

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**SISTEMA LIPÍDICO NANOESTRUTURADO PARA PREVENÇÃO DE  
NEUROPATIAS E DO ENVELHECIMENTO DO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

**Jéssica Fagionato Masiero**

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia  
-Bioquímica da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Orientador(a):

Prof.(a) Dr.(a) Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo

2019

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas .....	3
RESUMO .....	4
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
1.1 ENVELHECIMENTO .....	5
1.2 ENVELHECIMENTO DO SNC .....	5
1.3 CAROTENOIDES E A VISÃO .....	6
1.4 LUTEÍNA .....	6
1.4.1 LUTEÍNA E ACUIDADE VISUAL .....	8
1.4.2 LUTEÍNA E O CÉREBRO .....	9
1.5 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS .....	9
1.6 HOMOGENEIZAÇÃO A ALTA PRESSÃO .....	10
1.7 REVESTIMENTO COM QUITOSANA .....	11
1.8 NANOTECNOLOGIA E A BHE.....	12
1.9 ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL .....	12
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>13</b>
3.1 MATERIAL.....	13
3.1.1 MATÉRIAS-PRIMAS.....	13
3.1.2 EQUIPAMENTOS.....	13
3.2 MÉTODO.....	14
3.2.1 PREPARAÇÃO DO SISTEMA NANOESTRUTURADO CONTENDO LUTEÍNA.....	14
3.2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	15

3.2.2.1 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO.....	15
3.2.2.2 POTENCIAL ZETA.....	15
3.2.2.3 DETERMINAÇÃO DO pH.....	15
3.2.3 REVESTIMENTO DA NANOEMULSÃO.....	16
3.2.4 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA LUTEÍNA.....	16
<b>4. RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>16</b>
4.1 PREPARAÇÃO DA NANOPARTÍCULA BRANCA.....	16
4.2 PREPARAÇÕES FA E FB CONTENDO LUTEÍNA.....	17
4.3 PREPARAÇÃO FC CONTENDO LUTEÍNA.....	18
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES NAS AMOSTRAS FA, FB E FC.....	18
4.5 REVESTIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS EMPREGANDO QUITOSANA.....	19
4.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	20
4.7 LINEARIDADE.....	21
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>22</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHE	Barreira hemato-encefálica
DA	Doença de Alzheimer
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHM	Diâmetro Hidrodinâmico Médio
DM	Degeneração da Mácula
EE	Eficiência de Encapsulação
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPR	Epitélio pigmentar da retina
IP	Índice de Polidispersão
PZ	Potencial Zeta
SNC	Sistema Nervoso Central
UV	Ultravioleta

## RESUMO

MASIERO, J.F. **Sistema lipídico nanoestruturado para prevenção de neuropatias e do envelhecimento do sistema nervoso central: preparação e caracterização físico-química.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Palavras-chave: luteína, doenças neurodegenerativas, envelhecimento, sistemas lipídicos nanoestruturados.

O envelhecimento do sistema nervoso pode resultar em doenças neurodegenerativas. Essas doenças trazem graves prejuízos ao bem-estar pessoal e àqueles que acompanham esse processo. Por esse motivo, sua prevenção é de fundamental importância tendo em vista a possibilidade de vida longa e plena do paciente. A luteína é um carotenoide encontrado em alimentos e apresenta significativo papel na proteção do sistema nervoso central (SNC), com potencial para atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Essa substância tem capacidade de acúmulo no cérebro e na retina, com potencial ação na prevenção das doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA) e a Degeneração da Mácula (DM). O projeto teve como objetivo a preparação de sistema lipídico nanoestruturado contendo luteína revestido com quitosana. A homogeneização a alta pressão foi empregada para a preparação da formulação usando de 1 a 5 ciclos, e pressão a 600 bar. A caracterização físico-química foi realizada pela determinação das seguintes características: diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE%) da luteína por espectroscopia UV-vis. As nanopartículas lipídicas foram revestidas com quitosana por meio da interação eletrostática entre a partícula e o biopolímero. Foram preparadas três fórmulas contendo luteína (FA, FB e FC), com diferentes tensoativos. O número de ciclos e o tensoativo influenciaram no DHM e IP das formulações. FA apresentou separação de fase após uma semana. FB e FC foram revestidas com quitosana e avaliadas quanto ao DHM, IP e PZ. FC teve adequada estabilidade durante os estudos com DHM, IP e PZ de  $258,0 \pm 2,9$  nm,  $0,15 \pm 0,03$  e  $-21,0 \pm 1,76$  mV, respectivamente. FC-R (FC revestida com quitosana) apresentou DHM, IP e PZ de  $250,2 \pm 3,5$  nm,  $0,20 \pm 0,06$  e  $+0,49 \pm 0,27$  mV, respectivamente. A EE% para FC e FC-R foi de 96,70% e 97,76%, respectivamente. FC e FC-R apresentam potencial uso como agente de prevenção contra neuropatias, até o momento incuráveis.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ENVELHECIMENTO

O ciclo natural da vida contempla o nascimento, o crescimento, o envelhecimento e a morte. Existem muitas teorias para explicar as causas do envelhecimento. A teoria mais aceita descreve o envelhecimento como resultado da diminuição dos telômeros devido a processos de oxidação e pelas mitoses contínuas que as células realizam (NORDON et al., 2009). O envelhecimento está normalmente associado ao acidente vascular cerebral (AVC), câncer, osteoporose, pneumonia, infecções, diabetes, Doença de Alzheimer (DA), degeneração da mácula (DM), entre outras.

## 1.2 ENVELHECIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

Existem vários processos relacionados ao envelhecimento do SNC, como a atrofia cerebral com dilatação de sulcos e ventrículos, perda de neurônios, degeneração granulovacuolar, formação de emaranhados neurofibrilares e placas beta-amilóides (NORDON et al., 2009). As proteínas precursoras amiloides são responsáveis pelo desenvolvimento e adequado funcionamento do cérebro. O excesso de degradação gera o excesso de proteínas beta-amiloides, que por sua vez, geram agregados fibrilares na terminação sináptica, conhecidas como placas senis, que se precipitam e formam os aglomerados proteicos intracelulares (NORDON et al., 2009). Os emaranhados neurofibrilares, entretanto, se formam a partir da proteína tau que pode ser associada aos microtúbulos, causando a perda da função neuronal quando é hiperfosforilada. A formação desses emaranhados também é causada, em parte, pelo acúmulo de proteínas beta-amilóides, ambas causando a morte neuronal. Os emaranhados neurofibrilares também anunciam o declínio cognitivo no decorrer do avanço da DA. No SNC o envelhecimento cerebral é associado à perda de memória e raciocínio lento e a capacidade cognitiva do indivíduo idoso é restringida (DAMOISEAUX, 2017).

Na retina, que também é uma estrutura pertencente ao SNC, o envelhecimento ocorre devido à alta exposição dos olhos a agentes lesivos, como poeira,

microrganismos e a exposição à luz e aos raios ultravioleta (UV) (MENDES, 2008). Essa última, relacionada com o aparecimento de catarata, DM senil e glaucoma (MENDES, 2008).

### 1.3 CAROTENOIDES E A VISÃO

A DM é a principal origem da perda da visão entre a população com mais de 50 anos de idade (OZAWA et al., 2017). De acordo com Kaarniranta et al. (2011), a DM é a “Doença de Alzheimer dos olhos”, pois ambas apresentam identidades equivalentes em sua histopatologia, como a oxidação e a inflamação, além dos depósitos extracelulares contendo as placas beta-amiloides e por não apresentarem uma terapêutica eficiente. A alimentação propícia tem se mostrado essencial na prevenção das doenças relacionadas ao envelhecimento (HAMMOND; RENZI-HAMMOND, 2016). O estudo de Mares et al. (2011) “*Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study*” avaliou aspectos individuais de mulheres entre 55 e 74 anos. Mulheres com alimentação adequada tiveram expectativa 46% menor de desenvolver DM e essa porcentagem aumentou para 71% quando essa dieta foi associada à realização de atividades físicas. Estudo adicional encontrou uma relação entre concentrações superiores de luteína plasmática com redução nas chances do desenvolvimento de demência e de DA (FEART et al., 2015).

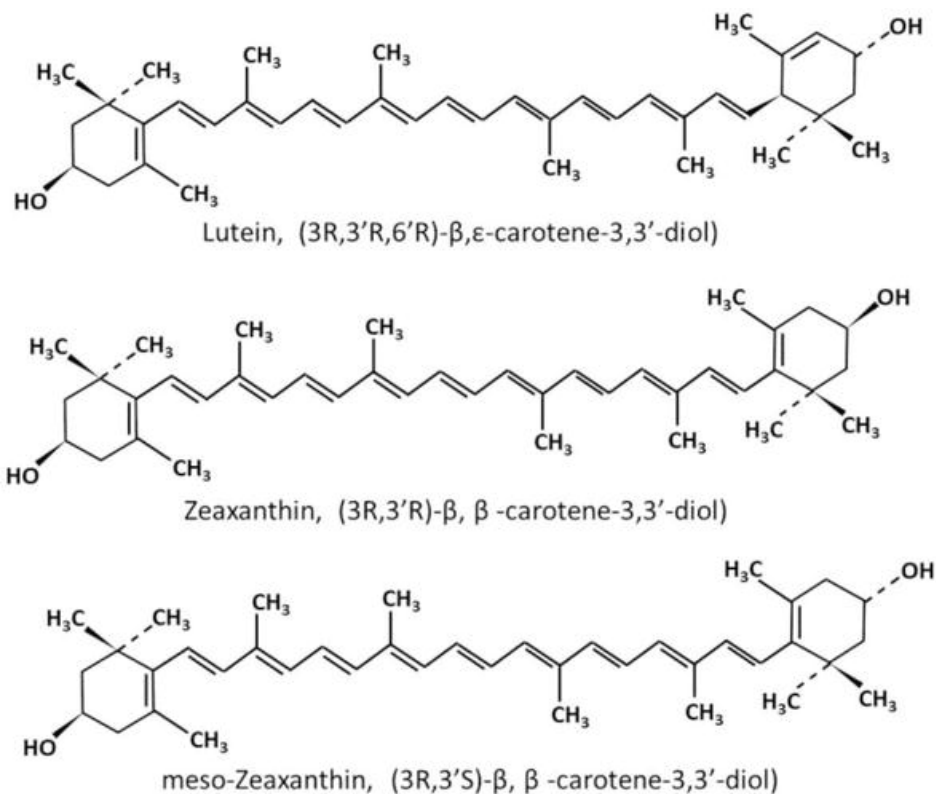
### 1.4 LUTEÍNA

A luteína ( $\beta,\epsilon$ -carotene-3,3'-diol) é um carotenóide presente em vegetais de folhagem verde escura, por exemplo espinafre (*Spinacia oleracea*) e brócolis (*Brassica oleracea var. italica*), e em algumas frutas, por exemplo a laranja (*Citrus X sinensis*) e o mamão (*Carica papaya*) e também na gema do ovo (ASKER; AWAD, 2019). Após o beta-caroteno, a luteína é o carotenóide mais rentável, com valor de mercado de 309 milhões de dólares em 2018 (ASKER; AWAD, 2019). Esse carotenóide se acumula no corpo humano, em especial na região macular da retina compondo o pigmento macular (ASKER; AWAD, 2019), evitando a degeneração da mácula provocada pela luz azul, perigosa e relacionada à foto-oxidação (ERDMAN et al., 2015). A luteína também se aglomera no cérebro, preservando-o e desenvolvendo

atribuição de melhora das funções cognitivas (ERDMAN et al., 2015). Estudos atuais revelam que o uso da luteína, além de aumentar a acuidade visual e evitar a progressão da DM, também previne o câncer, evita a ocorrência de fraturas ósseas e aumenta as funções cognitivas (ASKER; AWAD, 2019).

A absorção da luteína pelo organismo está relacionada a vários processos e sua biodisponibilidade é baixa, entre 2,0 e 9,4%. No intestino delgado a luteína é solubilizada em micelas antes de ser absorvida pelas células da mucosa intestinal, onde sofrem ação de enzimas ou é empacotada pelos quilomícrons. Esses são, então, secretados para o sistema linfático para posteriormente serem transportados até a retina e outros tecidos através da circulação sistêmica (BERNSTEIN et al, 2016). Além disso, o modo pelo qual o alimento contendo luteína é preparado, interfere na absorção da luteína. O tipo de corte e o modo de cozimento do alimento influenciam na liberação de luteína dos cloroplastos e tecidos vegetais. O consumo dos alimentos ricos em luteína e com alta concentração de lipídios, aumenta sua absorção pelo intestino delgado (KAMIL et al., 2016).

Figura 1. Estrutura química dos pigmentos maculares (Adaptado de Nian e Lo, 2018).



### 1.4.1 LUTEÍNA E ACUIDADE VISUAL

O aparecimento e progressão de doenças visuais relacionadas à idade refere-se ao comprometimento cognitivo (ERDMAN et al., 2015). Pode-se usar como biomarcador da concentração de luteína no tecido cerebral, a densidade do pigmento encontrado na retina (ERDMAN et al., 2015). Portanto, a luteína tem capacidade de acúmulo no cérebro, já que a retina também é uma estrutura presente no SNC. As Figuras 2 e 3 apresentam esquema da anatomia do olho e das regiões de acúmulo de pigmento macular.

Estudos com macacos mostraram que quando eles são expostos a dietas regulares, apresentaram aumento na densidade de células do epitélio pigmentar da retina (EPR) na fóvea (região de acúmulo de pigmento macular). Já os animais com alimentação sem xantofilas, pigmento amarelo encontrado na luteína, tiveram declive no centro da fóvea, provavelmente relacionada à menor quantidade de células EPR (ERDMAN et al., 2015). Além disso, sinais de progressão da DM foram aumentados e alguns depósitos chamados de drusas, uma individualidade do aparecimento da DM, apresentaram-se nos macacos que não ingeriram xantofilas quando mais jovens. Observou-se também que danos nas regiões da fóvea foram frequentes, quando ela foi exposta à luz azul. Contudo, na perifóvea (região sem pigmento macular), não houve distinção entre os grupos, mostrando que o pigmento tem atividade de proteção nos olhos (ERDMAN et al., 2015).

Figura 2. Diagrama esquemático da anatomia do olho humano (Adaptado de Nian e Lo, 2018).

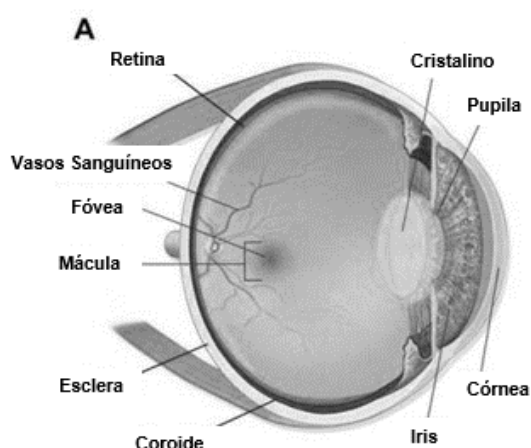
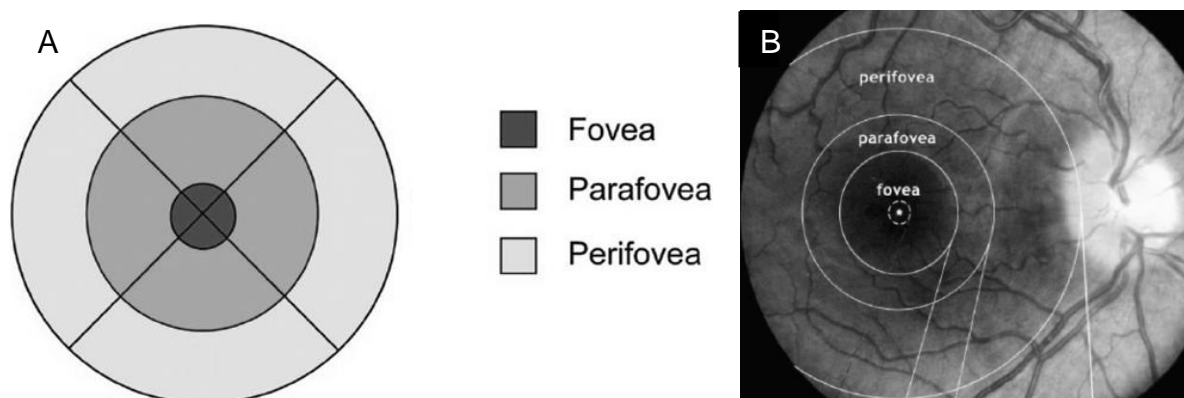


Figura 3. Regiões da mácula: fóvea, perifóvea e parafovea (Adaptado de TURAN-VURAL et al., 2014 [A]; POLYAK SL. e PROVIS et al., 2005 [B]).



#### 1.4.2 LUTEÍNA E O CÉREBRO

Estudo populacional apresentou dados mostrando que dentre os carotenoides, a luteína foi a única correlacionada a parâmetros cognitivos, por exemplo, funções executivas, linguagem, aprendizado e memória (ERDMAN et al., 2015). Adicionalmente, Erdman et al. (2015), mostrou que mulheres com idade avançada, que ingeriram suplementos com luteína (12 mg/d), DHA (800 mg/d), ou uma combinação dos dois suplementos compreenderam um aperfeiçoamento na fluência verbal comparadas com um grupo placebo. O DHA é o ácido docosahexaenoico e juntamente com o EPA (ácido eicosapentaenóico), compõe o ômega-3 (SWANSON; BLOCK; MOUSA, 2012). Do mesmo modo, a memória e o teor de aprendizado também mostraram-se superiores no grupo de combinação do tratamento.

#### 1.5 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

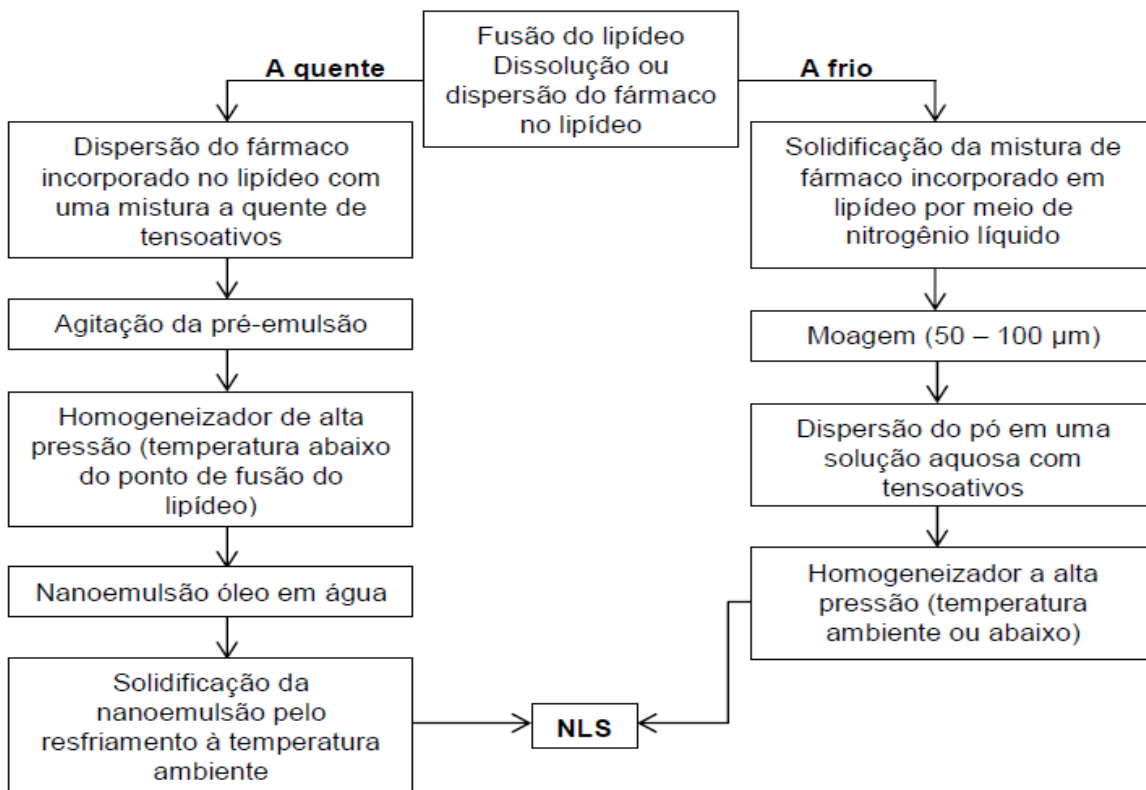
Apesar das vantagens, a luteína apresenta baixa solubilidade em água, limitando sua biodisponibilidade oral. Sendo assim, os sistemas nanoestruturados constituem estratégia para melhorar essa característica. Os sistemas lipídicos nanoestruturados compreendem várias vantagens, dentre elas, a biocompatibilidade e a possibilidade de serem usados por várias vias de aplicação (oral, cutânea, intranasal). Para mais, o tamanho da partícula influencia na segurança e na eficácia do fármaco, devido à maior superfície de contato do fármaco com as células, é possível reduzir a dose, e portanto, elevar a segurança do produto. As nanopartículas

lipídicas são divididas em nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados (AMARAL, 2013). De acordo com Kamil et al. (2016), a nanoencapsulação é um artifício para desenvolver a biodisponibilidade de nutrientes com baixa solubilidade em água, aplicando-se, portanto, à luteína. Vishwanathan, Wilson e Nicolosi (2009), demonstrou que nanoemulsões de luteína pareceram-se com uma micela, porém com maior superfície de contato, maior volume e aumentaram a biodisponibilidade comparada com a luteína livre, não encapsulada.

## 1.6 HOMOGENEIZAÇÃO A ALTA PRESSÃO

Para a preparação das nanopartículas lipídicas, a homogeneização a alta pressão, que permite a obtenção em escala industrial, se encontra entre os métodos mais utilizados. Essa técnica consiste na formação de emulsão por meio de mistura de fase aquosa e de fase oleosa. Essa mistura é inserida no equipamento e exposta à forças de cisalhamento e turbulência. Apesar de as forças de cavitação e de cisalhamento apresentarem-se de grande importância, acredita-se que a turbulência seja o artifício principal para a redução das partículas. A quebra da fase dispersa em pequenas gotículas ocorre devido à turbulência, já a união das fases ocorre devido à colisão das gotículas causada pelo movimento relativo entre elas. Existe um equilíbrio dinâmico entre a quebra e a coalescência das partículas formadas (FLOURY; DESRUMAUX; LARDIÈRES, 2000). A homogeneização à alta pressão utiliza pistão de escala nanométrica, onde o líquido (mistura lipídio e fármaco) é empurrado sob alta pressão (100-2000 bar) e depois acelerado a uma alta velocidade (>1000 km/h). O líquido sofre o rompimento de suas partículas, devido às forças de cavitação formadas, gerando as nanopartículas (MARCATO, 2009).

Figura 4. Fluxograma representativo do processo de obtenção da NLS a quente e a frio por meio do homogeneizador a alta pressão (Adaptado de MARCATO, 2009).



## 1.7 REVESTIMENTO COM QUITOSANA

A quitosana é um polímero eletrólito presente no exoesqueleto dos crustáceos e pode ser obtida pela desacetilação da quitina (MAHMOUD et al., 2011). De acordo com Hong, Lee e Lee (2016), a luteína nanoencapsulada com quitosana, apresenta aumento de 12 vezes na solubilidade da nanopartícula. Em um estudo de Calvo et al. (1996) com indometacina, um anti-inflamatório não hormonal, a natureza específica da quitosana, assim como sua carga positiva, foram responsáveis pelo aumento dessa substância na região ocular. Esse polímero possui característica de muco adesividade e ampliação da penetração, podendo agir como transportador através da mucosa epitelial (ZHU et al., 2012), por essas propriedades, a quitosana tem sido significativamente utilizada para aumentar a permeabilidade de fármacos que possuem baixa biodisponibilidade. Deve-se ressaltar que, além da elevada permeabilidade (ALONSO; SÁNCHEZ, 2003; SABITHA; SAJEETH; SANTHI, 2012) e

da muco adesividade (WADHWA et al., 2009; ZHU et al., 2012), a quitosana possui atividade antimicrobiana (ALONSO; SÁNCHEZ, 2003).

## 1.8 NANOTECNOLOGIA E A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA (BHE)

A BHE tem função de garantir a homeostase cerebral, por meio de uma barreira formada por células endoteliais de capilares cerebrais e seladas por junções oclusivas, que restringem o transporte paracelular (AGOSTINHO, 2013). Existem três fatores para atravessar a BHE: o tamanho molecular (<500 Da), a carga e a lipofilia (AGOSTINHO, 2013). Nanopartículas neutras e de baixas concentrações aniônicas não atravessam a BHE, já as nanopartículas com alta concentrações aniônicas ou catiônicas são tóxicas para a BHE. Entretanto, a entrada de nanopartículas aniônicas é maior do que de nanopartículas catiônicas e neutras (AGOSTINHO, 2013). As nanopartículas com tamanho menor que 100 nm apresentam dificuldade de difusão no parênquima cerebral, mas nanopartículas com 114 nm revestidas com polietilenoglicol (PEG), difundem-se de forma satisfatória no cérebro. O tamanho dos poros no espaço extracelular varia de >200 nm e >100 nm (AGOSTINHO, 2013).

## 1.9 ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL

A administração intranasal tem potencial para atravessar a BHE ao ser utilizado em conjunto com as nanoestruturas (AGOSTINHO, 2013). A via intranasal evita o metabolismo de primeira passagem pelo fígado, aumentando, assim, a biodisponibilidade do fármaco no cérebro (FATOUH; ELSHAFFEEY; ABDELBAR, 2017). Assim, essa pode ser explorada como via alternativa a via oral.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Esse projeto teve como objetivo o estudo e preparação de sistema lipídico nanoestruturado contendo luteína e revestido com quitosana, com potencial ação na prevenção do envelhecimento do sistema nervoso e, por consequência, na prevenção

de neuropatias relacionadas ao envelhecimento. Assim como, a caracterização físico-química da nanoemulsão produzida.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparo e revestimento das nanopartículas contendo luteína.
- Caracterização físico-química da nanoemulsão: diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ).
- Revisão da literatura referente ao envelhecimento do sistema nervoso e o uso da luteína como agente protetor.

## 3. MATERIAL E MÉTODO

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 MATÉRIAS-PRIMAS

Acetato de etila (Sigma-Aldrich, EUA), Luteína (BASF, Alemanha), Metanol (Sigma-Aldrich, EUA), Polissorbato 80 (Sigma-Aldrich, EUA), Poloxamer 188 (Sigma-Aldrich, EUA), Quitosana de baixo peso molecular e grau de desacetilação superior a 85% (Sigma-Aldrich, EUA), Triglicérides de ácido cáprico e ácido caprílico (Mapric, Brasil).

#### 3.1.2 EQUIPAMENTOS

Agitador mecânico Turrax®; Analisador de tamanho de partículas, potencial zeta e índice de polidispersão Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK); Balança analítica; NanoDeBee homogeneizador a alta pressão; Centrífuga; Ultrassom.

## 3.2 MÉTODO

### 3.2.1 PREPARAÇÃO DO SISTEMA NANOESTRUTURADO CONTENDO LUTEÍNA

Foram preparados 50,0 g de cada formulação. Para preparar a fase lipídica, 3,3 g de triglicérides dos ácidos cáprico e caprílico (P.F., 31,6°C) foram transferidos para um béquer de 200 mL e aquecidos à 80°C ou 70°C (dependendo do tensoativo utilizado na fase aquosa, 80°C para polissorbato e 70°C para poloxamer 188). A luteína foi solubilizada nessa fase lipídica de acordo com a técnica descrita por Naseri; Valizadeh; Zakeri-Milani, 2015. Em outro béquer, foi transferido o tensoativo e água purificada. Essa mistura foi aquecida à mesma temperatura da fase lipídica e homogeneizada a 500 rpm, em agitador magnético, até completa dissolução do tensoativo. A fase aquosa foi dispersa na fase lipídica e pré-homogeneizada sob agitação mecânica (10.000 rpm) por 5 minutos utilizando-se agitador Ultra-Turrax®. Essa pré-emulsão foi levada à homogeneização à alta pressão por 5 ciclos de 500 bar, retirando-se 3 amostras: após 1, 3 e 5 minutos de homogeneização e, posteriormente, foi resfriada até atingir a temperatura ambiente (SAKULKHU et al., 2007). A composição de cada formulação preparada está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Composição (% m/m) das formulações branca, FA, FB e FC

Composto	Concentração (% m/m)			
	Branca	FA	FB	FC
Luteína	0,00	0,05	0,05	3,34
Triglicérides dos ácidos cáprico e caprílico	5,00	4,95	4,95	6,66
Poloxamer 188	-	-	1,00	2,00
Polissorbato 80	1,00	1,00	-	-
Água purificada	94,00	94,00	94,00	88,00

## 3.2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

### 3.2.2.1 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO (DHM) E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IP)

O DHM e o IP das nanoestruturas foram avaliados pelo método de espalhamento de luz dinâmico.

O índice de polidispersão foi obtido como medida da largura da distribuição. As preparações foram diluídas na razão adequada com água ultrapura Milli-Q®, em cubeta de poliestireno de 1 cm de caminho óptico. Os resultados corresponderam às médias de três determinações, utilizando ângulo de 90° no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

### 3.2.2.2 POTENCIAL ZETA (PZ)

As determinações de PZ foram realizadas no equipamento Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) pelo método de mobilidade eletroforética, convertida em potencial zeta ( $\zeta$ ) (mV), usando a equação de Henry (Equação 1).

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta}{3 \eta} f(ka) \quad (\text{Equação 1})$$

Em que  $\eta$  e  $\varepsilon$  são a viscosidade e a constante dielétrica, respectivamente, do solvente na temperatura de 25°C.  $U_E$ , mobilidade eletroforética e  $\zeta$  potencial zeta. A força do campo aplicado foi de 20 V/cm. As condições para a determinação do potencial zeta foram determinadas por meio de curva de condutividade versus potencial zeta. A condutividade foi ajustada a 50  $\mu\text{S/cm}$ , empregando solução de NaCl 0,9% (m/v), para evitar as flutuações do PZ causada pela diferença na condutividade.

### 3.2.2.3 DETERMINAÇÃO DO pH

Os pHs das formulações foram determinados em pHmetro Mettler Toledo® utilizando eletrodo de imersão direta, previamente calibrado com soluções-tampão no intervalo entre pH 4,01 e 7,01.

### 3.2.3 REVESTIMENTO DA NANOEMULSÃO

As nanopartículas lipídicas foram revestidas com quitosana a 0,2% (m/m) por meio da interação eletrostática entre as nanopartículas (carregadas negativamente) com a quitosana (de carga positiva) não necessitando de aquecimento, evitando uma nova fusão da fase lipídica (FONTE et al., 2012), sob agitador magnético (100 rpm) por 30 minutos.

### 3.2.4 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA LUTEÍNA

O método para a determinação da eficiência de encapsulação da luteína foi desenvolvido e validado empregando adaptação de método analítico espectroscópico UV-vis a 446 nm, adaptado de Silva et al. (2017). A concentração da luteína foi determinada por meio da centrifugação das nanopartículas empregando ultrafiltro (Amicon®Ultra 100 KDa - 0.5 mL) a 14.500 rpm por 30 min no equipamento Centrifuge 5424-11, Eppendorf® (FAPESP 2014/00638-8). A eficiência de encapsulação (EE%) foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$EE(\%) = \frac{[luteína]_{total} - [luteína]_{não\ encapsulada}}{[luteína]_{total}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PREPARAÇÃO DA NANOPARTÍCULA BRANCA

A nanopartícula branca (Figura 5) foi preparada para o aprendizado da técnica de obtenção das nanopartículas, do funcionamento do homogeneizador a alta pressão e do agitador magnético e dos métodos práticos laboratoriais. Além disso, possibilitou identificar os métodos físico-químicos de caracterização e conhecer as características físico-químicas da nanopartícula na ausência do fármaco.

Figura 5. Aspecto visual da nanoemulsão sem o fármaco (nanopartícula branca).

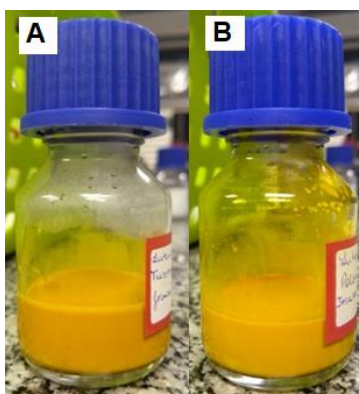


Fonte: O autor

#### 4.2 PREPARAÇÕES FA E FB CONTENDO LUTEÍNA

Posteriormente, foi realizada a preparação de dois sistemas nanoestruturados contendo a luteína. A formulação A (FA) utilizou o tensoativo polissorbato 80 e a fórmula B (FB) utilizou o tensoativo poloxamer 188. A Figura 6 mostra o aspecto visual dessas formulações.

Figura 6. Aspecto visual do sistema lipídico nanoestruturado contendo luteína (FA) polissorbato 80 e (FB) poloxamer 188.



Fonte: O autor

### 4.3 PREPARAÇÃO FC CONTENDO LUTEÍNA

Após a primeira semana de preparação, a fórmula FB, que utilizou o poloxamer 188 como tensoativo, apresentou melhor estabilidade, ou seja, sem separação de fase. Dessa maneira o poloxamer 188 foi o tensoativo selecionado para a obtenção da formulação FC. O método de preparação da FC foi o mesmo utilizado para preparar as formulações FA e FB, descrito no item 3.2.1.

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES NAS AMOSTRAS FA, FB E FC

O DHM (diâmetro hidrodinâmico médio) e IP (índice de polidispersão) são medidos pelo método de espalhamento da luz dinâmica, que é uma técnica utilizada para determinar o tamanho da partícula em suspensões coloidais. As partículas em suspensão apresentam movimentos Brownianos e a luz, então, percorre pelas partículas, que produzem mudanças em seu índice de refração, permitindo a caracterização (HOO et al., 2008). O PZ é o potencial eletrocinético em sistemas coloidais. Ele é o potencial elétrico na interface da bicamada de uma partícula dispersa versus um ponto em uma fase contínua distante da interface. Ou seja, o PZ é a diferença de potencial entre o meio de dispersão móvel e a camada estacionária do meio de dispersão ligada à partícula dispersa (LU; GAO, 2010).

A caracterização físico-química inicial das preparações foi realizada imediatamente após a obtenção das nanoemulsões. Dentre as medições foram determinados o DHM, o IP e o PZ das nanopartículas (Tabela 2). Na Tabela 2 é possível verificar que o número de ciclos interfere no DHM e no IP das nanopartículas. Quanto maior o número de ciclos menor o DHM. Porém, se a quantidade de ciclos se excede, pode ocorrer aumento no DHM, pois as nanopartículas podem formar aglomerados.

Tabela 2. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP) potencial zeta (PZ) das Fórmulas FA, FB e FC, no dia da preparação.

<b>Ciclo</b>	<b>Fórmula</b>	<b>DHM (nm)</b>	<b>IP</b>	<b>PZ (mV)</b>
1	FA	261,2 ± 3,4	0,190 ± 0,022	--
3	FA	241,9 ± 3,2	0,151 ± 0,031	--
5	FA	238,0 ± 0,8	0,128 ± 0,037	-43,5 ± 1,4
1	FB	239,2 ± 4,6	0,136 ± 0,025	--
3	FB	221,3 ± 2,1	0,161 ± 0,033	--
5	FB	217,8 ± 2,4	0,122 ± 0,017	-44,9 ± 0,9
5	FC	258,0 ± 2,9	0,150 ± 0,030	-21,0 ± 1,8

FA: formulação contendo polissorbato 80 como tensoativo. FB: formulação contendo poloxamer 188 como tensoativo. FC: formulação produzida posteriormente, contendo poloxamer 188 como tensoativo (pH 4,13 a 22,6°C).

A Tabela 3 apresenta a caracterização físico-química de FB após uma semana de estabilidade. FA apresentou estabilidade inferior a 7 dias.

Tabela 3. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e índice de polidispersão (IP) de FB, preparada com poloxamer 188, após uma semana de preparação.

<b>Ciclo</b>	<b>Fórmula</b>	<b>DHM (nm)</b>	<b>IP</b>
1	FB	239,8 ± 2,8	0,173 ± 0,008
3	FB	221,9 ± 0,7	0,125 ± 0,033
5	FB	215,5 ± 2,4	0,154 ± 0,043

FB: formulação contendo poloxamer 188 como tensoativo.

#### 4.5 REVESTIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS EMPREGANDO QUITOSANA

As nanopartículas preparadas com poloxamer 188 (FB e FC) foram revestidas com quitosana de baixo peso molecular e grau de desacetilação de 85%. O revestimento com quitosana foi realizado conforme o método descrito no item 3.2.3.

O DHM, IP e PZ das formulações revestidas (FB-R e FC-R) e a comparação com as formulações FB e FC não revestidas estão apresentados na Tabela 4. FC-R apresentou DHM menor do que FC. Isso ocorre devido ao revestimento com quitosana. Esse revestimento exerce uma força de compressão nas nanopartículas, causando a redução no DHM.

Tabela 4. Comparativo entre os dados obtidos anterior e posterior ao revestimento das nanopartículas das amostras B e C (FB e FC *versus* FB-R e FC-R).

<b>Fórmula</b>	<b>DHM (nm)</b>	<b>(IP)</b>	<b>PZ (mV)</b>
FB	215,5 ± 2,4	0,154 ± 0,043	-44,9 ± 0,9
FB-R	226,6 ± 1,6	0,143 ± 0,033	+19,6 ± 0,6
FC	258,0 ± 2,9	0,150 ± 0,030	-21,0 ± 1,8
FC-R	250,2 ± 3,5	0,197 ± 0,064	+0,5 ± 0,3

FB: formulação contendo poloxamer 188 como tensoativo. FB-R: formulação B revestida com quitosana. FC: formulação produzida posteriormente contendo poloxamer 188 como tensoativo (pH 4,13 a 22,6°C). FC-R: formulação C revestida com quitosana (pH 4,70 a 22,5°C).

#### 4.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação (EE%) consiste na quantidade de material (princípio ativo) contido dentro da nanopartícula (SILVA, 2017). Quanto maior o valor, maior é a concentração do bioativo associado à nanopartícula. O valor é obtido de acordo com a equação 2, citada no item 3.2.4. Os resultados obtidos para a eficiência de encapsulação da luteína, da formulação FC e FC-R, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Eficiência de encapsulação das nanopartículas revestidas (FC-R) e não-revestidas (FC).

	EE (%)	C <sub>t</sub> (µg.ml <sup>-1</sup> )	C <sub>a</sub> (µg.ml <sup>-1</sup> )
FC-R	97,76	30,0	0,672
FC	96,70	30,0	0,987

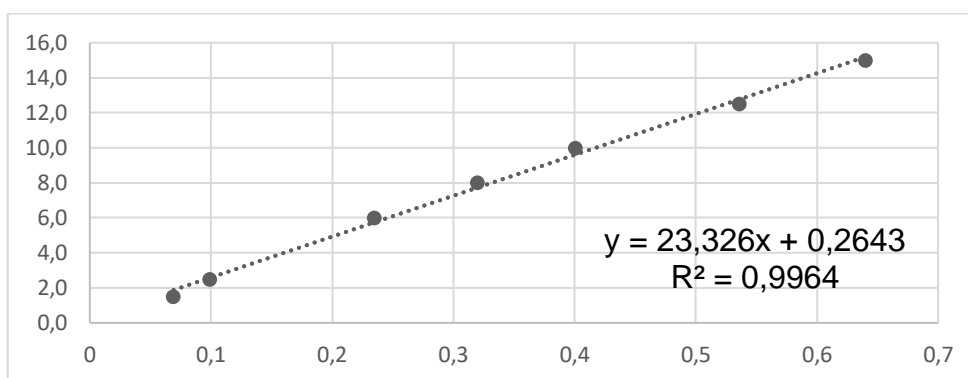
FC: formulação produzida posteriormente contendo poloxamer 188 como tensoativo (pH 4,13 a 22,6°C). FC-R: formulação C revestida com quitosana (pH 4,70 a 22,5°C). C<sub>t</sub>: concentração total de luteína utilizada; C<sub>a</sub>: concentração de luteína na amostra.

A EE% da luteína em FC-R foi de 97,76%, revelando que apenas 2,24% do fármaco permaneceram livres na preparação obtida. Para FC, somente 3,3% permaneceram livres.

#### 4.7 LINEARIDADE

Os resultados da linearidade estão descritos na Figura 7 e Tabela 6. O método se mostrou linear no intervalo de 1,5 ug/ml a 15,0 ug/ml, com coeficiente de correlação  $R > 0,99$ .

Figura 7. Linearidade e equação da reta obtida.



Fonte: O autor.

Tabela 6. Amostras com diferentes concentrações de luteína e suas respectivas absorvâncias.

<b>Concentração (%)</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Absorvância média (nm)</b>
150	15,0	0,640 $\pm$ 0,003
125	12,5	0,536 $\pm$ 0,010
100	10,0	0,401 $\pm$ 0,020
80	8,0	0,320 $\pm$ 0,002
60	6,0	0,235 $\pm$ 0,001
25	2,5	0,099 $\pm$ 0,001
15	1,5	0,069 $\pm$ 0,001

## 5. CONCLUSÃO

O número de ciclos (1 a 5) no processo influenciou o DHM e o IP das preparações FA e FB. O Poloxamer 188 foi o tensoativo selecionado por permitir maior estabilidade da formulação. As formulações FC e FC-R apresentaram DHM de 258,0  $\pm$  2,9 nm e 250,2  $\pm$  3,5 nm, respectivamente. A EE% das formulações FC e FC-R foram 96,70% e 97,76%, respectivamente. As formulações obtidas têm potencial para serem utilizadas futuramente na prevenção do envelhecimento do sistema nervoso e, também, na prevenção de doenças neurodegenerativas.

## 6. REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, Ana Lúcia Gerardo. Nanoestratégias para cedência de fármacos ao SNC e sua aplicação na neurodegeneração. 2013. 31 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

ALONSO, María José; SÁNCHEZ, Alejandro. The potential of chitosan in ocular drug delivery. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, [s.l.], v. 55, n. 11, p.1451-1463, nov. 2003. Wiley-Blackwell.

AMARAL, Lilian Henriques do. PREPARO E AVALIAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE EXTRATO LIPOFÍLICO DE BABAÇU (ORBGNYA SP.). 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

ASKER, Dalal; AWAD, Tarek S. Isolation and characterization of a novel lutein-producing marine microalga using high throughput screening. *Food Research International*, [s.l.], v. 116, p.660-667, fev. 2019. Elsevier BV.

BERNSTEIN, Paul S., et al. Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in retinal and eye research*, 2016, 50: 34-66.

CALVO, Pilar et al. Improved Ocular Bioavailability of Indomethacin by Novel Ocular Drug Carriers. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, [s.l.], v. 48, n. 11, p.1147-1152, nov. 1996. Wiley.

DAMOISEAUX, Jessica S. Effects of aging on functional and structural brain connectivity. *Neuroimage*, [s.l.], v. 160, p.32-40, out. 2017. Elsevier BV.

ERDMAN, John et al. Lutein and Brain Function. *Foods*, [s.l.], v. 4, n. 4, p.547-564, 9 out. 2015. MDPI AG.

FATOUH, Ahmed M; ELSHAFEEY, Ahmed H; ABDELBAR, Ahmed. Intranasal agomelatine solid lipid nanoparticles to enhance brain delivery: formulation, optimization and in vivo pharmacokinetics. *Drug Design, Development And Therapy*, Cairo, v. 11, n. 2017, p.1815-1825, 19 jun. 2017.

FEART, Catherine et al. Plasma Carotenoids Are Inversely Associated With Dementia Risk in an Elderly French Cohort. *The Journals Of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, [s.l.], v. 71, n. 5, p.683-688, 18 ago. 2015. Oxford University Press (OUP).

FLOURY, Juliane; DESRUMAUX, Anne; LARDIÈRES, Jérémie. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 1, n. 2, p.127-134, jun. 2000. Elsevier BV.

FONTE, Pedro et al. Chitosan-Coated Solid Lipid Nanoparticles for Insulin Delivery. *Methods In Enzymology*, p.295-314, 2012. Elsevier.

HAMMOND, Billy R; RENZI-HAMMOND, Lisa M. Perspective: A Critical Look at the Ancillary Age-Related Eye Disease Study 2. *Advances In Nutrition*, [s.l.], v. 7, n. 3, p.433-437, 1 maio 2016. Oxford University Press (OUP).

HONG, da Young; LEE, Ji-soo; LEE, Hyeon Gyu. Chitosan/poly- $\gamma$ -glutamic acid nanoparticles improve the solubility of lutein. *International Journal Of Biological Macromolecules*, v. 85, p.9-15, abr. 2016. Elsevier BV.

HOO, Christopher M. et al. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal Of Nanoparticle Research*, [s.l.], v. 10, n. 1, p.89-96, 20 jun. 2008. Springer Nature.

HORIBA INSTRUMENTS INC. (California - USA). A guidebook to particle size analysis. Irvine: Horiba Scientific, 2016. 32 p.

KAARNIRANTA, Kai et al. Age-Related Macular Degeneration (AMD): Alzheimer's Disease in the Eye?. *Journal Of Alzheimer's Disease*, [s.l.], v. 24, n. 4, p.615-631, 30 maio 2011. IOS Press.

KAMIL, Alison et al. Bioavailability and biodistribution of nanodelivered lutein. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 192, p.915-923, fev. 2016. Elsevier BV.

LU, Guang Wei; GAO, Ping. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. Handbook Of Non-invasive Drug Delivery Systems, [s.l.], p.59-94, 2010. Elsevier.

MAHMOUD, Azza A. et al. Chitosan/sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for ocular drug delivery. International Journal Of Pharmaceutics, v. 413, n. 1-2, p.229-236, jul. 2011. Elsevier BV.

MARCATO, Priscyla. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. Revista Eletrônica de Farmácia, Campinas, v. 6, n. 2, p.1-37, jan. 2009.

MARES, Julie A. et al. Healthy Lifestyles Related to Subsequent Prevalence of Age-Related Macular Degeneration. Archives Of Ophthalmology, [s.l.], v. 129, n. 4, p.470-480, 11 abr. 2011. American Medical Association (AMA).

MENDES, Liana D'urso de Souza. "Análise ergonômica da situação dos idosos pedestres em relação à sinalização de Copacabana: Visão e Envelhecimento. 2008. 233 f. Tese (Doutorado) - Curso de Design, Laboratório de Ergonomia e Usabilidade de Interfaces em Sistemas Humano-tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008. Cap. 2.

NASERI, Neda; VALIZADEH, Hadi; ZAKERI-MILANI, Parvin. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. Advanced Pharmaceutical Bulletin, [s.l.], v. 5, n. 3, p.305-313, 19 set. 2015. International Society for Phytocosmetic Sciences.

NIAN, Shen; LO, Amy C.y.. Lutein and the Aging Eye. Progress In Carotenoid Research, [s.l.], p.1-27, 26 set. 2018. InTech.

NORDON, David Gonçalves et al. PERDA COGNITIVA EM IDOSOS. Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba, Sorocaba, v. 11, n. 3, p. 5-8, 01 set. 2009.

OZAWA, Yoko et al. Absolute and estimated values of macular pigment optical density in young and aged Asian participants with or without age-related macular degeneration. *Bmc Ophthalmology*, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-6, 29 ago. 2017. Springer Nature.

POLYAK SL. *The Retina*. Chicago: University Chicago Press; 1941.

PROVIS, Jan M. et al. Anatomy and development of the macula: specialisation and the vulnerability to macular degeneration. *Clinical And Experimental Optometry*, [s.l.], v. 88, n. 5, p.269-281, set. 2005. Wiley.

SABITHA, K., SAJEETH, C.I. and SANTHI, K. (2012) Chitosan Nanoparticles: A Novel Vehicle for the Enhanced Ocular Delivery of Moxifloxacin HCl. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3, 534-548.

SAKULKHU, Usawadee et al. Production and Characterization of Rice bran extract encapsulated in Solid Lipid Nanoparticles for Dermal Delivery. 2007 2nd IEEE International Conference On Nano/micro Engineered And Molecular Systems, [s.l.], p.1020-1023, jan. 2007.

SILVA, Jéssica Thaís do Prado et al. Analytical validation of an ultraviolet–visible procedure for determining lutein concentration and application to lutein-loaded nanoparticles. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 230, p.336-342, set. 2017. Elsevier BV.

SMITH, Glenn E.. Healthy cognitive aging and dementia prevention. *American Psychologist*, [s.l.], v. 71, n. 4, p.268-275, 2016. American Psychological Association (APA).

SWANSON, Danielle; BLOCK, Robert; MOUSA, Shaker A.. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances In Nutrition*, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-7, 1 jan. 2012. Oxford University Press (OUP).

TURAN-VURAL, Ece et al. Evaluation of macular thickness change after inferior oblique muscle recession surgery. Indian Journal Of Ophthalmology, [s.l.], v. 62, n. 6, p.715-715, 2014. Medknow.

VISHWANATHAN, Rohini; WILSON, Thomas A.; NICOLOSI, And Robert J.. Bioavailability of a Nanoemulsion of Lutein is Greater than a Lutein Supplement. Nano Biomedicine And Engineering, [s.l.], v. 1, n. 1, p.38-49, 9 dez. 2009.

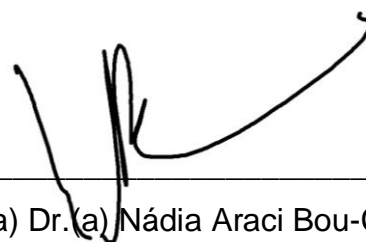
WADHWA, Sheetu et al. Chitosan and its Role in Ocular Therapeutics. Mini-reviews In Medicinal Chemistry, Punjab, v. 9, n. 14, p.1639-1647, 30 dez. 2009.

ZHU, Huayue et al. Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan modified magnetic graphitized multi-walled carbon nanotubes for highly effective removal of a carcinogenic dye from aqueous solution. Applied Surface Science, [s.l.], v. 285, p.865-873, nov. 2013. Elsevier BV.



---

Jéssica Fagionato Masiero



---

Prof.(a) Dr.(a) Nádia Araci Bou-Chacra