltá-las da monocamada no processo de repicagem. O processo de tripsinização foi interrompido pela adição do meio DMEM suplementado, que passou por 5 minutos de centrifugação. As células, então, foram ressuspensas em 10 mL e replaqueadas, e o meio de cultura foi completamente renovado até três vezes semanais

3.2.2.6 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo método colorimétrico da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido, Sigma-Aldrich Co, MO, EUA) para avaliar a citotoxicidade da NE na presença e ausência da ATX em diferentes teores (2,5 - 50%). O método seguiu o protocolo descrito por Rezende e colaboradores (2019), e teve fibroblastos murinos (3T3-NIH, ATCC® CRL-1658) como modelo biológico, cultivados de acordo com a metodologia apresentada na seção 3.2.2.5. Após 24 horas do tratamento das células com as formulações em estudo, uma solução de resazurina 10% em DMEM foi adicionada às amostras, que ficaram incubadas durante 24 horas. As leituras espectrofotométricas dos poços em 570 nm (com correção de absorção basal em 590 nm) foram realizadas na sequência e os resultados, dados em porcentagem, foram calculados segundo a Equação 1:

$$\text{Células viáveis(\%)} = (\text{D.O. amostra} / \text{D.O. controle}) \times 100 \quad (1)$$

4. Resultados e Discussão

4.1 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico, Potencial Zeta e Índice de Polidispersão

O tamanho de partícula e a distribuição de tamanho são informações fundamentais de caracterização físico-química, visto que podem influenciar a

liberação do composto e a estabilidade, bem como auxiliam na determinação de características como distribuição *in vivo*, destino biológico, toxicidade e capacidade de direcionamento das mesmas. Além disso, a medida de potencial Zeta é um parâmetro usualmente utilizado como indicativo de estabilidade das nanoemulsões (CODEVILLA *et al.*, 2015).

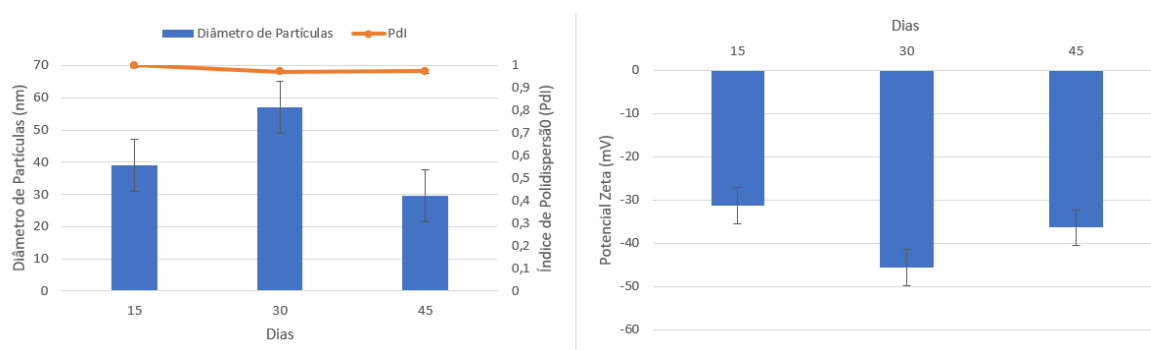
Neste trabalho, foram preparadas NE com a presença da ATX na concentração de 0,5 mg/mL e sem a mesma. A partir dessas amostras foram realizadas medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e potencial Zeta, obtendo-se então parâmetros como tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e carga das nanopartículas como apresentado na Tabela 1 e nas Figuras 7 e 8.

Tabela 1 - Dados referentes aos valores médios de tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta das NE preparadas no período de 45 dias

	Tamanho de partícula (nm)	Pdi	Potencial Zeta (mV)
NE vazia	492,6 ± 23,89	0,170 ± 0,024	- 41,6 ± 2,94
NE/ATX	41,9 ± 13,92	0,982 ± 0,015	- 37,8 ± 7,21

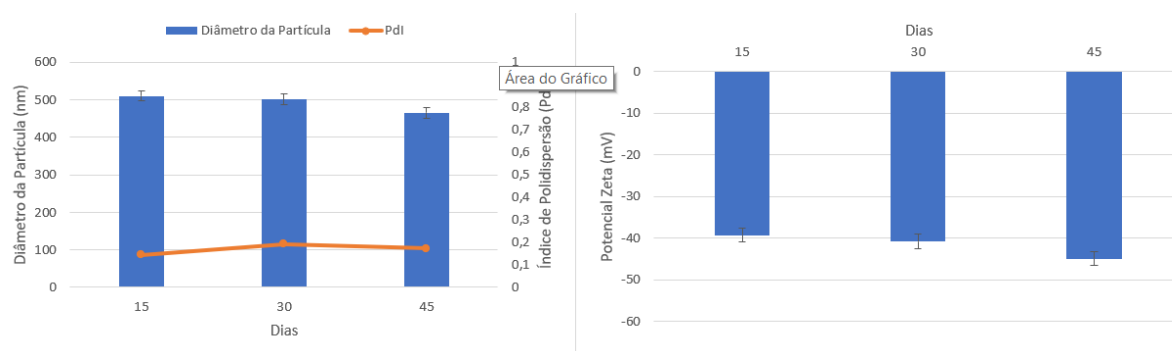
Fonte: Autora

Figura 7 - Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho médio de partículas, PDI e potencial Zeta em função do tempo para NE/ATX.



Fonte: Autora

Figura 8 - Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho médio de partículas, Pdl e potencial Zeta em função do tempo para NE vazia.



Fonte: Autora

Através dos dados apresentados, pode-se concluir que as amostras de NE vazia mostraram tamanhos de partícula elevado, embora próximos do limite superior, 500 nm, tamanho a partir do qual as nanoemulsões tendem a ficar fisicamente mais instáveis (BRUXEL et al., 2012). Já a NE/ATX exibiu valores de tamanho extremamente adequados (≤ 100 nm). Os valores de potencial Zeta se mantiveram estáveis durante todo tempo de análise para ambas as formulações, bem como apresentaram valores $>|30$ mV, indicando uma maior repulsão eletrostática em as partículas, ou seja, uma menor possibilidade de agregação. Tudo isso evidencia uma excelente estabilidade das partículas.

No entanto, enquanto a NE vazia apresentou valores adequados de Pdl ($<0,25$), indicando monodispersão do sistema, isto é, homogeneidade das partículas em suspensão, a NE incorporada com ATX apresentou valores altíssimos de Pdl, próximos a 1, o que não é muito vantajoso, pois indica populações muito polidispersas, podendo levar à formação de aglomerados. No estudo de Roychowdhury et al. (2021), o tamanho médio das gotículas da nanoemulsão preparada contendo astaxantina foi de $43,8 \pm 3,6$ nm com Pdl de 0,401 e potencial zeta de $-15,4 \pm 9,4$ mV. Nota-se, assim, que o Pdl obtido por Roychowdhury et al. (2021) é bem inferior ao valor encontrado neste trabalho. Uma possível explicação para esse acontecimento consiste na baixa solubilidade da ATX no Miristato de Isopropila, o que dificulta a incorporação da mesma na NE, que pode acabar se aglomerando.

4.2 Teste de estabilidade térmica

O teste de estabilidade térmica das NE/ATX foi realizado durante um período de 15 dias e os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados referentes aos valores médios de tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta da NE/ATX, comparando a amostra inicial com as amostras após 15 dias armazenadas em diferentes temperaturas (7°C e 25°C).

	Tamanho de partícula (nm)	Pdi	Potencial Zeta (mV)
Amostra inicial (Dia 0)	38,9 ± 4,85	1,000 ± 0,000	-31,4 ± 1,77
Amostra à 7°C (Dia 15)	57,1 ± 15,25	0,973 ± 0,046	-45,6 ± 4,33
Amostra à 25°C (Dia 15)	841,2 ± 12,94	0,962 ± 0,034	-35,8 ± 0,7

Fonte: Autora

Como pode-se observar na tabela acima, em apenas 15 dias foi possível verificar o efeito da temperatura na estabilidade das formulações, sendo o parâmetro mais notável o tamanho das partículas. Enquanto a amostra armazenada em refrigerador (7°C) manteve-se relativamente estável, com um aumento de menos de 1,5 vezes, a amostra armazenada à temperatura ambiente (25°C) apresentou um aumento de tamanho extremamente significativo, cerca de 21,5 vezes maior que a amostra inicial. Isso indica, portanto, uma sensibilidade da NE/ATX à temperatura e mostra que o armazenamento à 7°C é visivelmente superior em relação à estabilidade das amostras. Isso ocorre pelo fato de que, temperaturas mais baixas de armazenamento, ajudam a minimizar as taxas de oxidação térmica, contribuindo para estabilidade química e estrutural das nanoemulsões (MCCLEMENTS; DECKER, 2000).

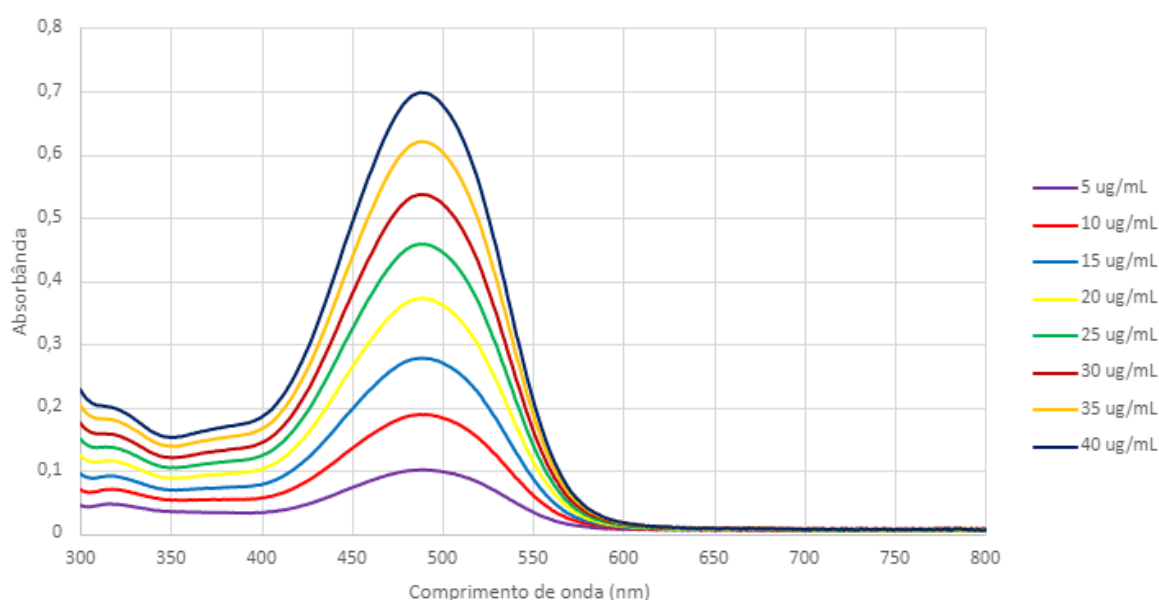
4.3 Espectroscopia de absorção no UV-Visível

4.3.1 Construção da curva de calibração espectro-analítica da astaxantina

Através do método espectroanalítico de absorção no UV-Visível foi realizado o delineamento da curva espectroanalítica. Primeiramente, através de um

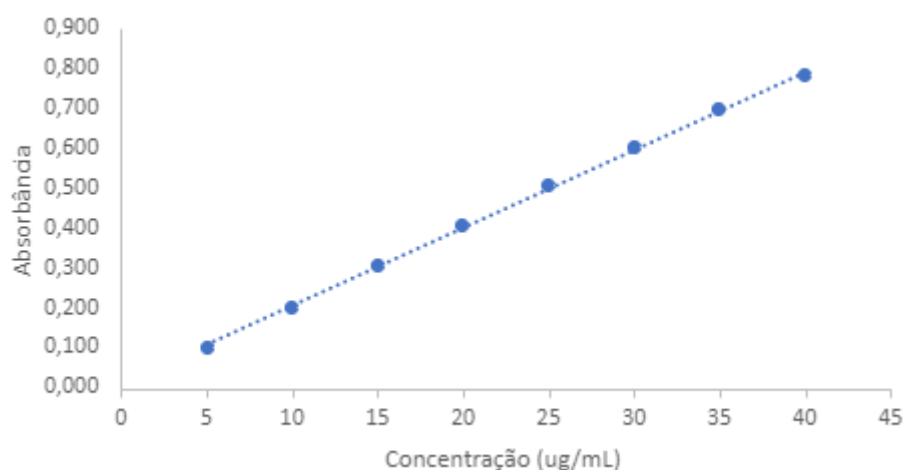
escaneamento das amostras para a obtenção do espectro de absorção da ATX em DMSO em diferentes concentrações (Figura 9), foi determinado que o comprimento de onda de absorção máxima encontra-se no valor de 490 nm. Dessa forma, a partir dos valores de absorbância máxima obtidos em cada amostra de concentração diferente, foi delineada a curva de calibração da astaxantina (Figura 10).

Figura 9 - Espectro de absorção da Astaxantina livre em DMSO em diferentes concentrações, variando de 5-40 µg/mL.



Fonte: Autora

Figura 10 - Curva espectroanalítica da Astaxantina livre em 490 nm, correlacionando a concentração e a absorbância, com equação de reta de $y = 0,0196x + 0,0107$ e $R^2=0,9993$.



Fonte: Autora

Dessa forma, a quantificação foi realizada seguindo o método descrito no item 3.2.2.3. A partir da absorbância encontrada (0,038 u.a.) foi possível calcular a concentração de ATX presente na amostra, correspondente a 1,393 µg/mL. Feitos os devidos cálculos de diluição, chega-se a uma NE/ATX com concentração real de ATX de 34,82 µg/mL. Considerando a concentração teórica igual a 0,5 mg/mL, obtém-se o valor de 6,964% de taxa de incorporação de ATX na formulação de NE/ATX.

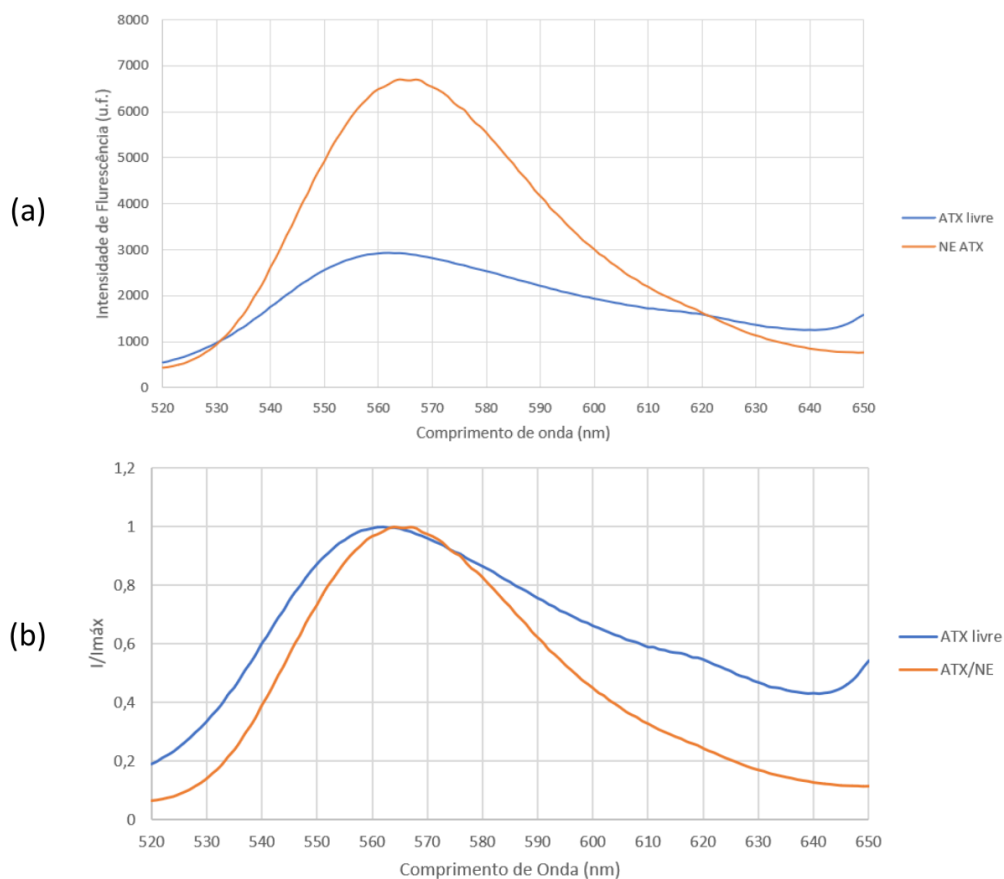
Durante o decorrer deste experimento, foram avaliadas a utilização de outros solventes (como acetona, óleo de soja e óleo de uva) e concentrações de ATX (variando de 0,005 a 0,5 mg/mL), sendo que a solubilização de ATX em DMSO para futura adição na fase lipofílica no processo de síntese de NE foi a que obteve melhores resultados, ou seja, apesar do baixo teor de incorporação, ainda assim foi a melhor maneira encontrada de adicionar a ATX à NE.

Esse fato demonstra que existe uma necessidade de se reavaliar o método de síntese proposto, bem como um possível diferente solvente lipofílico, visando uma melhor dissolução de ATX. Entretanto, esse teor pode ser considerado para ensaios *in vitro* futuros que poderão atestar o efeito de nanocarreamento e potencial efeito terapêutico ampliado do antioxidante biotecnológico de alta performance.

4.4 Espectroscopia de emissão de fluorescência (2D e 3D)

O perfil de emissão de ATX, em sua forma livre e dentro da NE, em meio orgânico (Metanol) foi obtido através do estudo de espectroscopia de emissão de fluorescência no UV-visível. A Figura 11 abaixo mostra o espectro 2D de emissão de fluorescência das amostras.

Figura 11 - Comparação entre os espectros 2D de emissão de fluorescência (a) e emissão de fluorescência normalizada (b) da ATX em metanol em sua forma livre (ATX livre) e dentro da NE (ATX/NE), com excitação em 490 nm e emissão variando de 520 a 650 nm, fendas de 15 nm / 15 nm para excitação/emissão.

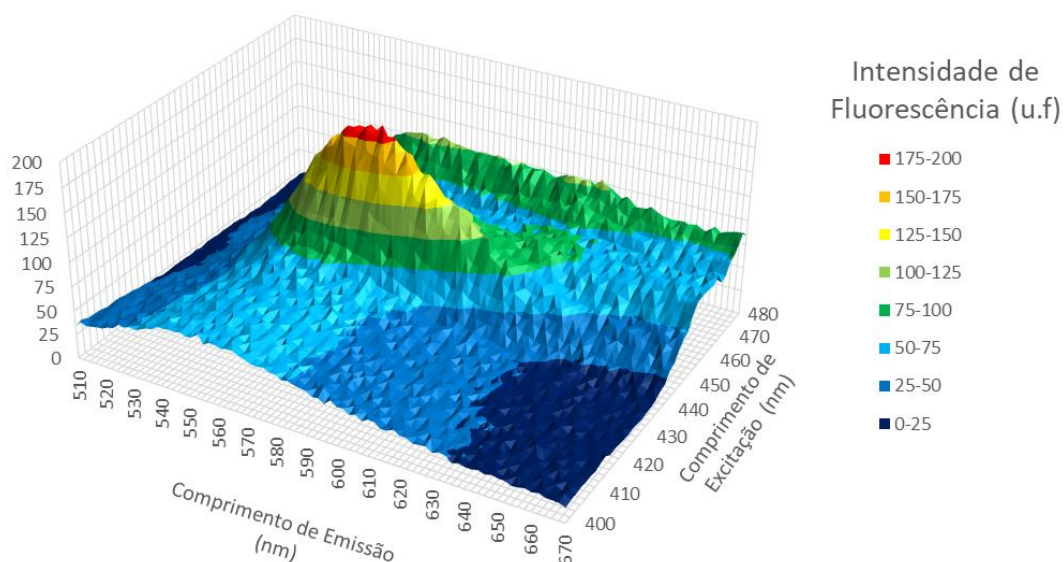


Fonte: Autora

Os resultados demonstram a manutenção do perfil de emissão de fluorescência entre as amostras de ATX livre e ATX/NE, com máximos em 562 nm e 564 nm, respectivamente. Isto sugere que o procedimento de nanoemulsificação obteve sucesso na incorporação do composto ativo, que manteve suas propriedades nos diferentes ambientes químicos do estudo.

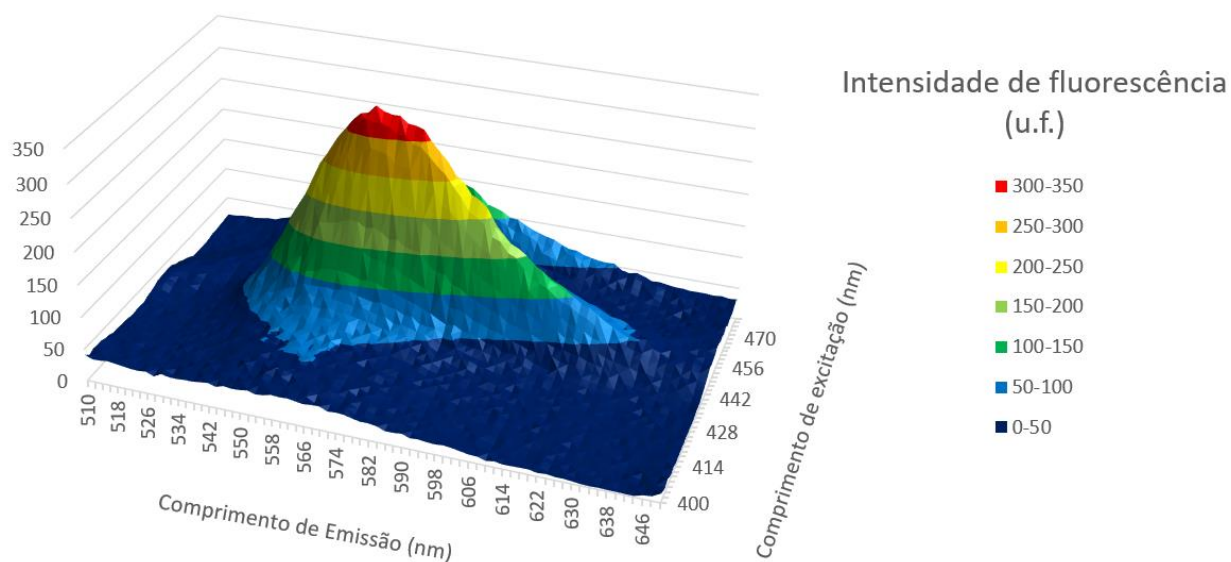
Em seguida, foram realizadas as análises relativas ao estudo de espectroscopia de emissão de fluorescência no UV-visível em 3 dimensões (3D), mostradas nas Figuras 12, 13, 14 e 15.

Figura 12 - Gráfico 3D de espectroscopia de fluorescência de ATX livre em metanol, com máximo de emissão e excitação em 568 nm e 448 nm, respectivamente, fendas de 3 nm / 20 nm para excitação/emissão e velocidade de scan de 6000 nm/min.



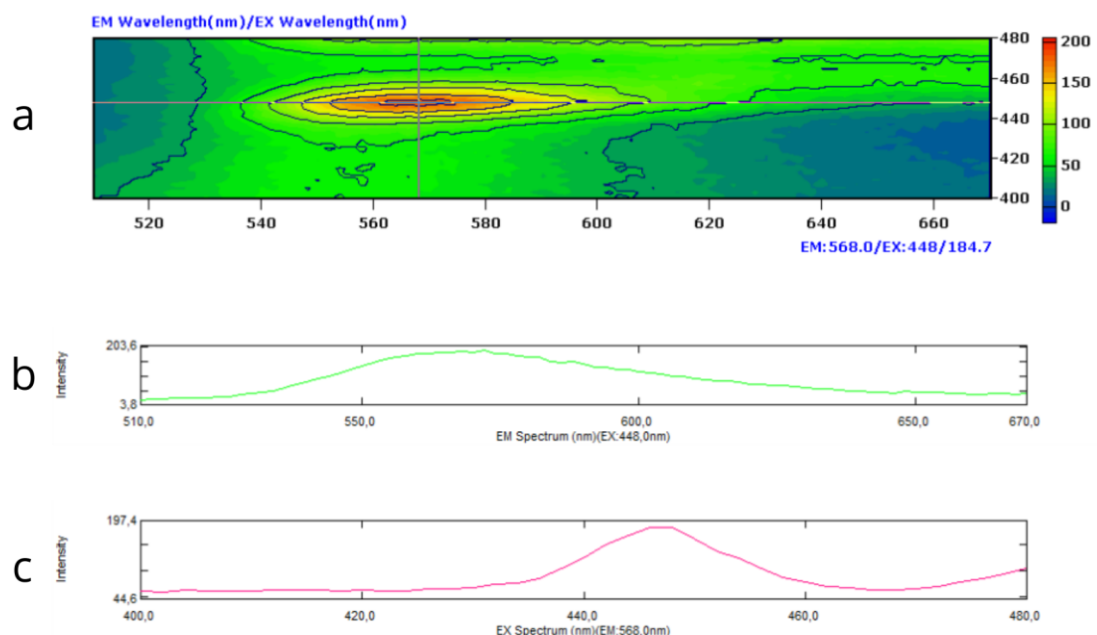
Fonte: Autora

Figura 13 - Gráfico 3D de espectroscopia de fluorescência de ATX/NE em metanol, com máximo de emissão e excitação em 566 nm e 448 nm, respectivamente, fendas de 3 nm / 20 nm para excitação/emissão e velocidade de scan de 6000 nm/min.



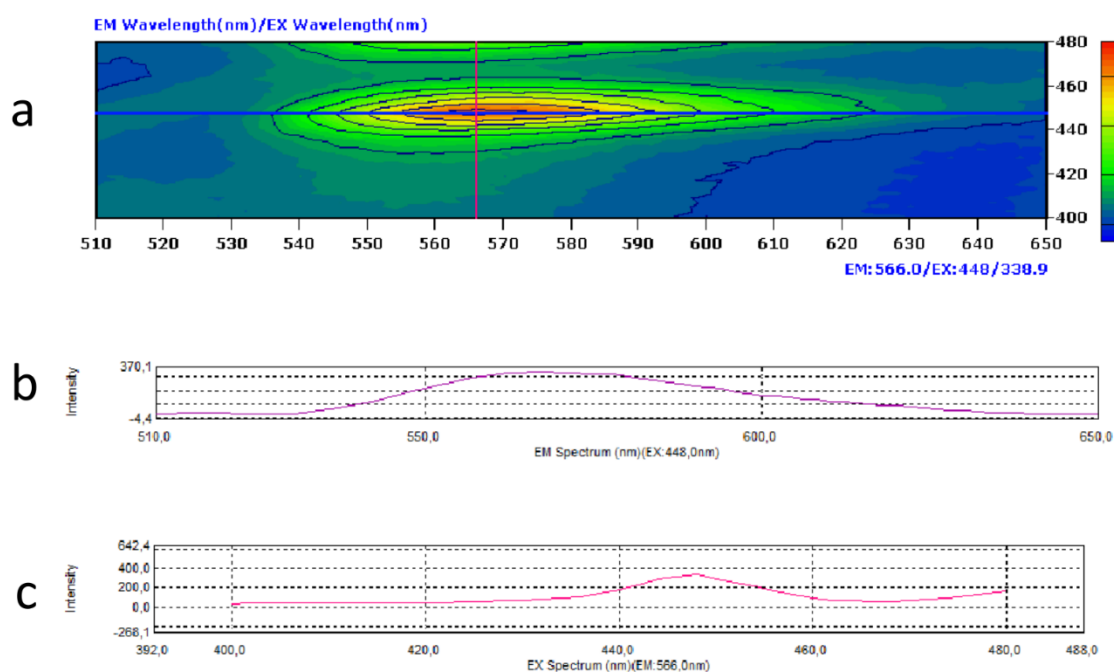
Fonte: Autora

Figura 14 - (a) Espectroscopia de fluorescência Em x Ex da ATX livre em metanol (b) Curva de emissão da ATX livre com excitação fixa de 448 nm (c) Curva de excitação da ATX livre com emissão fixa de 568 nm.



Fonte: Autora

Figura 15 - (a) Espectroscopia de fluorescência Em x Ex da ATX/NE em metanol (b) Curva de emissão da ATX/NE com excitação fixa de 448 nm (c) Curva de excitação da NE/ATX com emissão fixa de 566 nm.



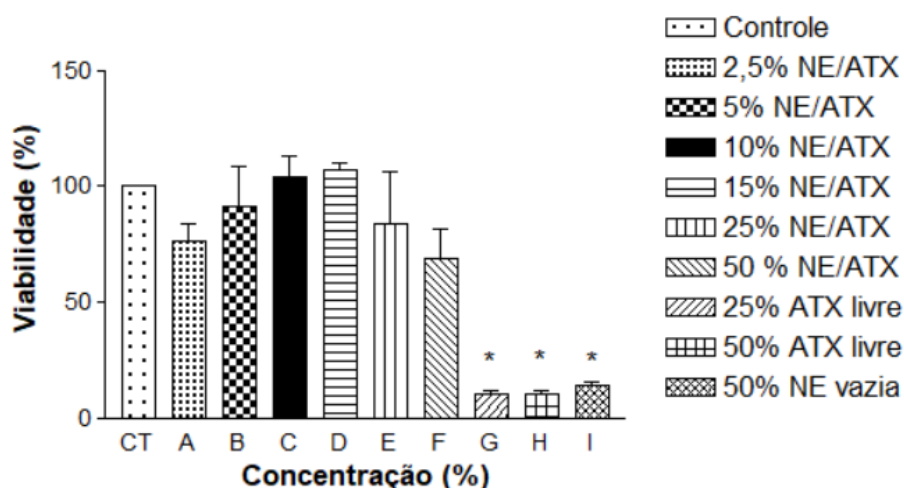
Fonte: Autora

Como pode-se ver, o delineamento do estudo espectroscópico de fluorescência foi concluído com excelência, tendo sido possível a obtenção de imagens 2D e 3D satisfatórias da ATX livre e nanoencapsulada. Através da comparação entre as Figuras 12 e 13, e 14 e 15, percebe-se a manutenção do perfil 3D de fluorescência entre ATX livre e ATX/NE, assim como ocorrido na análise 2D. Sendo assim, é possível afirmar que a astaxantina foi eficientemente encapsulada, e manteve suas propriedades de fluorescência em ambos os ambientes químicos.

4.5 Ensaio de Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado utilizando-se o método da resazurina como descrito na seção 3.2.2.6. Para o NE/ATX foram utilizados teores de 2,5% a 50% e para ATX livre, os teores de 25% e 50%. A ATX livre foi previamente diluída em DMSO. Foi realizado o controle com meio DMEM (com 3% de soro fetal bovino). Foram realizadas as análises estáticas e os resultados estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Ensaio de Citotoxicidade in vitro de NE/ATX na concentração de $34,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ATX em linhagens de fibroblastos de murino NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658) utilizando resazurina, onde CT= controle; A= 2,5% NE/ATX; B= 5% NE/ATX; C= 10% NE/ATX; D= 15% NE/ATX; E= 25% NE/ATX; F= 50% NE/ATX; G= 25% ATX livre; H= 50% ATX livre; I= 50% NE vazia. Foi determinada significância estatística através do teste de análise de variância One-way ANOVA, com 95% de significância, seguido de pós teste Tukey t-test para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).



Fonte: Autora

Através da análise estatística, foi mostrado que apenas as amostras com ATX livre (G e H) e NE vazia (I) apresentaram $*p < 0,05$ em relação ao controle (CT), indicando diferença estatística significativa, ou seja, presença de citotoxicidade.

Considerando que os materiais usados na síntese da NE vazia são biocompatíveis, os resultados apontando citotoxicidade são inesperados. No estudo de Primo (2009), foram realizados ensaios de citotoxicidade *in vitro* em cultura de fibroblastos humanos, os quais verificaram a viabilidade celular das nanoemulsões vazias, semelhantes às preparadas nesse trabalho. Possivelmente, os efeitos citotóxicos podem estar relacionados ao tamanho das nanoemulsões ou ao teor de NE vazia na amostra de tratamento. Para respostas mais precisas, seriam necessários estudos adicionais, testando inclusive a biocompatibilidade do miristato de isopropila utilizado.

Como as amostras de NE/ATX apresentaram a ausência de diferença estatística significativa em relação a CT, conclui-se que não há indícios de citotoxicidade para os teores de 2,5 a 50% de NE/ATX. Esses resultados, portanto, sugerem a biocompatibilidade dos nanomateriais desenvolvidos, criando esperanças para pesquisas futuras com NE/ATX para aplicações biológicas.

No estudo de Hien *et al.* (2023), foram realizados experimentos de citotoxicidade com astaxantina livre e nanopartículas carregadas com astaxantina, em três tipos diferentes de linhagem celular: células de adenocarcinoma de cólon humano (células HT29), células de câncer de fígado humano (células HepG2) e macrófagos murinos (células RAW264.7). Em todas as concentrações utilizadas, variando de 10 a 500 $\mu\text{g/mL}$, não foram observados efeitos de citotoxicidade.

A pesquisa de Karimian *et al.* (2022) também indica a baixa toxicidade de astaxantina em células epiteliais MCF 10A, tanto em 24h quanto em 48h, para concentrações que variam de 1,0 a 100 $\mu\text{mol/L}$, com a ATX dissolvida em DMSO. Com base nessas informações, seria interessante a realização de mais testes investigativos acerca da citotoxicidade da ATX livre, que apresentou resultados diferentes comparando o presente trabalho com os da literatura.

Existe a possibilidade de que as diferenças estejam relacionadas aos diferentes tipos de linhagens celulares e ensaios de citotoxicidade utilizados, sendo que tanto Hien *et al.* (2023) quanto Karimian *et al.* (2022) utilizaram o teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) ao invés da Resazurina. No teste do MTT o DMSO costuma ser adicionado para dissolver os cristais de

formazan que foram criados durante o experimento. Outra possível explicação seria o alto teor de DMSO usado no preparo das soluções (8,8% e 17,6% para G e H, respectivamente), visto que segundo o estudo de Nguyen *et al.* (2020), concentrações de DMSO superiores a 0,6% apresentaram citotoxicidade significativa em 4 linhagens celulares de câncer humano.

Por fim, vale ressaltar a existência de mais alguns pontos negativos no estudo realizado: a presença de desvios relativamente altos, especialmente para B e E, e os valores de viabilidade superiores a 100% em C e D. Estes sugerem uma precisão não tão elevada do experimento, sendo indicada uma repetição do mesmo para conclusões mais assertivas.

5. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que houve o desenvolvimento de uma NE vazia monodispersa ($PDI < 0,25$) e de tamanho próximo ao limite estabelecido para sistemas nanoemulsionados (≤ 500 nm), e de uma NE incorporada com ATX de excelente tamanho de partícula (≤ 100 nm), porém com característica polidispersa ($PDI > 0,95$), ambas as quais apresentaram valores de potencial Zeta negativos e com módulo maior que 30 mV, bem como estabilidade durante o período de análise. Através do método espectroanalítico, foi possível observar a manutenção dos perfis 2D e 3D de emissão de fluorescência entre as amostras de ATX livre e nanoencapsulada, bem como obter gráficos e imagens 3D muito satisfatórias. Além do mais, foi delineada a curva padrão de calibração da mesma, com coeficiente de determinação obtido na ordem de 0,9993, por meio da qual, foi possível obter a concentração de ATX presente na formulação, cerca de 1,393 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde a uma taxa de incorporação de 6,964% para NE/ATX. Os experimentos de citotoxicidade acabaram indicando a citotoxicidade nas amostras com ATX livre e biocompatibilidade nas amostras de NE/ATX, através das análises das diferenças estatísticas significativas. No entanto, o estudo também apontou viabilidades maiores de 100% e desvios relativamente altos e ausência de diferenças estatísticas significativas, levando a uma necessidade de repetir o experimento posteriormente para resultados mais conclusivos.

Embora note-se que a metodologia possa ser melhor trabalhada, sendo possível a investigação de técnicas mais promissoras, que sejam capazes de

contornar os pontos críticos encontrados nesse estudo, os resultados mostraram-se interessantes e abrem caminhos para projetos futuros com este composto promissor que é a astaxantina nanoestruturada.

6. Referências Bibliográficas

APOLINÁRIO, A. C. *et al.* Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais ‘espaço lá embaixo’. **Química Nova**, v. 43, n. 2, p. 212-225, 2020.

BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, 2016.

BRUXEL, F. *et al.* Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012

CHANG, M. X.; XIONG, F. Astaxanthin and its effects in inflammatory responses and inflammation-associated diseases: recent advances and future directions. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5342, 2020.

CODEVILLA, C. *et al.* Incorporação da curcumina em sistemas nanoestruturados: Revisão. **Ciência e Natura**, v. 37, 152 p., 2015.

FARAONE, I. *et al.* Astaxanthin anticancer effects are mediated through multiple molecular mechanisms: a systematic review. **Pharmacological Research**, v. 155, 2020.

GU, W. *et al.* Nanotechnology in the targeted drug delivery for bone diseases and bone regeneration. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2305-17, 2013.

GRAND VIEW RESEARCH. **Astaxanthin Market Size, Share & Trends Analysis Report By Source, By Product (Dried Algae Meal, Oil, Softgel), By Application (Nutraceutical, Cosmetics, Aquaculture and Animal Feed), And Segment Forecasts, 2020 - 2027.** 2020. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/global-astaxanthin-market>. Acesso em: 5 de out. de 2022.

HIEN, H. T. M. *et al.* Astaxanthin-loaded nanoparticles enhance its cell uptake, antioxidant and hypolipidemic activities in multiple cell lines. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 80, 2023.

HUPFFER, H. M.; LAZZARETTI, L. L. Nanotecnologia e sua regulamentação no Brasil. **Revista Gestão e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 153–177, 2019.

JAFARI, Z. *et al.* Nanotechnology-abetted astaxanthin formulations in multimodel therapeutic and biomedical applications. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 2–36, 2022.

KARIMIAN, A. *et al.* Effect of astaxanthin and melatonin on cell viability and DNA damage in human breast cancer cell lines. **Acta Histochemica**, v. 124, n. 1, 2022.

KHALID, N. *et al.* Formulation and characterization of O/W nanoemulsions encapsulating high concentration of astaxanthin. **Food Research International**, v. 102, p. 364-371, 2017.

KUMAR, S. *et al.* Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 9, 2021.

LI, H. **Anti-liver cancer drug prepared from astaxanthin and ginsenoside Rg3 combined composition**. CN111888370A, nov. 2020.

LOCKWOOD, S. F., *et al.* **Composto químico derivado ou análogo de carotenóide, composição farmacêutica, e uso do composto**. Depositante: Cardax Pharmaceuticals, Inc. (US). Procurador: MOMSEN, LEONARDOS & CIA. BR n. PI 0313155-6 B1. Depósito: 29 jul. 2003. Concessão: 06 nov. 2018.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1270-1282, 2000.

MEDHI, J.; KALITA, M. C. Astaxanthin: an algae-based natural compound with a potential role in human health-promoting effect: an updated comprehensive review. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 9, n. 1, p.114-123, 2021.

MOGHASSEMI, S. *et al.* Nanoemulsion applications in photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 351, p. 164-173, 2022.

NGUYEN, S.; NGUYEN, H.; TRUONG, K. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. **Biomedical Research and Therapy**, v. 7, n. 7, p. 3855-3859, 29 jul. 2020.

PAULA, L. B. *et al.* Evaluation of a chloroaluminium phthalocyanine-loaded magnetic nanoemulsion as a drug delivery device to treat glioblastoma using hyperthermia and photodynamic therapy. **RSC Advances**, v. 7, p. 9115-9122, 2017.

PEREIRA, C. P. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 47, n. 1, p. 37-48, 2021.

PORTO, A. S.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 513-527, 2020.

PRIMO, F. L. **Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo in vitro de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão**. 2009. 195 f. 2009. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

REZENDE, N. *et al.* Standardization of a resazurin-based assay for the evaluation of metabolic activity in oral squamous carcinoma and glioblastoma cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26 p. 371–374, 2019.

ROYCHOWDHURY, R. *et al.* Isolation of an exopolysaccharide from a novel marine bacterium *Neorhizobium urealyticum* sp. nov. and its utilization in nanoemulsion formation for encapsulation and stabilization of astaxanthin. **LWT**, v. 151, 2021.

SABIR, F. *et al.* How to face skin cancer with nanomaterials: a review. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 4, 2021.

SANTOS, C. A. **Estratégia para a extração de astaxantina da farinha do resíduo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana**. 2020. 64f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.

SHARONI, Y.; LEVY, J. **Método e composição para reduzir a atividade de inibir o crescimento de uma célula cancerosa, para tratar de paciente com câncer.** Depositante: Lycored Natural Products Industries LTD. (IL). BR n. PI 0214196-5 A2. Depósito: 05 nov. 2002.

SHEPHERD, S. L. [US]. **Method of using astaxanthin for the treatment of diseases, and more particularly, the treatment of cancer.** US11065269B1, jul. 2021.

STACHOWIAK, B.; SZULC, P. Astaxanthin for the food industry. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2666, 2021.

TOPAN, J. F. **Dendrímeros**: uma estratégia para a veiculação de um fármaco anticâncer. 2016. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

YUKUYAMA, M. *et al.* Challenges and future prospects of nanoemulsion as a drug delivery system. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, 2016.