

**Marta Vinha Vieira**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS  
CONTENDO CAROTENOIDES DE *Haematococcus pluvialis*  
PARA APLICAÇÃO TÓPICA CUTÂNEA VISANDO  
ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA E FOTOPROTETORA**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Farmácia  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenara Lemos  
Senna

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vieira, Marta Vinha

Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo carotenoides de *Haematococcus pluvialis* para aplicação tópica cutânea visando atividade quimiopreventiva e fotoprotetora / Marta Vinha Vieira ; orientadora, Elenara Lemos Senna, 2017. 145 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Nanotecnologia. 3. Carotenoides. 4. *Haematococcus pluvialis*. 5. Fotoproteção. I. Lemos Senna, Elenara . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Marta Vinha Vieira

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS  
CONTENDO CAROTENOIDES DE *Haematococcus pluvialis*  
PARA APLICAÇÃO TÓPICA CUTÂNEA VISANDO  
ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA E FOTOPROTETORA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Farmácia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Florianópolis, 27 de março de 2017

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof. Dr. Marcelo Maraschin  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Miriam Falkenberg  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof. Dr. Roberto Bianchini Derner  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



Aos meus pais, pelo amor, apoio e incentivo para que esse trabalho fosse realizado.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo carinho, apoio e dedicação durante todos os momentos de minha vida;

Às minhas irmãs, tios e padrinhos, pelo carinho e incentivo sempre.

Ao Carlos, por todo amor, compreensão e companheirismo. Obrigada por estar sempre ao meu lado e acreditar em mim.

À Prof<sup>ta</sup>. Elenara, pelos ensinamentos, dedicação e oportunidade para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos, colegas e professores do Laboratório de Farmacotécnica da UFSC, por estarem presente e compartilharem comigo os momentos de alegria e dificuldades. Em especial à Mari, Sandra, Carine, Fran e Luis, eu não tenho palavras para agradecer vocês. Obrigada por me ouvirem e me ajudarem sempre que precisei, pelo incentivo e por fazerem meu dia-a-dia mais divertido.

Às minhas amigas de coração, pela amizade, pelo estímulo e por entenderem meus momentos de ausência.

À Elis, pelo incentivo, compreensão e pela assistência imensurável com o HPLC.

À Fernanda, do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, pela paciência e ensinamentos compartilhados.

Aos demais colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

À CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

E a todos, que mesmo não citados, colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!





A persistência é o menor caminho do êxito.  
(Charles Chaplin)



## RESUMO

Os carotenoides são compostos naturais, amplamente estudados por suas atividades biológicas. *Haematococcus pluvialis* é uma microalga pertencente à classe Chlorophyceae conhecida por sintetizar e acumular grandes quantidades de carotenoides, principalmente astaxantina. Tal composto é um poderoso agente fotoprotetor contra os efeitos deletérios decorrentes da exposição à radiação UV. Entretanto, o uso tópico de carotenoides contra os processos fotodegradativos possui certas limitações devido à baixa estabilidade e biodisponibilidade inerentes a estes compostos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de suspensões coloidais de nanocápsulas poliméricas contendo uma solução extrativa de *H. pluvialis*, visando à obtenção de uma formulação farmacêutica de uso tópico cutâneo que permita o aumento da estabilidade e eficácia terapêutica dos carotenoides. A solução extrativa foi obtida a partir da biomassa de *H. pluvialis* por um método de ruptura celular seguida por extração com solventes. As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pela técnica da nanoprecipitação com os polímeros PCL e PLGA e a incorporação de diferentes concentrações de solução extrativa foi avaliada. Dentre elas, a formulação preparada com o polímero PLGA contendo 15 mL de solução extrativa (PLGA-SE<sub>15</sub>) mostrou-se a mais estável, apresentando altos teores de carotenoides totais e astaxantina, com uma eficiência de encapsulação de astaxantina superior a 98%. Essa formulação exibiu uma atividade antioxidante pelo ensaio do radical DPPH cerca de 9 vezes maior que a encontrada para o ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, demonstrando o seu potencial biológico contra o estresse oxidativo. Hidrogeis termossensíveis de poloxamer 407 foram preparados e caracterizados com a formulação PLGA-SE<sub>15</sub>, os quais exibiram uma estabilidade satisfatória frente à separação de fases. Os ensaios de liberação *in vitro* dos carotenoides totais demonstraram um perfil de liberação controlado com cinética de ordem zero para o hidrogel preparado com a formulação PLGA-SE<sub>15</sub>, apresentando um percentual liberado de aproximadamente 50% após as 72 horas de experimento. Assim, a suspensão de nanocápsulas contendo carotenoides da microalga *Haematococcus pluvialis*, juntamente com o hidrogel preparado com essa formulação, mostrou ser uma estratégia promissora para obtenção de um produto de uso tópico cutâneo, visando às atividades fotoprotetora e a quimiopreventiva.

**Palavras-chave:** Astaxantina. Atividade antioxidante. Fotoproteção. Hidrogeis termossensíveis. Sistemas de liberação de fármacos.



## ABSTRACT

Carotenoids are natural compounds, widely studied by their biological activities. *Haematococcus pluvialis* is a microalgae belonging to the class Chlorophyceae known for synthesizing and accumulating large amounts of carotenoids, mostly astaxanthin. Such compound is a powerful photoprotective agent against deleterious effects resulting from UV radiation exposure. Nevertheless, topical administration of carotenoids against photodegradation processes has some limitations due to its inherent low stability and bioavailability. Therefore, the main purpose of the present work was to develop colloidal suspensions of polymeric nanocapsules containing an extractive solution from *H. pluvialis*, aiming to obtain a pharmaceutical formulation for topical cutaneous application, which provides an improvement in carotenoids' stability and therapeutic efficacy. The extractive solution was obtained from *H. pluvialis* biomass by a cell rupture method followed by solvent extraction. Nanocapsules suspensions were prepared by the nanoprecipitation technique with PCL and PLGA polymers, and the incorporation of different concentrations of extractive solution was evaluated. Among them, nanocapsules suspension prepared with PLGA containing 15 mL of the extractive solution (PLGA-SE<sub>15</sub>) exhibited higher stability, showing an elevated total carotenoid and astaxanthin content, with an astaxanthin encapsulation efficiency superior than 98%. This formulation displayed an antioxidant activity by the DPPH radical assay about 9 times higher than that found for ascorbic acid, which was used as a positive control, demonstrating its biological potential against oxidative stress. Thermosensitive poloxamer 407 hydrogels were prepared and characterized with the nanocapsules formulation PLGA-SE<sub>15</sub>, which exhibited a satisfactory stability against phase separation phenomena. In vitro release experiments of total carotenoids demonstrated a controlled release profile with zero order kinetics for the hydrogel prepared with the formulation PLGA-SE<sub>15</sub>, presenting a released percentage of approximately 50% after 72 hours of experiment. In view of that, the nanocapsules suspension containing carotenoids from *Haematococcus pluvialis*, jointly with the hydrogel prepared with this formulation, demonstrate to be a promising strategy to obtain a topical cutaneous product, aiming at photoprotective and chemopreventive activities.

**Keywords:** Astaxanthin. Antioxidant activity. Photoprotection. Thermosensitive hydrogels. Drug delivery systems.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática das camadas da pele.....	31
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática das potenciais vias de liberação cutânea de fármacos.....	35
<b>Figura 3.</b> Possíveis mecanismos de neutralização de um radical livre com uma molécula carotenoide (CAR). .....	42
<b>Figura 4.</b> Estrutura química de exemplos de carotenoides dos grupos carotenos (licopeno e $\beta$ -caroteno) e xantofilas (luteína, cantaxantina e astaxantina).....	44
<b>Figura 5.</b> (a) Células de <i>H. pluvialis</i> em crescimento vegetativo e (b) células de <i>H. pluvialis</i> encistada (aplanósporo), com acúmulo de carotenoides como resultado da limitação de nutrientes e luz. ....	46
<b>Figura 6.</b> Estereoisômeros da molécula de astaxantina.....	50
<b>Figura 7.</b> Posicionamento único da molécula de astaxantina na bicamada lipídica celular. Antioxidantes como o $\beta$ -caroteno e a vitamina C se distribuem apenas na parte interna e externa da membrana celular, respectivamente. ....	52
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	58
<b>Figura 9.</b> Esquema do preparo de nanocápsulas poliméricas pelo método da nanoprecipitação.....	59
<b>Figura 10.</b> Espectros de absorção no UV/Vis da solução extrativa de <i>Haematococcus pluvialis</i> (a) e da astaxantina padrão (b). ....	83
<b>Figura 11.</b> Cromatograma obtido na análise da solução extrativa de <i>Haematococcus pluvialis</i> por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no comprimento de onda de 480 nm. (1) Astaxantina livre. ....	85
<b>Figura 12.</b> Curva de calibração da astaxantina padrão obtida por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	86
<b>Figura 13.</b> Mudança no teor de astaxantina livre (astx) na solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> em função do tempo de reação de saponificação. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$ (ns= não significativo). ....	90
<b>Figura 14.</b> Avaliação da estabilidade da astaxantina padrão durante a reação de saponificação. *As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$ (ns= não significativo). ....	91
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas obtidos por CLAE durante o processo de saponificação (a) anterior à hidrólise (b) 2 horas (c) 4 horas. (1) Astaxantina livre.....	92
<b>Figura 16.</b> Micrografias obtidas por TEM da suspensão de nanocápsulas brancas (a e b) e da suspensão de nanocápsulas PLGA-SE <sub>15</sub> contendo carotenoides de <i>H. pluvialis</i> (c e d).....	97
<b>Figura 17.</b> Espectro de absorção de uma suspensão de nanocápsulas brancas de PLGA na faixa de comprimento de onda de 320 a 700 nm. ....	98
<b>Figura 18.</b> Avaliação da estabilidade química da formulação PLGA-SE <sub>15</sub> , com e sem adição de vitamina E, e da solução extrativa livre (SE), armazenadas em diferentes temperaturas durante um período de 30 dias. (a) Teor de carotenoides totais a 5,0 °C; (b) Teor de carotenoides totais a 25 °C; (c) Teor de astaxantina	

livre a 5,0 °C; (d) Teor de astaxantina livre a 25 °C; (e) Teor de astaxantina total a 5,0 °C; (f) Teor de astaxantina total 25 °C. *p < 0,05 quando comparado com o teor inicial (n =3).....	102
<b>Figura 19.</b> Comportamento reológico dos hidrogeis de poloxamer preparados com e sem a adição da suspensão de nanocápsulas PLGA-SE <sub>15</sub> em diferentes temperaturas. (a) HG branco 4,0 °C; (b) HG com PLGA-SE <sub>15</sub> 4,0 °C; (c) HG branco 35 °C; (d) HG com PLGA-SE <sub>15</sub> 35 °C.....	107
<b>Figura 20.</b> Representação dos perfis de transmissão de luz das suspensões de nanocápsulas de PLGA contendo carotenoides de <i>H. pluvialis</i> sujeitas à centrifugação de 4000 RPM a 25 °C.....	109
<b>Figura 21.</b> Representação dos perfis de transmissão de luz de amostras do hidrogel de poloxamer preparado com a formulação PLGA-SE <sub>15</sub> sujeitas à centrifugação de 4000 RPM a 5° e a 25 °C.....	109
<b>Figura 22.</b> Índices de instabilidade das diferentes suspensões de nanocápsulas de PLGA contendo carotenoides de <i>H. pluvialis</i> a 25 °C (a) e do hidrogel preparado com a formulação PLGA-SE <sub>15</sub> a 5,0 °C e a 25 °C (b). .....	110
<b>Figura 23.</b> Curva de calibração de carotenoides de <i>H. pluvialis</i> em tampão fosfato salino pH 7,4 contendo 0,25% de lauril sulfato de sódio (m/V) obtida por espectrofotometria de absorção a 480 nm. ....	111
<b>Figura 24.</b> Perfis de liberação dos carotenoides totais a partir da solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> livre em acetona e dos hidrogeis de poloxamer 407 (Hg) preparados com a solução extrativa livre a nanoencapsulada. *p< 0,05, ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni. ....	112



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Condições utilizadas no modo gradiente de eluição para determinação do teor de astaxantina livre por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	68
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros avaliados para determinação da robustez da metodologia analítica para determinação do teor de astaxantina livre por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	71
<b>Tabela 3.</b> Composição final das formulações brancas. ....	72
<b>Tabela 4.</b> Composição final das formulações de nanocápsulas contendo carotenoides da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> . ....	73
<b>Tabela 5.</b> Valores de resíduo seco e pH da solução extrativa de <i>Haematococcus pluvialis</i> . ....	82
<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos na análise da repetibilidade do método desenvolvido por CLAE para quantificação da astaxantina livre na solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> . ....	87
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos na análise da precisão intermediária do método desenvolvido por CLAE para quantificação da astaxantina livre na solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> . ....	87
<b>Tabela 8.</b> Recuperação da astaxantina livre após adição de solução padrão em amostras de solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> . ....	88
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método desenvolvido por CLAE para quantificação da astaxantina livre na solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> . ....	89
<b>Tabela 10.</b> Caracterização físico-química da suspensão de nanocápsulas brancas. ....	93
<b>Tabela 11.</b> Características físico-químicas das nanocápsulas de PCL contendo a solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> . ....	95
<b>Tabela 12.</b> Características físico-químicas das nanocápsulas de PLGA contendo a solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> . ....	95
<b>Tabela 13.</b> Teor de carotenoides totais das suspensões de nanocápsulas de PLGA contendo a solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> . ....	98
<b>Tabela 14.</b> Teor de astaxantina livre e astaxantina total na suspensão de nanocápsulas de PLGA contendo 15 mL de solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> . ....	99
<b>Tabela 15.</b> Valores de IC <sub>50</sub> obtidos na avaliação da capacidade sequestradora do radical DPPH da solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> livre e nanoencapsulada. ....	100
<b>Tabela 16.</b> Características de tamanho de partícula, potencial zeta, teor de carotenoides totais (CT) e de astaxantina (Astx) do hidrogel de poloxamer 407 contendo a suspensão de nanocápsulas PLGA-SE <sub>15</sub> . ....	105
<b>Tabela 17.</b> Valores de viscosidade e índice de fluxo dos hidrogéis de poloxamer 407 contendo ou não a suspensão de nanocápsulas de PLGA-SE <sub>15</sub> nas temperaturas de 4,0 °C e 35 °C. ....	106
<b>Tabela 18.</b> Valores de r <sup>2</sup> após aplicação dos modelos matemáticos de liberação de fármacos. ....	114



## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1.</b> Determinação de resíduo seco.....	66
<b>Equação 2.</b> Determinação de carotenoides totais.....	67
<b>Equação 3.</b> Limite de detecção.....	69
<b>Equação 4.</b> Limite de quantificação.....	69
<b>Equação 5.</b> Recuperação de astaxantina na amostra de solução extrativa de <i>H. pluvisalis</i> .....	70
<b>Equação 6.</b> Eficiência de encapsulação.....	75
<b>Equação 7.</b> Atividade antioxidante.....	76



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CT</b>	Carotenoides Totais
<b>DAD</b>	Detector de Arranjo de Diodos
<b>DPPH</b>	2,2- Difenil-1-Picril-hidrazila
<b>DPR</b>	Desvio Padrão Relativo
<b>EE</b>	Eficiência de Encapsulação
<b>ERO/ERN</b>	Espécies Reativas de Oxigênio/Nitrogênio
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>HG</b>	Hidrogel de poloxamer 407
<b>ICH</b>	<i>International Conference Harmonization</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração necessária para reduzir em 50% o radical livre DPPH
<b>MCT</b>	Triglicerídeos de Cadeia Média
<b>MET</b>	Microscópico Eletrônico de Transmissão
<b>PCL</b>	Poli (ε-caprolactona)
<b>PDI</b>	Índice de Polidispersão
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PLGA</b>	Poli (ácido lático-co-ácido glicólico)
<b>PLGA-SE<sub>15</sub></b>	Suspensão de nanocápsulas poliméricas de PLGA contendo 15 mL da solução extrativa de <i>H. pluvialis</i>
<b>PLGA-SE<sub>18</sub></b>	Suspensão de nanocápsulas poliméricas de PLGA contendo 18 mL da solução extrativa de <i>H. pluvialis</i>
<b>PLGA-SE<sub>21</sub></b>	Suspensão de nanocápsulas poliméricas de PLGA contendo 21 mL da solução extrativa de <i>H. pluvialis</i>
<b>RPM</b>	Rotações por Minuto
<b>SE</b>	Solução Extrativa de <i>H. pluvialis</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV/Vis</b>	Detector espectrofotométrico na região do Ultravioleta/Visível



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
1.1 OBJETIVOS.....	30
<b>1.1.1 Objetivo geral .....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>30</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>31</b>
2.1 A PELE.....	31
<b>2.1.1 Transporte de fármacos através da pele.....</b>	<b>33</b>
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO .....	36
<b>2.2.1 Fotocarcinogênese .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2.2 Antioxidantes .....</b>	<b>39</b>
2.3 CAROTENOIDES .....	41
2.4 <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	44
<b>2.4.1 Produção .....</b>	<b>47</b>
<b>2.4.2 Astaxantina .....</b>	<b>49</b>
2.4.2.1 Propriedades químicas.....	49
2.4.2.2 Propriedades biológicas.....	51
2.4.2.3 Aplicações comerciais.....	54
2.5 SISTEMAS NANOPARTICULADOS PARA LIBERAÇÃO TÓPICA CUTÂNEA.....	56
<b>2.5.1 Nanocápsulas poliméricas.....</b>	<b>57</b>
2.5.1.1 Preparo e caracterização .....	58
2.6 INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS .....	61
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>65</b>
3.1 MATERIAL .....	65
<b>3.1.1 Matérias-primas .....</b>	<b>65</b>
<b>3.1.2 Solventes e reagentes.....</b>	<b>65</b>
<b>3.1.3 Equipamentos .....</b>	<b>65</b>
3.2 MÉTODOS.....	66
<b>3.2.1 Preparo da solução extrativa a partir da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>.....</b>	<b>66</b>
<b>3.2.2 Caracterização da solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> .....</b>	<b>66</b>
3.2.2.1 Determinação de teor de resíduo seco .....	66
3.2.2.2 Determinação do pH.....	67
3.2.2.3 Determinação do teor de carotenoides totais.....	67
3.2.2.4 Desenvolvimento e validação de método de cromatografia líquida para determinação do teor de astaxantina livre .....	68
3.2.2.4.1 Condições cromatográficas.....	68
3.2.2.4.2 Preparo da amostra.....	68
3.2.2.4.3 Validação da metodologia analítica.....	69

3.2.2.4.3.1 Linearidade .....	69
3.2.2.4.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação .....	69
3.2.2.4.3.3 Precisão .....	70
3.2.2.4.3.4 Exatidão .....	70
3.2.2.4.3.5 Robustez .....	70
3.2.2.5 Determinação do teor de astaxantina total na solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> .....	71
<b>3.2.3 Desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas .....</b>	<b>72</b>
3.2.3.1 Preparo de nanocápsulas brancas (sem carotenoides) .....	72
3.2.3.2 Preparo das nanocápsulas poliméricas contendo carotenoides de <i>H. pluvialis</i> .....	73
<b>3.2.4 Caracterização química e físico-química das nanocápsulas poliméricas.....</b>	<b>73</b>
3.2.4.1 Determinação do diâmetro médio, distribuição granulométrica e potencial zeta .....	74
3.2.4.2 Avaliação da morfologia .....	74
3.2.4.3 Determinação do teor de carotenoides totais.....	74
3.2.4.4 Determinação do teor e eficiência de encapsulação da astaxantina livre nas nanocápsulas e determinação do teor de astaxantina total.....	75
<b>3.2.5 Determinação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> da solução extrativa de <i>H. pluvialis</i> livre e nanoencapsulada pelo método do sequestro do radical livre (DPPH).....</b>	<b>76</b>
<b>3.2.6 Definição da estabilidade química dos carotenoides frente à temperatura.....</b>	<b>77</b>
<b>3.2.7 Preparo e caracterização de hidrogéis termosensíveis contendo as nanocápsulas de PLGA.....</b>	<b>77</b>
3.2.7.1 Determinação do teor de carotenoides totais e de astaxantina livre e total nos hidrogéis .....	77
3.2.7.2 Caracterização reológica .....	78
<b>3.2.8 Definição da estabilidade acelerada das suspensões coloidais e dos hidrogéis.....</b>	<b>78</b>
<b>3.2.9 Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> dos carotenoides da microalga <i>H. pluvialis</i> .....</b>	<b>78</b>
<b>3.2.10 Análise estatística .....</b>	<b>79</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
4.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA OBTIDA A PARTIR DA MICROALGA <i>Haematococcus pluvialis</i> ...	81
4.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA	



EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ASTAXANTINA LIVRE .....	84
<b>4.2.1 Linearidade .....</b>	<b>86</b>
<b>4.2.2 Limites de detecção e quantificação.....</b>	<b>86</b>
<b>4.2.3 Precisão .....</b>	<b>86</b>
<b>4.2.4 Exatidão.....</b>	<b>87</b>
<b>4.2.5 Robustez .....</b>	<b>88</b>
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ASTAXANTINA TOTAL NA SOLUÇÃO EXTRATIVA DE <i>H. pluvialis</i> .....	89
4.4 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS .....	92
<b>4.4.1 Avaliação das características físico-químicas das nanocápsulas .....</b>	<b>92</b>
<b>4.4.2 Avaliação da morfologia .....</b>	<b>96</b>
<b>4.4.3 Determinação do teor de carotenoides totais .....</b>	<b>97</b>
<b>4.4.4 Determinação do teor de astaxantina e eficiência de encapsulação.....</b>	<b>99</b>
4.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DA SOLUÇÃO EXTRATIVA DA MICROALGA <i>H. pluvialis</i> LIVRE E NANOENCAPSULADA.....	99
4.6 DEFINIÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DOS CAROTENOIDES FRENTE À TEMPERATURA.....	101
4.7 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGEIS TERMOSENSÍVEIS CONTENDO AS NANOCÁPSULAS CONTENDO CAROTENOIDES DE <i>H. pluvialis</i> .....	104
<b>4.7.1 Determinação das características físico-química no hidrogel termossensível contendo a suspensão de nanocápsulas de PLGA-SE<sub>15</sub>.....</b>	<b>105</b>
<b>4.7.2 Avaliação das propriedades reológicas dos hidrogéis termossensíveis contendo a suspensão de nanocápsulas .....</b>	<b>106</b>
4.8 DEFINIÇÃO DA ESTABILIDADE ACELERADA DAS SUSPENSÕES COLOIDAI E HIDROGEIS.....	108
4.9 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS CAROTENOIDES EXTRAÍDOS DA MICROALGA <i>H. pluvialis</i> A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS.....	111
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>115</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>119</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>121</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A pele é um órgão metabolicamente ativo e apresenta-se como a principal barreira contra a perda de substâncias endógenas e a penetração de agentes externos no corpo humano (BOUWSTRA, 1997; BOLZINGER et al., 2012). Por constituir uma interface com o meio ambiente, a pele é considerada um órgão alvo de fatores externos como a radiação ultravioleta, ozônio, radiação ionizante e vários compostos químicos tóxicos. A radiação ultravioleta (UV) é considerada um fator etiológico primordial para muitas doenças de pele, sendo a exposição crônica à luz solar desde a infância a principal causa de câncer de pele relatada (ICHIHASHI et al., 2003; SANTIS, 2008). Os raios UVA e UVB são responsáveis por diversas reações de fotossensibilização endógena e danos diretos e indiretos ao DNA, causando a exaustão do sistema de defesa antioxidante dos fibroblastos e um desequilíbrio no redox intracelular. Consequentemente, a exposição crônica à radiação ultravioleta pode levar a reações imunossupressoras, fotoenvelhecimento e, por fim, a fotocarcinogênese (VERSCHOOTEN et al., 2006; CAMERA et al., 2008; SUGANUMA et al., 2010).

A pele possui um sistema complexo de defesa, englobando componentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Quando este sistema de defesa está sobrecarregado ou esgotado, em decorrência de excessivos danos celulares, o emprego de métodos alternativos de proteção torna-se necessário. Dentre eles, podemos citar a reposição de moléculas endógenas, bem como de substâncias que irão aumentar direta ou indiretamente os níveis endógenos dos antioxidantes (GUARATINI et al., 2007).

Atualmente, há um interesse crescente em compostos biologicamente ativos derivados de recursos naturais, especialmente os que podem atuar efetivamente em alvos moleculares envolvidos em várias doenças (AMBATI et al., 2014). Os carotenoides constituem o mais amplo grupo de pigmentos na natureza, abrangendo mais de 700 substâncias já isoladas e caracterizadas. Tais compostos são moléculas lipofílicas e estão presentes em todos os organismos fotossintéticos, sendo produzidos como metabólito secundário de vegetais, algas, fungos e algumas bactérias (BRITTON, 1995; ZAGHDOUDI et al., 2015). Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos evidenciaram que dietas com altas doses de carotenoides estão correlacionadas com a diminuição de uma série de desordens degenerativas e esses efeitos biológicos têm sido atribuídos às propriedades antioxidantes desses compostos

(MATHEWS-ROTH, 1985; BENDICH; OLSON, 1989; COOPERSTONE; SCHWARTZ, 2016).

A microalga *Haematococcus pluvialis* é uma clorófitica que tem recebido estimável atenção das comunidades científica e biotecnológica nos últimos anos por ser considerada a fonte biológica do carotenoide astaxantina mais significativa na natureza (JAIME et al., 2010; WAN et al., 2014). Sob condições ambientais extremas, como alta intensidade de luz ou condições oligotróficas, essa espécie sofre mudanças morfológicas e bioquímicas, incluindo uma intensa biossíntese desse carotenoide (OKADA et al., 2009; SAHA et al., 2013).

A astaxantina apresenta uma propriedade antioxidante excepcional e seus efeitos benéficos para a saúde humana vêm sendo descritos por muitos autores. Estudos têm comprovado diversas atividades biológicas atribuídas ao seu uso, especialmente aquelas que atuam contra os processos foto-oxidativos ocasionados pela radiação UV. Além disso, a astaxantina apresenta atividades anti-inflamatória, quimiopreventiva, hepatoprotetora e imunomoduladora, agindo também na prevenção de desordens cardiovasculares e neurodegenerativas (GUERIN et al., 2003; YANG et al., 2013; ZHANG et al., 2014).

Considerando a prevenção dos processos foto-oxidativos que a pele sofre devido à exposição a fatores exógenos, principalmente a radiação UV, o uso tópico de antioxidantes representa uma estratégia interessante de proteção cutânea. Esse tipo de aplicação apresenta como benefícios o direcionamento da substância ativa à pele exposta, a promoção e o acúmulo da mesma em concentrações farmacológicas e a formação de uma reserva suplementar, à medida que ocorre a exaustão dos sistemas antioxidantes já presentes na pele (PINNELL, 2003; CHEN et al., 2012). Entretanto, o uso tópico de carotenoides contra os processos fotodegradativos oferece certas limitações devido ao grande número de duplas ligações presentes na sua estrutura. Essa particularidade faz com que a molécula de astaxantina, por exemplo, possua grande instabilidade, sendo degradada facilmente na presença de oxigênio, luz e altas temperaturas (TACHAPRUTINUN et al., 2009; ANARJAN et al., 2013). Além disso, a penetração de substâncias com um caráter lipofílico nas camadas mais profundas da pele torna-se um desafio, uma vez que a sua afinidade com o estrato córneo poderia causar a sua retenção na barreira primária da pele (TROMMER; NEUBERT, 2006; SILVA et al., 2010).

Diferentes métodos têm sido propostos para melhorar a estabilidade e a biodisponibilidade de substâncias como a astaxantina, e dentre eles podemos destacar os sistemas nanoparticulados poliméricos.

Nanopartículas poliméricas são carreadores nanométricos que apresentam diâmetros menores que 1  $\mu\text{m}$ , sendo chamadas de nanocápsulas ou nanoesferas, dependendo de sua composição e do método de preparo (GUTERRES et al., 2007). Dentre os carreadores particulados, as nanocápsulas mostram-se mais promissoras por apresentarem uma série de vantagens. Além do seu tamanho nanométrico, que permite uma maior captura intracelular das substâncias encapsuladas, as nanocápsulas também são capazes de proteger a substância ativa frente à oxidação devido à presença do revestimento polimérico, de transportar substâncias insolúveis em água com altos níveis de eficiência de encapsulação e de controlar a liberação (MORA-HUERTAS et al., 2010).

Levando em consideração os aspectos mencionados, o presente trabalho teve como objetivo o preparo e a caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo carotenoides extraídos da microalga *H. pluvialis*, assim como hidrogéis contendo as nanocápsulas para aplicação tópica cutânea, visando à obtenção de uma formulação farmacêutica inovadora com propriedades quimiopreventiva e fotoprotetora.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Preparar e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo carotenoides extraídos da microalga *Haematococcus pluvialis* para aplicação tópica cutânea, visando à obtenção de uma formulação farmacêutica com propriedades quimiopreventiva e fotoprotetora.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar soluções extrativas da microalga *H. pluvialis* ricas em carotenoides;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação de teor de astaxantina livre por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD) na solução extrativa e nas formulações;
- Determinar o teor de astaxantina total após hidrólise dos ésteres de astaxantina, na solução extrativa e nas formulações;
- Preparar nanocápsulas poliméricas contendo carotenoides de *H. pluvialis*;
- Caracterizar as nanocápsulas poliméricas quanto aos parâmetros de tamanho de partícula, potencial zeta e morfologia;
- Determinar o teor de carotenoides totais nas nanocápsulas por metodologia de absorção no visível;
- Determinar o teor e a eficiência de encapsulação da astaxantina livre e total nas suspensões de nanocápsulas;
- Determinar o potencial antioxidante *in vitro* da solução extrativa da microalga *H. pluvialis* livre e nanoencapsulada pelo método de sequestro do radical livre DPPH;
- Definir a estabilidade química dos carotenoides livres e nanoencapsulados frente à temperatura;
- Preparar e caracterizar hidrogeis termossensíveis contendo as nanocápsulas;
- Definir a estabilidade acelerada das suspensões de nanocápsulas e dos hidrogeis contendo as nanocápsulas frente aos fenômenos de separação de fases;
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* dos carotenoides de *H. pluvialis* a partir da solução extrativa livre e nanoencapsulada e dos hidrogeis preparados com as nanocápsulas e com a solução extrativa.

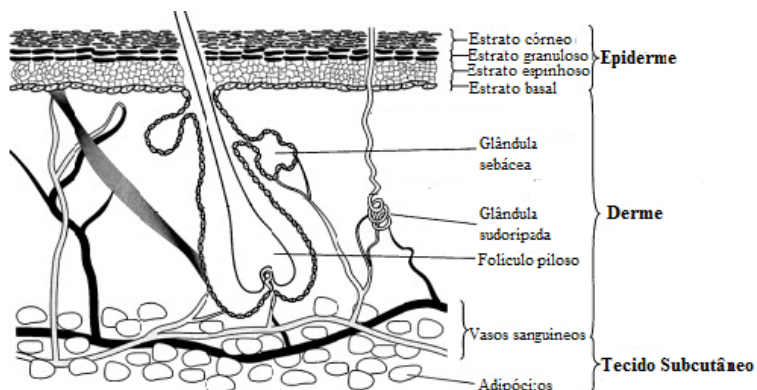
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A PELE

A pele é um órgão metabolicamente ativo e apresenta-se como a principal barreira contra a perda de substâncias endógenas e a penetração de agentes externos no corpo humano (BOUWSTRA, 1997; BOLZINGER et al., 2012). Estruturalmente, caracteriza-se como uma membrana multilamelar, e está envolvida em diversas funções como a regulação da temperatura corporal, síntese de vitamina D3, defesa imunológica e prevenção de lesões térmicas, físicas e mecânicas (LIU et al., 2014).

Este órgão é composto por três camadas tissulares distintas: a epiderme, derme e tecido subcutâneo (Figura 1). A epiderme é a camada mais superficial da pele e consiste de células diferenciadas incorporadas em uma complexa matriz de lipídios, estando em constante autorrenovação. A sua espessura é variável, possuindo de 0,8 a 0,006 mm, dependendo da região do corpo em que ela está localizada. Aproximadamente 95% das células presentes na epiderme são queratinócitos, sendo o restante formado por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (MENON, 2002; HAQUE et al., 2015).

**Figura 1.** Representação esquemática das camadas da pele.



Fonte: Adaptado de Maghraby; Barry; Williams (2008).

A epiderme estratificada é dividida em quatro subcamadas, denominadas de estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. O estrato basal é formado por uma camada única de

células presente na junção dermo-epidérmica, sendo responsável pela renovação contínua da epiderme. Essas células são nucleadas, colunares e compreendem majoritariamente queratinócitos em divisão e dispersos, além de melanócitos, os quais apresentam como função principal a produção de grânulos de melanina armazenados em melanosomos. À medida que os queratinócitos se dividem e se diferenciam, eles progridem em direção à camada mais externa para formar o estrato córneo (RANG et al., 2016).

A camada seguinte, o estrato espinhoso, apresenta como principal característica a presença de desmossomos nas células (ligações proteicas intercelulares), fornecendo uma morfologia espinhosa aos queratinócitos. Gradualmente, essas células começam a se achatar e há o aparecimento de grânulos de queratohialina e corpos lamelares, distintivos da subcamada granular. Na camada granulosa, as células perdem o seu núcleo, os lipídios dos corpos lamelares são liberados no meio intercelular e os filamentos de queratina se agregam formando microfibrilas, fazendo com que a membrana celular seja substituída por um invólucro constituído de proteínas reticuladas com lipídios covalentemente ligados à sua superfície (MENON, 2002; WICKETT; VISSCHER, 2006).

O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme, composta de células queratinizadas mortas inteiramente diferenciadas chamadas de corneócitos. Essa espessa camada, constituída por 10 a 15 subcamadas de corneócitos, apresenta um modelo organizacional do tipo “tijolo e argamassa”. Nele, as células encontram-se circundadas por uma estrutura lipídica lamelar, que promove uma forte coesão entre os corneócitos através da formação de um rígido envelope constituído de lipídios e proteínas (FOLDVARI, 2000; HAQUE et al., 2015). A composição dos lipídios se modifica notavelmente durante a migração celular através dos sucessivos estratos epidermais. Quando o processo de diferenciação é finalizado, os constituintes lipídicos do estrato córneo são o colesterol e seus ésteres, ácidos graxos e ceramidas (BOUWSTRA, 1997; RANG et al., 2016).

A estrutura singular dessa camada, em que os espaços intracelulares ricos em proteínas são hidrofílicos, enquanto os lipídios extracelulares são hidrofóbicos, sugere que apenas substâncias que possuem ambas as propriedades possam penetrar facilmente através do estrato córneo. Dessa forma, em virtude das suas propriedades estruturais, a camada córnea atua como uma importante barreira à permeação, sendo crucial no controle da absorção percutânea de



fármacos e outras substâncias (BUCKS, 1984; AULTON, 2005; LIU et al., 2014).

Logo abaixo da epiderme, localiza-se a derme. Essa camada caracteriza-se pela formação de uma densa matriz hidrofílica composta de proteínas fibrosas (colágeno, elastina e reticulina), as quais fornecem suporte mecânico e elasticidade à pele; e um gel interfibrilar de glicosaminoglicanas, sais e água. A derme é altamente vascularizada por vasos sanguíneos e linfáticos, apresentando também terminações nervosas e apêndices cutâneos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas) incorporados em sua matriz (MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; BARONI et al., 2012).

A região mais interna da pele humana é o tecido subcutâneo, também chamado de hipoderme. Essa camada é composta de adipócitos e possui como principais funções a proteção contra choques mecânicos, isolamento do corpo contra temperaturas extremas e armazenamento de energia (BARONI et al., 2012).

### **2.1.1 Transporte de fármacos através da pele**

A grande superfície da pele torna esse órgão uma rota de interesse para liberação de fármacos, e esta pode ser classificada em liberação tópica, transdérmica e subcutânea. A administração tópica de fármacos fundamenta-se na aplicação direta da substância de interesse na pele, sendo usada para o tratamento de doenças dermatológicas através de uma ampla gama de formas farmacêuticas, como geis, loções, pomadas e cremes. Além disso, essa forma de liberação também é utilizada para anestesia local, tratamento de infecções locais, fotoproteção, cosmética preventiva e estética e terapia fotodinâmica. Dessa forma, para que o fármaco tenha o efeito desejado, o mesmo deve atingir a epiderme viável ou a derme (TROMMER & NEUBERT, 2006; LIU et al., 2014). A aplicação tópica de substâncias ativas mostra-se vantajosa, pois proporciona um efeito local, eliminando a necessidade de terapias com administração sistêmica de fármacos, minimizando assim a dose requerida para obtenção do efeito terapêutico e reduzindo os possíveis efeitos colaterais indesejáveis (GOYAL et al., 2016).

Na liberação transdérmica de fármacos, por outro lado, o objetivo é o alcance do fármaco na derme e, conseqüentemente, na corrente sanguínea, a fim de garantir um efeito sistêmico. O tecido cutâneo é reconhecido como um local atraente para liberação sistêmica devido à sua grande área superficial, acesso conveniente e possibilidade de evitar o metabolismo de primeira passagem no trato gastrointestinal e no

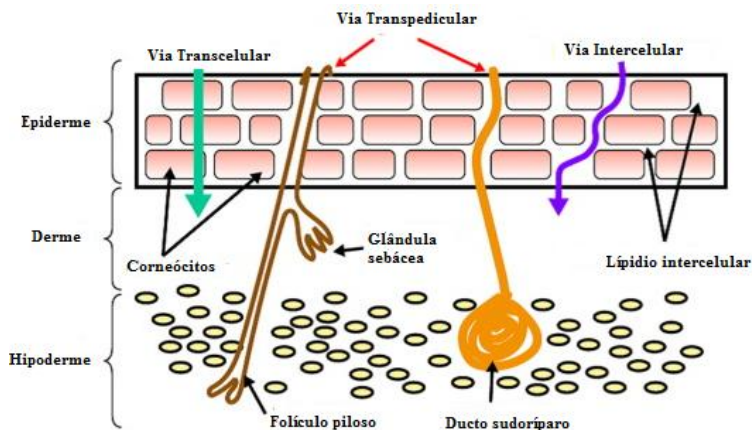
fígado. Outras vantagens da utilização de sistemas transdérmicos seriam a facilidade de aplicação e a possibilidade de prolongamento da liberação, o que permite a redução no número de doses administradas e das flutuações da concentração plasmática, minimizando, assim, os efeitos indesejados do fármaco (MARTINS; VEIGA, 2002; BOLZINGER et al., 2012).

A permeação de fármacos através da pele ocorre por difusão passiva por duas diferentes rotas: transepidérmica, a qual inclui as microvias transeleular e intercelular, e transpedicular, a qual se refere à passagem através dos folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas (Figura 2). Apesar de os apêndices cutâneos corresponderem a apenas 0,1% da superfície da pele, essas estruturas representam uma função de reservatório, atuando como um compartimento anatômico importante para sistemas de liberação nanoparticulados e moléculas ionizadas. Na via intercelular, a substância percorre um caminho contínuo e tortuoso através dos domínios lipídicos intercelulares, enquanto na via transeleular a substância atravessa tanto os queratinócitos quanto as estruturas lamelares lipídicas que circundam as células (MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; VOGT et al., 2016).

Conforme pode ser observado na Figura 2, o transporte transeleular requer sucessivas etapas de partição e difusão entre estruturas polares, representada pela matriz dos corneócitos, e os domínios lipofílicos nos arredores das células. Dessa forma, estima-se que a principal via de transporte de fármacos pelo estrato córneo é a intercelular. Entretanto, o transporte não ocorre por uma via exclusiva; a maioria das substâncias possivelmente permeia a pele por uma combinação de rotas e a contribuição de cada uma está relacionada às propriedades físico-químicas da molécula de interesse (HARDGRAFT, 2004; BENSON, 2012).

O processo de permeação envolve uma série de etapas começando com a liberação do fármaco da forma farmacêutica, seguida da difusão e partição do mesmo através das diferentes camadas da epiderme, até o alcance às camadas mais profundas da pele e/ou à microcirculação cutânea. Essas etapas são altamente dependentes das características físico-químicas do fármaco, como o seu tamanho e forma molecular, solubilidade, grau de ionização, coeficiente de partição e ponto de fusão. Como regra geral, moléculas ideais para permeação cutânea devem ter uma baixa massa molecular, preferencialmente menor que 500 Da, um coeficiente de partição equilibrado ( $\log P$  entre 1-3) e um baixo ponto de fusão (AULTON, 2005).

**Figura 2.** Representação esquemática das potenciais vias de liberação cutânea de fármacos.



Fonte: Adaptado de Erdo e colaboradores (2016).

O tipo de veículo da forma farmacêutica aplicada à pele também possui o potencial de aumentar ou diminuir a solubilidade e/ou difusão de um composto ativo no estrato córneo, afetando, portanto, a penetração do mesmo. Modificações no coeficiente de difusão e partição podem ocorrer quando há a utilização de componentes que promovem uma desorganização da camada córnea, os chamados promotores de permeação, bem como quando há uma interação específica do fármaco com algum componente da forma farmacêutica (BOLZINGER et al., 2012; GUJJAR; BANGA, 2014).

Além das propriedades do fármaco e do veículo, diversos fatores podem influenciar o transporte de substâncias através da pele, incluindo fatores fisiológicos como a condição da pele, o grau de hidratação, a idade, temperatura e região anatômica de aplicação (MOSS et al., 2015). A condição da pele pode ter um impacto significativo no processo de permeação/penetração, especialmente quando a função barreira proporcionada pelo estrato córneo é desordenada ou fluidizada por diversos agentes. Nesse contexto, a permeabilidade pode ser alterada tanto por fatores físicos (clima, oclusão, radiação solar), como químicos (solventes, detergentes, ácidos) e patológicos (doenças e danos mecânicos). Da mesma maneira, a hidratação do estrato córneo é um dos fatores mais importantes para aumentar a velocidade de penetração da maioria dos fármacos, uma vez que a água é capaz de intumescer o

tecido cutâneo, promovendo assim uma descompactação da camada córnea (AULTON, 2005; KIELHORN; MANGELSDORF, 2006).

## 2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio é um elemento indispensável para vida. Quando as células utilizam oxigênio para gerar energia, radicais livres são formados como uma consequência da produção de ATP (adenosina trifosfato) pelas mitocôndrias. Esses subprodutos são geralmente espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), que resultam do processo de redox celular (PHAM-HUY et al., 2008).

A formação dessas espécies desempenha um papel ambíguo no corpo humano, se apresentando como compostos tanto tóxicos, quanto benéficos. Em baixas concentrações, EROs e ERNs são necessárias para o processo de maturação de estruturas celulares, regulação de cascatas sinalizadoras intracelulares, além de ser uma importante arma para o sistema de defesa do organismo. A liberação de radicais livres pelos fagócitos é fundamental para destruir micróbios patogênicos como parte da proteção do corpo humano contra doenças. Todavia, a geração de espécies reativas em excesso promove um processo deletério chamado de estresse oxidativo (DROGE, 2002; VALKO et al., 2007).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e a capacidade do organismo de contra-atacar as suas ações pelo sistema de proteção antioxidante. Portanto, esse processo surge quando há um aumento da geração de EROs/ERNs ou um decaimento na habilidade do sistema endógeno de lutar contra o ataque oxidativo diretamente à biomoléculas (SIES, 1991; PISOSCHI; POP, 2015).

As espécies reativas de oxigênio são representadas por moléculas oxigenadas com radicais livres, ou seja, espécies químicas reativas que possuem um elétron desemparelhado na sua órbita externa; e compostos não-radicalares. Dentre elas, pode-se citar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), o radical peroxila ( $RO_2^{\cdot}$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ); sendo este último relatado como um radical altamente agressivo, responsável pelo dano oxidativo na maioria das biomoléculas. Igualmente, espécies reativas de nitrogênio, ferro, cobre, cloro e enxofre também são encontradas. Os radicais livres são moléculas extremamente instáveis, que possuem um elétron disponível para reagir com vários substratos orgânicos, como lípidios, proteínas e DNA (LUSHCHAK, 2014).

Os radicais livres e outras espécies reativas podem ser gerados tanto de fontes endógenas, quanto de fontes exógenas. No corpo humano, essas espécies são formadas pela ativação do sistema imune, reações inflamatórias, estresse mental, exercício físico intenso, isquemia, infecções, envelhecimento, entre outros. Já os fatores exógenos que podem ativar a produção dessas espécies incluem poluentes/toxinas como fumaça, álcool, determinados fármacos, metais pesados, solventes industriais, pesticidas, ozônio e radiação (COROCHO; FERREIRA, 2013).

O desequilíbrio que ocorre no estresse oxidativo é um importante mediador de danos a estruturas celulares, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas. É reconhecido que a modificação oxidativa de biomoléculas está envolvida em um grande número de processos patofisiológicos, como a arteriosclerose, inflamações, câncer e várias doenças degenerativas. O radical hidroxila é conhecido por reagir com todos os componentes da molécula de DNA, danificando ambas as bases purinas e pirimidinas e o esqueleto desoxirribose. Modificações permanentes no material genético resultantes desse processo oxidativo representam a primeira etapa envolvida na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (VALKO et al., 2006).

A oxidação de lipídios ocorre através da peroxidação lipídica, a qual é um processo envolvendo radicais livres em uma reação em cadeia. A peroxidação ocorre nos ácidos graxos poli-insaturados localizados na membrana celular, e inicia-se com um radical hidroxila removendo um átomo de hidrogênio, formando um segundo radical. Em seguida, há a geração de um radical peroxila pela adição de um átomo de oxigênio; esse radical altamente reativo ataca outro ácido graxo formando um hidroperóxido lipídico (LOOH) e um novo radical. Assim, a reação é propagada, levando à formação de diversos compostos e à desestruturação da membrana celular (GUTTERIDGE, 1995; PORTER; CALDWELL; MILLS, 1995).

As proteínas podem ser modificadas por estresse oxidativo de três maneiras: através de danos oxidativos a um aminoácido específico, pela clivagem de um peptídeo mediada por um radical livre ou pela formação de ligações cruzadas entre proteínas, devido à reação com produtos da peroxidação lipídica. Proteínas contendo aminoácidos como metionina, cisteína, arginina e histidina parecem ser as mais vulneráveis à oxidação. Os danos oxidativos ocasionados por radicais livres em proteínas aumentam a susceptibilidade de proteólise enzimática, e os subprodutos formados podem afetar a atividade de receptores, enzimas e

os mecanismos de transdução de sinal, além de contribuir para o dano em membranas e outras funções celulares (LOBO et al., 2010).

### **2.2.1 Fotocarcinogênese**

Por constituir uma interface com o meio-ambiente, a pele é considerada um órgão alvo de fatores externos como a radiação ultravioleta, ozônio, radiação ionizante e vários compostos químicos tóxicos. A radiação ultravioleta (UV) é considerada um fator etiológico primordial para muitas doenças de pele, sendo a exposição crônica à luz solar desde a infância a principal causa de câncer de pele relatada (ICHIHASHI et al., 2003; SANTIS, 2008). Os efeitos deletérios dessa radiação dependem dos comprimentos de onda de seu espectro, sendo dividida em três classes, UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (200-280 nm). A exposição aos raios UVA e UVB é considerada a mais preocupante, uma vez que os raios UVC são em grande parte bloqueados pela camada de ozônio (SOEHNGE; OUHTIT; ANANTHASWAMY, 1997; SANTOCONO et al., 2006).

O dano induzido pela radiação UVA é mediado pela grande formação de espécies reativas de oxigênio. Por terem um comprimento de onda mais longo, os raios UVA penetram mais profundamente na pele até os tecidos conectivos da derme, causando a exaustão do sistema de defesa antioxidante dos fibroblastos e um desequilíbrio no redox intracelular. Consequentemente, a exposição crônica à radiação UVA e formação excessiva de espécies reativas de oxigênio pode levar a reações imunossupressoras, fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (VERSCHOOTEN et al., 2006; CAMERA et al., 2008; SUGANUMA et al., 2010; MASUMA et al., 2013).

A radiação UVB é a fração mais energética da radiação solar e exerce os seus efeitos adversos principalmente através do dano direto ao DNA. Para se proteger contra os efeitos deletérios da radiação UV, a pele dispõe de vários mecanismos adaptativos, incluindo a resistência ao choque térmico, bloqueio do ciclo celular e reparação do DNA, pigmentação melânica e espessamento da epiderme. Se o dano causado for muito severo e incapaz de ser reparado, a morte celular programada (apoptose) é ativada com o intuito de evitar processos inflamatórios em grande escala (VERSCHOOTEN et al., 2006). Por outro lado, a exposição recorrente, aguda ou de longa duração, aos raios UVB provoca a deterioração gradual da estrutura cutânea e de suas funções. Há evidências de que exista uma maior incidência de mutações no gene supressor de tumor p53 em peles com exposição crônica ao sol, devido

ao estresse oxidativo ocasionado. Mutações neste gene, o qual é responsável pela manutenção da integridade genômica por bloquear a replicação do DNA em resposta a danos ou induzir seu reparo, reduzem sua capacidade em disparar os processos apoptóticos, resultando em maior proliferação celular. Nesse contexto, é possível verificar que alterações em mecanismos regulatórios, como transduções de sinais, mutações em genes específicos, alterações na proliferação celular e no mecanismo de apoptose, podem exemplificar o início do complexo processo carcinogênico, que é a principal preocupação quanto à exposição à radiação UV (GUARATINI et al., 2007; YIN et al., 2013).

### **2.2.2 Antioxidantes**

O conceito de antioxidantes biológicos se refere a qualquer substância que, quando presente em menor concentração que o substrato oxidável, é capaz de atrasar ou prevenir a oxidação causada por estes. Estes compostos também podem ser definidos como qualquer substância que diretamente sequestra EROs ou indiretamente age aumentando as defesas antioxidantes ou inibindo a produção de EROs (COROCHO; FERREIRA, 2013). A função de uma molécula antioxidante implica em diminuir o estresse oxidativo, mutações no DNA, transformações malignas, assim como outros danos celulares. Diversos estudos epidemiológicos comprovaram a habilidade desses compostos em conter os efeitos das espécies reativas de oxigênio, levando a uma diminuição na incidência de câncer e outras doenças degenerativas (TEMPLE, 2000; PISOSCHI; POP, 2015).

A pele possui um sistema complexo de defesa, englobando componentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, presentes no meio aquoso e em compartimentos celulares. O primeiro tipo de sistema de defesa antioxidante contra danos oxidativos são aqueles que previnem a ocorrência de espécies reativas de oxigênio ou que bloqueiam e capturam os radicais que são formados. Outro importante sistema antioxidante das células consiste na reparação de biomoléculas danificadas, antes que elas sejam capazes de alterar o metabolismo celular (SIES, 1997).

Os principais antioxidantes enzimáticos envolvidos na neutralização de espécies reativas de oxigênio são a superóxido dismutase, a qual catalisa a desativação do radical aniônico superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); a catalase, que promove a decomposição de peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); e o sistema glutatona peroxidase/glutatona redutase. Essas enzimas são denominadas de primeira linha na defesa do

corpo humano. Já os representantes metabólicos da classe não enzimática são sintetizados *in vivo*, incluindo compostos como a glutathiona, ácido lipóico, coenzima Q10, arginina, melatonina, proteínas quelantes, entre outros (YOUNG; WOODSIDE, 2001; SINDHI et al., 2013).

Os antioxidantes podem intervir nas diferentes etapas do processo oxidativo, que corresponde a sucessivas etapas de iniciação, propagação e finalização da cadeia. Assim, o mecanismo de ação dessas moléculas pode ocorrer de duas maneiras: pela interrupção dessa reação em cadeia ou por meio de sua prevenção. Um clássico exemplo de reação em cadeia é a peroxidação lipídica; uma vez que um radical libera ou sequestra um elétron, um segundo radical é formado, e este exerce a mesma ação sobre outra molécula, continuando o processo oxidativo até que um radical livre formado seja neutralizado por um antioxidante ou degradado a um produto inerte (PHAM-HUY et al., 2008; PISOSCHI; POP, 2015).

Por outro lado, ao atuar de forma preventiva, os antioxidantes são capazes de reduzir a taxa de reações oxidativas ao inibir a formação de radicais livres, capturar o radical oxigênio singleto, converter metais pro-oxidantes em produtos estáveis e inibir a formação de enzimas pro-oxidantes (ex. lipoxigenases). Além disso, a combinação de antioxidantes preventivos com os antioxidantes finalizadores da cadeia oxidativa pode produzir um efeito sinérgico através de mecanismos de regeneração e estabilização (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; CORROCHO; FERREIRA, 2013).

Quando este sistema de defesa está sobrecarregado ou esgotado, em decorrência de excessivos danos celulares, o emprego de métodos alternativos de proteção torna-se necessário. Dentre eles, podemos citar além da reposição de moléculas endógenas, a ingestão de antioxidantes exógenos, bem como de substâncias que irão aumentar direta ou indiretamente os níveis endógenos dos antioxidantes. Nesse contexto, inúmeras substâncias e classes de compostos naturais têm exercido esse papel com eficiência, como por exemplo, as vitaminas A, C e E; ácidos graxos ômega 3 e 6; os carotenoides e diversos compostos polifenólicos (STEENVOORDEN; HENEGOUWEN, 1997; WOJCIK; BURZYNSKA-PEDZIWIATR; WOZNIAC, 2010).

No estabelecimento do equilíbrio redox celular ou na prevenção de patologias causadas pelo estresse oxidativo, a ingestão de compostos ativos antioxidantes provenientes de produtos naturais é uma prática extremamente difundida, seja pela dieta ou pelo uso de suplementos alimentares (CORROCHO; FERREIRA, 2013). Entretanto,



considerando a prevenção dos processos foto-oxidativos que a pele sofre devido à exposição a fatores exógenos, principalmente à radiação UV, o uso tópico de antioxidantes naturais representa uma estratégia interessante de proteção cutânea. Esse tipo de aplicação apresenta como benefícios o direcionamento da substância ativa à pele exposta, a promoção e o acúmulo da mesma em concentrações farmacológicas e a formação de uma reserva suplementar, à medida que ocorre a exaustão dos sistemas antioxidantes já presentes na pele (PINNELL, 2003; KAUR; KAPILA; AGRAWAL, 2007; CHEN; HU; WANG, 2012).

Os antioxidantes naturais são promissores na prevenção do câncer de pele, uma vez que muitos já mostraram seus efeitos anticarcinogênico e antimutagênico, além de sua baixa toxicidade. Da mesma forma, a administração cutânea de forma contínua desses ativos garante uma proteção contra o fotoenvelhecimento e a diversas reações imunossupressoras. Na pele humana, os antioxidantes mais comuns são as vitaminas A, C e E, carotenoides e várias enzimas (GUARATINI et al., 2007; DARVIN et al., 2011; VARELA et al., 2015).

### 2.3 CAROTENOIDES

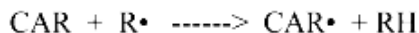
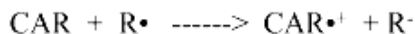
Atualmente, há um interesse crescente em compostos biologicamente ativos derivados de recursos naturais, especialmente os que podem atuar efetivamente em alvos moleculares envolvidos em várias doenças (AMBATI et al., 2014). Os carotenoides constituem o mais amplo grupo de pigmentos na natureza, abrangendo mais de 700 substâncias já isoladas e caracterizadas. Tais compostos são moléculas lipofílicas e estão presentes em todos os organismos fotossintéticos, sendo produzidos como metabólito secundário de vegetais, algas, fungos e algumas bactérias. Os animais são incapazes de fazer a biossíntese de carotenoides, portanto, dependem da sua ingestão pela dieta (BRITTON, 1995; ZAGHDOUDI et al., 2015).

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos evidenciaram que dietas com altas doses de carotenoides estão correlacionadas com a diminuição de uma série de desordens degenerativas, incluindo vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares e oftalmológicas, além de aumentar as defesas imunológicas do organismo. Esses efeitos biológicos têm sido atribuídos às propriedades antioxidantes dessas substâncias, principalmente através da captura de duas espécies reativas de oxigênio, o oxigênio singlete e o radical peroxila. Além disso, os carotenoides são eficientes desativadores de moléculas sensibilizantes excitadas eletronicamente, que estão envolvidas na geração dessas

espécies reativas (MATHEWS-ROTH, 1985; BENDICH; OLSON, 1989; COOPERSTONE; SCHWARTZ, 2016).

A interação dos carotenoides com o oxigênio singleto depende amplamente de uma neutralização física, que envolve transferência direta de energia entre ambas as moléculas. A energia do oxigênio singleto é transferida para a molécula do carotenoide, resultando em um oxigênio no estado fundamental e um carotenoide no estado excitado tripleto. Por fim, a molécula carotenoide retorna ao seu estado fundamental dissipando a sua energia por interação com o solvente circundante, podendo ser reutilizada várias vezes no processo de neutralização (TRUSCOTT, 1990; WIKI, 1991; UENOJO et al., 2007). Alguns dos possíveis mecanismos de neutralização de radicais livres através de interação com uma molécula carotenoide encontram-se na Figura 3.

**Figura 3.** Possíveis mecanismos de neutralização de um radical livre com uma molécula carotenoide (CAR).



Fonte: Adaptado de Krinsky; Yeum (2003).

Entre os vários radicais que são formados sob condições oxidativas no organismo, os carotenoides reagem mais eficientemente com os radicais peroxila. Eles são gerados no processo de peroxidação lipídica, e o sequestro dessas espécies interrompe a sequência de reações que levariam a danos nos compartimentos lipofílicos. Devido à sua lipofilicidade e a propriedade específica para capturar radicais peroxila, os carotenoides exercem um papel importante na proteção das membranas celulares e lipoproteínas (STAHL; SIES, 2003).

Quimicamente, os carotenoides são tetraterpenos formados a partir de oito unidades isoprenoides, sendo suas estruturas baseadas em uma cadeia linear poliênica de 40 carbonos, apresentando ligações duplas conjugadas (3-13) ao longo da mesma (RODRIGUEZ-AMAYA,

1997; ESTEBAN et al., 2015). Esta estrutura básica acíclica pode modificar-se de diversas maneiras como, por exemplo, por hidrogenação, isomerização, ciclização, introdução de funções com oxigênio ou a combinação destes processos, resultando em uma grande diversidade de estruturas químicas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

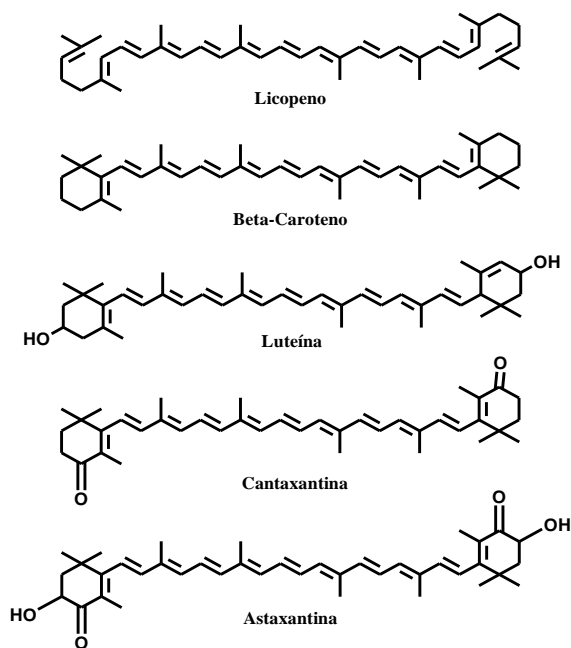
A função biológica dos carotenoides está intimamente ligada às propriedades físico-químicas dessas moléculas, sendo essas propriedades definidas pela sua estrutura molecular. A geometria molecular geral, como tamanho, forma e presença de grupos funcionais, é vital para garantir que os carotenoides se encaixem nas estruturas celulares e subcelulares na localização e orientação correta, para que possam assim exercer seu papel com eficiência. Além disso, o sistema de duplas ligações conjugadas dos carotenoides constitui o grupamento cromóforo que fornece as propriedades fotoquímicas e a reatividade eletroquímica dessas moléculas, formando a base para a sua identificação e para a sua ação antioxidante (BRITTON, 1995). É descrito na literatura que são necessárias pelo menos sete duplas ligações conjugadas para que uma molécula carotenoide produza cor, sendo que essa coloração é acentuada à medida que há a extensão do sistema conjugado, variando do amarelo suave ao vermelho intenso. Em relação à capacidade dos carotenoides de capturar o oxigênio singleto, tem sido relatado que a presença de nove ou mais duplas conjugadas concedem a essas moléculas o máximo de ação antioxidante (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Por outro lado, os carotenoides com uma estrutura altamente insaturada possuem uma propensão à isomerização e oxidação. Fatores como luz, calor e acidez promovem a isomerização de carotenoides da forma *trans*, sua configuração usual, para forma *cis*, o que resulta em alguma perda da cor e da atividade pró-vitamina A. Em contraste, a degradação oxidativa, que é a principal causa de uma perda extensiva do teor de carotenoides, depende da disponibilidade de oxigênio e é estimulada pela luz, enzimas e metais. O passo inicial para o processo degradativo parece ser a formação de epóxidos e apocarotenoides (carotenoides com esqueleto carbônico encurtado) com subsequente fragmentação, o que implica na formação de uma série de compostos de baixo peso molecular semelhantes aos produzidos na oxidação de ácidos graxos. Dessa forma, a perda total da cor e de suas atividades biológicas são as consequências finais da degradação oxidativa desses compostos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os compostos carotenoides são classificados em duas classes, os carotenos e as xantofilas (Figura 4). Os carotenos são hidrocarbonetos

poli-insaturados que não apresentam oxigênio em sua estrutura, e normalmente apresentam uma cor laranja. Nesta classe inclui-se o licopeno e os  $\beta$ -,  $\alpha$ - e  $\epsilon$ -carotenos. Já as xantofilas resultam da oxidação de carotenos e contêm um ou mais grupos oxigenados em determinados locais dos anéis terminais. As funções oxigenadas mais comuns são o grupo hidroxila (OH) presente na luteína, zeaxantina e na criptoxantina, e o grupo cetônico (C=O) na cantaxantina; na astaxantina, ambos os grupamentos hidroxila e cetônico estão presentes (RICARDO, 2013).

**Figura 4.** Estrutura química de exemplos de carotenoides dos grupos carotenos (licopeno e  $\beta$ -caroteno) e xantofilas (luteína, cantaxantina e astaxantina).



Fonte: Adaptado de Socaciu; Lausch; Diehl (1999).

## 2.4 *Haematococcus pluvialis*

Nos últimos anos, houve um crescente interesse no cultivo de microalgas visando à produção de biomassa para obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial, como pigmentos, proteínas, ácidos graxos insaturados, entre outros que despertam o

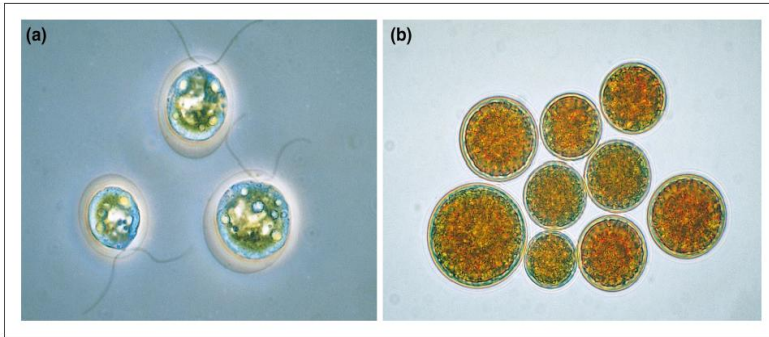
interesse das indústrias alimentícia, química, cosmética e farmacêutica (DERNER et al., 2006).

No ambiente natural, assim como em cultivos, o crescimento de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, tais como as taxas metabólicas da espécie cultivada e a possível influência de outros organismos sobre o seu desenvolvimento, e fatores físico-químicos, como luminosidade, temperatura e salinidade. Dessa forma, para sobreviver em ambientes competitivos e às adversidades do meio, as microalgas têm desenvolvido estratégias de defesa, que resultam em um significativo número de mudanças físico-químicas e estruturais (DERNER et al., 2006; CARDOZO et al., 2007).

A microalga *Haematococcus pluvialis*, descrita inicialmente por von Flotow em 1844, foi enquadrada taxonomicamente na classe Chlorophyceae, ordem Chlamydomonadales, família Haematococcaceae; e tem recebido estimável atenção das comunidades científica e biotecnológica devido à sua capacidade de sintetizar grandes quantidades de carotenoides, principalmente astaxantina (JAIME et al., 2010; GUIRY, 2016). Essa espécie ocorre normalmente em poças temporárias de água doce, podendo apresentar polimorfismo celular durante o seu ciclo de vida dependendo das condições ambientais. Os quatro estágios celulares da *H. pluvialis* são classificados como microzooides flagelados, macrozooides flagelados, células palmeloides móveis e hematocistos ou aplanósporos (SANTOS, 2015).

Em condições favoráveis de crescimento, as células são verdes, móveis e biflageladas (Figura 5a), compreendendo os dois primeiros estágios. Todavia, durante condições ambientais extremas, como limitação de nutrientes, alta intensidade de luz e altas concentrações de sais, as células modificam-se morfológicamente e bioquimicamente visando à sua sobrevivência. Dentre as principais mudanças que podem ocorrer nesse processo, pode-se citar a perda da mobilidade, aumento do tamanho da célula, formação dos hematocistos (estágio final), espessamento da parede celular e aumento da biossíntese de lipídios e carotenogênese (Figura 5b). Ainda, é importante ressaltar que se as condições ambientais ou de cultivo retornarem ao normal, os aplanósporos iniciam um novo ciclo de crescimento vegetativo (BOUSSIBA, 2000; SAHA et al., 2013).

**Figura 5.** (a) Células de *H. pluvialis* em crescimento vegetativo e (b) células de *H. pluvialis* encistada (aplanóspero), com acúmulo de carotenoides como resultado da limitação de nutrientes e luz.



Fonte: Lorenz; Cysewski (2000).

Neste processo de transformação, há um expressivo aumento no conteúdo de carboidratos na parede celular da forma encistada, podendo atingir até 70%. A resistência dessa estrutura é proporcionada especialmente pelo alto teor de hexose e celulose, além de proteínas e outros compostos resistentes (SARADA et al., 2006). Um aumento no conteúdo de lipídios também é observado, provavelmente pela necessidade de acomodar os carotenoides em glóbulos no interior da célula. Devido ao caráter hidrofóbico dessas substâncias, é possível que os ácidos graxos acumulados sirvam como uma matriz para solubilizar os pigmentos formados, permitindo a permanência dos carotenoides no citoplasma (LANG, 1968; SANTOS; MESQUITA, 1984; LEE; ZHANG, 1999).

A mudança mais pronunciada durante o encistamento é, certamente, a elevada biossíntese de astaxantina. Nas células móveis, clorofila e carotenoides como a cantaxantina, luteína e  $\beta$ -caroteno são os componentes majoritários do conteúdo total de pigmentos, fazendo com que a célula seja da cor esverdeada. Assim que o encistamento é induzido, as atividades fotossintéticas diminuem e a quantidade de astaxantina na célula aumenta drasticamente. No fim do processo, a astaxantina livre e seus ésteres constituem até 95% do total de carotenoides, podendo chegar a 4,0% do peso seco total da célula. Neste contexto, a microalga *Haematococcus pluvialis* é reconhecida atualmente como a fonte biológica de astaxantina mais significativa da natureza (BOUSSIBA, 2000; JAIME et al., 2010; WAN et al., 2014). A fração de carotenoides dos cistos de *H. pluvialis* contem em torno de

70% de mono-ésteres de astaxantina, 10% de di-ésteres e 5,0% de astaxantina livre, sendo o restante constituído de outros carotenoides (LORENZ; CYSEWSKI, 2000; YUAN; CHEN, 2000).

Os carotenoides primários, que ocorrem nas células vegetativas de *H. pluvialis*, são componentes essenciais para sobrevivência dessa espécie, onde atuam no mecanismo fotossintético como auxiliares na coleta de luz e transferência de energia, além de ser um estabilizador estrutural. Por outro lado, os carotenoides que se formam como metabólitos secundários após a exposição a estímulos ambientais, como a astaxantina, possuem principalmente uma função fotoprotetora e inibidora da oxidação por radicais livres. O estresse oxidativo induzido pela luminosidade intensa, por exemplo, desempenha um papel fundamental na biossíntese da astaxantina; as espécies reativas de oxigênio, geradas pelo mecanismo de foto-oxidação ocasionada pela alta irradiação de luz, aparentemente ativam a síntese de carotenoides como parte de uma estratégia celular destinada à proteção celular contra o dano oxidativo (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 2002; GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011). Este processo de fotoproteção pode ser alcançado não só através da dissipação do excesso de energia pelos tilacoides, como também pela formação de uma camada de proteção solar de gotículas de óleo ricas em carotenoides na periferia dos cloroplastos ou no corpo celular (VARELA et al., 2015).

### **2.4.1 Produção**

Nas últimas décadas, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para a produção natural de astaxantina a partir da microalga *Haematococcus pluvialis*. Embora essa espécie possa ser induzida a acumular astaxantina sob condições de crescimento heterotróficas ou autotróficas em ambientes fechados, muitos produtores comerciais normalmente aproveitam-se da luz solar abundante dos ambientes externos. Exemplos utilizados atualmente incluem os fotobioreatores (com luz artificial) e uma combinação de fotobioreatores com lagoas de cultura a céu aberto (LORENZ; CYSEWSKI, 2000; OLAIZOLA; HUNTLEY, 2003).

As condições de cultura que favorecem a produção de biomassa de *H. pluvialis* são incompatíveis com o estresse necessário para induzir a biossíntese de astaxantina nas células, portanto, as estratégias de produção devem levar em consideração as características fisiológicas da microalga, sendo divididas em um processo com duas etapas. Na primeira etapa, há a produção de uma grande quantidade de células no

estado vegetativo, seguida por uma fase em que a carotenogênese e o acúmulo de astaxantina são induzidos. Para um rápido crescimento das células verdes, parâmetros como ótimos níveis de nutrientes, pH, temperatura e luz devem ser cuidadosamente monitorados e controlados. Nesse quesito, cultivos em espaços fechados possuem a vantagem de permitir um controle ambiental, manter altos padrões de higiene e a qualidade do produto. Esses fatores são de grande importância, uma vez que a *H. pluvialis* é uma microalga de água doce, sendo susceptível a competição e a contaminação por outros micro-organismos que podem se favorecer das condições de crescimento dos tanques de cultivo (JOHNSON; AN, 1991; ZHANG et al., 2009; HERRERA et al., 2012).

Após a produção de um volume suficiente de células vegetativas, as culturas são submetidas a um estresse ambiental e/ou nutricional. Uma estratégia muito utilizada nesse processo é a diluição da cultura verde, que proporciona rapidamente uma diminuição da concentração de nutrientes no meio e aumenta a quantidade de radiação recebida por célula. Esta técnica, em combinação com outros fatores estressantes, como aumento da temperatura e salinidade, além da privação de ferro, nitratos e fosfatos, fornece um ambiente adequado para o rápido acúmulo de astaxantina pelas células da microalga *H. pluvialis*. Diferentemente da produção de células vegetativas, o uso de tanques abertos é apropriado para fase da carotenogênese, uma vez que a etapa de obtenção dos aplanósporos (cistos vermelhos) é caracterizada pelo uso de condições de cultura que são inaceitáveis em crescimento acelerado, incluindo aquelas para qualquer tipo de contaminante (OLAIZOLA; HUNTLEY, 2003).

Em torno de 5-6 dias após a cultura ser submetida ao estresse, as células já sofreram todas as mudanças morfológicas e bioquímicas (conteúdo de astaxantina livre em torno de 1,5 a 3%), estando prontas para a coleta. Por passarem por um aumento de tamanho e serem mais densos que o meio, os aplanósporos de *H. pluvialis* podem ser coletados por decantação e subsequente centrifugação (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

Uma das modificações características da condição de estresse, além do acúmulo da astaxantina, é a formação de uma espessa parede celular nos cistos vermelhos. Dessa forma, para os consumidores obterem os benefícios de uma suplementação com astaxantina, os cistos produzidos devem ter essa parede rompida. Para o término do processo, é necessário fazer a secagem das células para reduzir o conteúdo de água, especialmente porque sem a proteção da parede celular do cisto, a astaxantina se torna muito susceptível à degradação ao ficar exposta a



fatores externos como o oxigênio, luz e altas temperaturas (OLAIZOLA, 2007).

## 2.4.2 Astaxantina

### 2.4.2.1 Propriedades químicas

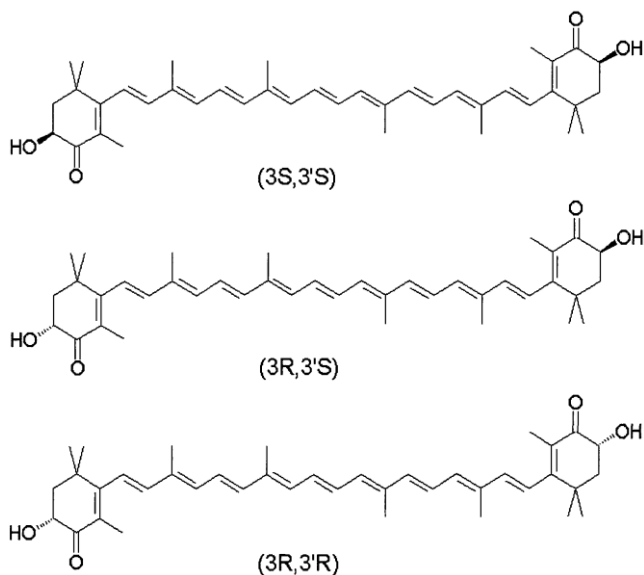
A astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno-4,4'-diona) é um carotenoide pertencente à subclasse das xantofilas, a qual é caracterizada pela presença de átomos de oxigênio em sua estrutura. Este carotenoide é ubíquo na natureza, especialmente nos ambiente marinhos, sendo um pigmento vermelho comum em diversos animais aquáticos como salmão, camarão e lagosta, contribuindo para a coloração rosada dos mesmos devido à ingestão de microalgas sintetizantes através dos zooplâncton (LORENZ; CYSEWSKI, 2000). Tal substância, além de ser biossintetizada pela microalga *Haematococcus pluvialis*, também pode ser encontrada em algumas leveduras, bactérias e outras microalgas; entretanto, em menor quantidade e em diferentes configurações químicas (HERRERO et al., 2012).

A molécula de astaxantina consiste de dois anéis terminais ligados por uma cadeia poliênica, diferindo-se de outros carotenoides pela presença de grupamentos hidroxila (-OH) e cetona (C=O) em ambas as suas extremidades (Figura 6). Assim, a sua estrutura confere à molécula uma maior polaridade, além de permitir a formação de dois carbonos assimétricos localizados nas posições 3 e 3' dos anéis  $\beta$ -ionona, devido à presença dos grupamentos hidroxilas (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006; AMBATI et al., 2014).

A forma livre da astaxantina é muito sensível à oxidação; portanto, na natureza, este carotenoide normalmente existe conjugado às proteínas, como em exoesqueletos de crustáceos, ou na forma de ésteres de ácidos graxos. Neste último caso, quando uma das hidroxilas reage com uma cadeia de ácido graxo, há a formação de um mono-éster; enquanto na sua forma di-éster ambas as hidroxilas dos anéis (3 e 3') são esterificadas. A esterificação da astaxantina acontece após a sua biossíntese em micro-organismos, conseqüentemente, aumentando a sua solubilidade e estabilidade nos lipídios celulares no citoplasma. Na microalga *H. pluvialis*, a astaxantina aparece esterificada principalmente com o ácido oleico (C18:1), além de outros ácido graxos saturados como o palmítico (C16:0), o esteárico (C18:0), o nonadecanoico (C19:0) e o araquídico (C20:0) (RENSTROM et al., 1981; YUAN et al., 2011).

A presença das hidroxilas também faz com que a astaxantina possa existir na forma de diversos estereoisômeros. Dependendo da conformação desses grupamentos no centro quiral, três isômeros podem ser formados: dois enantiômeros (3S e 3'S, 3R e 3'R) e um mesoisômero (3R e 3'S) (Figura 6). Além disso, por possuir uma cadeia poliênica com múltiplas duplas ligações, isômeros geométricos *cis*- ou *trans*- de astaxantina também podem existir. Na astaxantina extraída da *H. pluvialis*, o isômero óptico predominante é o 3S, 3'S e o geométrico é o da forma *trans*-, uma vez que a configuração *cis*- é termodinamicamente mais instável (VECCHI; MULLER, 1979; RENSTROM et al., 1981; YANG et al., 2013).

**Figura 6.** Estereoisômeros da molécula de astaxantina.



Fonte: Adaptado de Wang; Armstrong; Chang (2008).

A astaxantina sintética é composta por uma mistura de três estereoisômeros, em uma proporção 1:2:1 da configuração 3S, 3'S; 3R, 3'S; 3R, 3'R, respectivamente. Essa diferença estereoquímica entre a astaxantina extraída naturalmente da microalga *H. pluvialis* e a astaxantina sintética afeta significativamente a atividade antioxidante deste composto. O isômero 3S, 3'S, presente quase em totalidade na

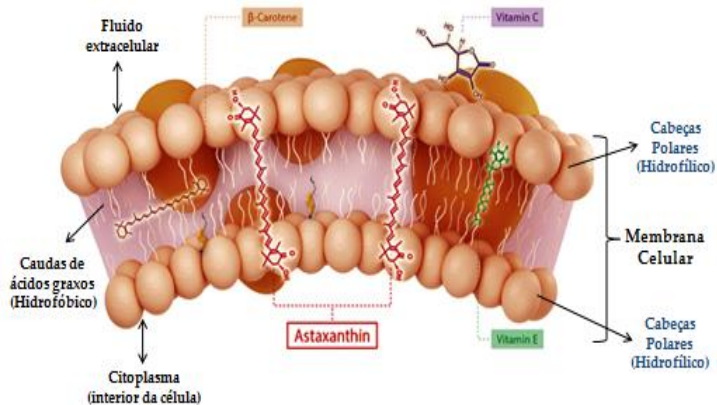
forma natural, possui um alto poder antioxidante contra espécies reativas de oxigênio. Devido a essa diferença, estudos relatam que a astaxantina natural possui uma atividade antioxidante de 14 a 55 vezes maior que a sintética (CAPELLI; BAGCHI; CYSEWSKI, 2013).

Considerando os diferentes ésteres de astaxantina encontrados na microalga *H. pluvialis*, a determinação precisa do teor deste pigmento, principalmente em relação às formas esterificadas, é ainda um desafio, uma vez que estas eluem em diferentes tempos de retenção nos sistemas cromatográficos, além de não apresentarem padrões comerciais para calibração (YUAN, 1999). Dessa forma, a saponificação dos pigmentos obtidos nos processos de extração é recomendada para reduzir o número de picos cromatográficos; simplificando, portanto, o processo de quantificação (ITTAH; KANNER; GRANIT, 1993).

#### 2.4.2.2 Propriedades biológicas

A astaxantina é um carotenoide que apresenta uma estrutura singular, caracterizada pela presença de duas extremidades polares em uma cadeia poliênica não polar. Por essa razão, a mesma apresenta uma propriedade antioxidante excepcional, conferindo-a diversas atividades biológicas (YANG et al., 2013). Os anéis ionona possuem uma potente capacidade de capturar radicais livres e outros compostos oxidantes. Da mesma forma, a série de duplas ligações conjugadas fornece a molécula uma habilidade de remover elétrons desemparelhados dos radicais livres e deslocar a sua energia eletrônica via cadeia carbonada. Além disso, a conformação polar-apolar-polar da astaxantina permite que a mesma se alinhe verticalmente na membrana celular de forma precisa, abrangendo tanto a parte polar da bicamada lipídica, como a parte apolar, conforme demonstrado na Figura 7. Antioxidantes como o  $\beta$ -caroteno e a vitamina C se distribuem apenas na parte interna ou nas extremidades da bicamada lipídica, respectivamente (GOTO et al., 2001; AMBATI et al., 2014).

**Figura 7.** Posicionamento único da molécula de astaxantina na bicamada lipídica celular. Antioxidantes como o  $\beta$ -caroteno e a vitamina C se distribuem apenas na parte interna e externa da membrana celular, respectivamente.



Fonte: Adaptado de Ambati e colaboradores (2014).

A membrana celular é particularmente vulnerável ao ataque de radicais livres e outros compostos oxidantes, devido ao seu conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados e das suas atividades metabólicas; as quais geram endogenamente radicais livres. Com o seu posicionamento singular, alinhada verticalmente à membrana celular, a astaxantina proporciona uma ação antioxidante, em que os mecanismos incluem: neutralização de radicais livres ao doar um elétron para elétrons desemparelhados; ligação com o radical livre para formar um composto não-reativo; condução de elétrons ou energia eletrônica para fora da membrana e neutralização de espécies reativas de nitrogênio, enxofre ou carbono com a adição de átomos de oxigênio (KIDD, 2011; ZHANG et al., 2014).

Um estudo realizado por McNulty e colaboradores (2007) examinou o efeito dos carotenoides astaxantina, zeaxantina, luteína, licopeno e  $\beta$ -caroteno nas taxas de peroxidação lipídica em membranas enriquecidas com ácidos graxos poli-insaturados, e correlacionou esses resultados com aqueles obtidos em estudos de difração de raios-X. Ao final, os autores demonstraram que, com exceção da astaxantina, todos os carotenoides causaram uma desordem na bicamada lipídica e agravaram o processo de peroxidação. Carotenoides mais apolares, como o licopeno e  $\beta$ -caroteno, mostraram um potente efeito pró-oxidante (> 85% de aumento nos níveis de peróxido), enquanto a

astaxantina preservou a estrutura da membrana e exibiu uma significativa atividade antioxidante (diminuição de 40% nos níveis de peróxidos). Em outros estudos prévios, a capacidade sequestradora de radicais livres da astaxantina foi relatada como sendo dez vezes superior à de outros carotenoides, como a zeaxantina, luteína, cantaxantina e  $\beta$ -caroteno, e de até 100 vezes superior quando comparada ao  $\alpha$ -tocoferol (WIKI, 1991; NAGUIB, 2000).

Os efeitos benéficos da astaxantina para a saúde humana vêm sendo descritos por muitos autores, e estudos têm comprovado diversas atividades biológicas atribuídas ao seu uso, especialmente àquelas que atuam contra os processos foto-oxidativos ocasionados pela radiação UV. Além disso, inúmeras pesquisas têm conferido à astaxantina atividades anti-inflamatória, quimiopreventiva, hepatoprotetora e imunomoduladora, além de atuar também na prevenção de desordens cardiovasculares e neurodegenerativas (TANAKA et al., 1995; KAMATH et al., 2008; BHUVANESWARI et al., 2010; LU et al., 2010; YOSHIDA et al., 2010; MONROY-RUIZ et al., 2011; NAGARAJ et al., 2012; LIN et al., 2015; WEN et al., 2015; LIAO et al., 2016; JI et al., 2016; JIANG et al., 2016; YANG et al., 2016).

A exposição de lipídios e tecidos à radiação ultravioleta pode levar à produção de radicais livres e danos foto-oxidativos. Carotenoides, como a astaxantina, têm um papel importante na natureza como fotoprotetor em tecidos expostos diretamente à luz solar. Na pele humana, os danos oxidativos ocasionados por tal radiação já foram amplamente documentados e há diversas evidências, principalmente *in vitro* e em modelos animais, dos benefícios tópicos da astaxantina como antioxidante, quimiopreventivo e fotoprotetor (GUERIN et al., 2003). Camera e colaboradores (2008) compararam o potencial fotoprotetor da astaxantina com o dos carotenoides  $\beta$ -caroteno e cantaxantina, em relação aos danos oxidativos e à expressão de enzimas responsivas ao estresse oxidativo, em fibroblastos humanos expostos à radiação UVA. Neste estudo, os autores mostraram que a astaxantina exibe um pronunciado efeito fotoprotetor, agindo contra todos os efeitos deletérios analisados, como apoptose e morte celular, danos relacionados às espécies reativas de oxigênio, integridade de membrana e atividade de enzimas antioxidantes, mostrando-se superior aos outros carotenoides na prevenção das alterações foto-oxidativas.

Em outro estudo, Hama e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* de formulações lipossomais de astaxantina, e mostraram que essa substância possui uma potente ação contra o oxigênio singlete gerado pela irradiação de luz, em amostras

contendo solução de rosa bengala. Além disso, a aplicação tópica dessas formulações *in vivo* foi capaz de inibir o dano celular, diminuir a degradação de colágeno e a produção de melanina induzidas pela radiação UV.

Rao e colaboradores (2013) examinaram o potencial antitumoral da astaxantina livre e de seus mono- e di-ésteres, provenientes de *Haematococcus pluvialis*, em modelo de câncer de pele induzido pelo 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) em ratos. O DMBA é conhecido por gerar altos níveis de radicais livres e da enzima tirosinase, levando ao aparecimento dos sintomas característicos de pigmentação da pele e iniciação do tumor. Através de ações em múltiplos alvos, como na inibição do acúmulo de espécies reativas de oxigênio e na inibição da atividade da enzima tirosinase, a astaxantina e seus ésteres foram capazes de prevenir a proliferação descontrolada e o acúmulo de melanócitos e do pigmento melanina, comprovando a sua ação antitumoral.

Recentemente, Yoshihisa e colaboradores (2014) investigaram o efeito protetor da astaxantina contra a apoptose celular induzida pela radiação UV em queratinócitos, e relataram que a mesma é capaz de inibir a apoptose através de processos como a redução significativa da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e MIF, e a redução das enzimas óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX2), que estão envolvidas na patogênese de muitas doenças inflamatórias.

#### 2.4.2.3 Aplicações comerciais

No cenário atual, a produção de astaxantina tem se tornado uma atividade de sucesso no campo da biotecnologia devido às suas inúmeras aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e nutracêutica. Nos últimos anos, tem se observado uma tendência no uso de ingredientes naturais em alimentos, cosméticos e nutracêuticos, em razão da crescente preocupação com a segurança do consumidor e nos assuntos regulatórios a respeito da introdução de produtos químicos sintéticos na cadeia alimentar humana (SHAH et al., 2016).

O principal mercado da astaxantina é como fonte de pigmento para o cultivo de animais marinhos, majoritariamente de salmão e trutas. Esse carotenoide é vendido por aproximadamente U\$2.500/kg, com um mercado mundial anual estimado em U\$ 200 milhões. Apesar de mais de 95% do mercado consumir astaxantina sintética, a demanda dos consumidores por produtos naturais tem promovido maiores esforços

para melhorar a produção de astaxantina de fontes biológicas, abrindo uma grande oportunidade para o cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* (LORENZ; CYSEWSKI, 2000; DERNER et al., 2006). Essa questão é ainda estimulada pelo fato que a astaxantina sintética não possui testes de segurança para uso direto em humanos e não há relatos dos seus benefícios fisiológicos; logo, a mesma não possui registro em nenhum órgão regulatório no mundo para esse fim (CAPELLI; BAGCHI; CYSEWSKI, 2013).

O uso da astaxantina como pigmento já foi aprovado por diversos órgãos regulamentares. No Japão, o uso da *Haematococcus pluvialis* é autorizado como fonte de pigmento vermelho natural para alimentos e para ração na aquicultura. Da mesma forma, na União Europeia a astaxantina tem o seu uso aprovado como um aditivo alimentício. Em contraste, o uso da astaxantina e seus derivados como pigmento é aprovado especificamente para alimentação de animais pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos (LORENZ; CYSEWSKI, 2000; GREWE; GRIEHL, 2012; FDA, 2015). No Brasil, a utilização de astaxantina na ração para promoção de cor na musculatura de pescados é permitida, de acordo com a Resolução nº 1, de 7 de março de 2008 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Entretanto, como não dispomos de leis brasileiras sobre o assunto, os procedimentos em relação à segurança alimentar é baseada em legislações internacionais (FERREIRA; ZAMITH; ABRANTES, 2014).

O mercado global da astaxantina derivada da *H. pluvialis* como nutracêutico está em crescente expansão, em função do aumento da consciência do consumidor dos seus benefícios à saúde. Na União Europeia, o seu uso é aprovado como suplemento alimentar e em cosméticos, entretanto, não há uma autorização da *European Food Safety Authority* (EFSA) ou alguma aplicação terapêutica até o momento (GREWE; GRIEHL, 2012). Nos Estados Unidos, o uso da astaxantina como nutracêutico foi aprovado pelo FDA em 1999 e, em 2010, este órgão forneceu o status de “Geralmente Reconhecido como Seguro” (do inglês, *Generally Recognized As Safe* - GRAS) à astaxantina extraída da *H. pluvialis* (YANG et al., 2013; ZHANG et al., 2014).

De acordo com a literatura, a astaxantina é disponibilizada no mercado em produtos nas formas de cápsula, comprimido, biomassa, creme, óleo, bebida energética, entre outras. Além disso, diversas aplicações da astaxantina já foram patenteadas visando à prevenção de infecções bacterianas, problemas vasculares, câncer e doenças cardiovasculares; inibição da peroxidação lipídica; redução do dano

celular e da gordura corporal e melhoramento das funções cerebrais e da firmeza da pele (AMBATI et al., 2014).

## 2.5 SISTEMAS NANOPARTICULADOS PARA LIBERAÇÃO TÓPICA CUTÂNEA

A utilização da via de administração cutânea apresenta vantagens indiscutíveis, tanto para o tratamento tópico de doenças de pele, quanto para a liberação transdérmica de fármacos com foco em um efeito sistêmico. Todavia, a adequada permeação cutânea de compostos ativos para produzir uma resposta terapêutica ainda é um grande desafio no desenvolvimento de novos medicamentos e cosméticos. O estrato córneo, constituído por uma estrutura lipídica altamente ordenada, age como a principal barreira protetora do corpo humano contra a perda excessiva de água, agentes tóxicos e micro-organismos. Neste sentido, inúmeras substâncias ativas quando veiculadas em formas farmacêuticas convencionais apresentam grande dificuldade de permear até camadas mais profundas da pele, o que pode fazer com que somente doses subterapêuticas de fato sejam liberadas, além de possibilitar o surgimento de efeitos colaterais (SCHAFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; SILVA et al., 2010).

Para superar esses obstáculos, o campo da tecnologia farmacêutica tem se aprofundado no emprego de diferentes estratégias para contornar as limitações impostas pela baixa permeação de fármacos. Nos últimos anos, é possível verificar um aumento exponencial na pesquisa e aplicação nas áreas de nanociência e nanotecnologia. Os sistemas nanoparticulados têm atraído crescente interesse de vários ramos da medicina por sua habilidade em liberar fármacos em concentrações ótimas diretamente no alvo de interesse, oferecendo assim, uma melhora da eficácia terapêutica do fármaco, diminuição dos efeitos colaterais e uma maior adesão ao tratamento pelo paciente. Tais sistemas são suspensões coloidais, caracterizadas pelo tamanho submicrométrico, podendo ser administrados por diferentes vias, incluindo a intravenosa, oral, ocular, nasal, intramuscular, intraperitoneal, cutânea e subcutânea (GUTERRES et al., 2007; DE JONG; BORM, 2008).

O uso da nanotecnologia no desenvolvimento de novos sistemas de liberação cutâneo de fármacos tem se tornado uma abordagem promissora, uma vez que essa ferramenta acrescenta uma série de vantagens quando comparada aos sistemas de liberação convencionais. Dentre elas podemos citar o aumento da área superficial, aumento da



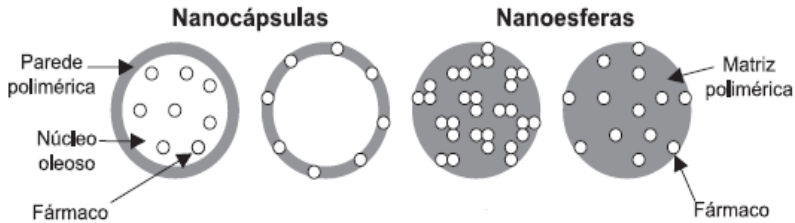
solubilidade, a obtenção de perfis de liberação controlados do princípio ativo, redução da irritação nos tecidos, proteção contra processos degradativos, elevação da concentração do fármaco no alvo de interesse, além de promover um aumento na permeação através das camadas da pele (ABLA; SINGH; BANGA, 2016; ROBERTS et al., 2017).

Há uma grande variedade de sistemas nanoparticulados, entretanto, os tipos mais comumente empregados na administração cutânea de fármacos são as nanopartículas poliméricas, as nanoemulsões, as nanopartículas lipídicas sólidas, os carreadores lipídicos nanoestruturados e os lipossomas (GOYAL et al., 2015). De uma forma geral, as nanopartículas variam em termos de composição, rigidez, estabilidade, perfis de liberação e habilidade de incorporar substâncias com diferentes solubilidades. A escolha do nanocarreador depende, principalmente, das características do fármaco a ser encapsulado, como tamanho, solubilidade e carga, assim como da finalidade e via de administração (VENUGANTI; PERUMAL, 2009; DE ASSIS et al., 2012). A via de administração cutânea exige que as partículas sejam de tamanhos pequenos, em torno de 200 nm, para uma melhor permeação pelo estrato córneo; portanto, a tendência é escolher nanocarreadores que promovam essa característica, como as nanoemulsões e as nanopartículas poliméricas (D'MELLO; DAS; DAS, 2009).

### **2.5.1 Nanocápsulas poliméricas**

Nanopartículas poliméricas são carreadores que apresentam um polímero natural ou sintético em sua composição, podendo ser chamados de nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que a substância ativa é confinada em uma cavidade preenchida por um núcleo geralmente oleoso, sendo este revestido por uma membrana polimérica. Esta cavidade pode conter a substância ativa no estado líquido ou sólido, ou como uma dispersão molecular. Em contraste, as nanoesferas são sistemas em que a substância ativa se encontra fisicamente e uniformemente dispersa em uma matriz polimérica. Ainda, levando em consideração as limitações operacionais nos métodos de preparo, o fármaco a ser encapsulado pode ser encontrado também adsorvido na superfície das nanopartículas ou embebido no revestimento polimérico (GUTERRES et al., 2007; MORA-HUERTAS et al., 2010). Uma representação esquemática da estrutura das nanopartículas poliméricas encontra-se na Figura 8.

**Figura 8.** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.



Fonte: Schaffazick e colaboradores (2003).

Diversos polímeros sintéticos e macromoléculas naturais têm sido amplamente pesquisados como materiais para a produção das nanopartículas poliméricas. Dentre as vantagens que os polímeros sintéticos possuem em relação aos naturais, pode-se citar a sua alta pureza e a reprodutibilidade na composição. Neste grupo, a família dos poliésteres como o poli-ácido láctico (PLA); a poli  $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e o poli-ácido láctico-co-glicólico (PLGA) são de interesse na área farmacêutica devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade. O PLGA, em particular, possui o diferencial de ser aprovado pelo FDA para terapia em humanos (ASTETE; SABLIOV, 2006).

As nanocápsulas, quando comparada a outros sistemas nanoparticulados, mostram-se mais promissoras por apresentarem uma série de vantagens. Além do seu tamanho nanométrico, que permite uma maior captura intracelular das substâncias encapsuladas, e de sua capacidade de promover a penetração até as camadas mais profundas da pele, as nanocápsulas também são capazes de proteger a substância ativa frente à oxidação devido à presença do revestimento polimérico, de transportar substâncias insolúveis em água com altos níveis de eficiência de encapsulação e de promover um controle da liberação (MORA-HUERTAS et al., 2010).

#### 2.5.1.1 Preparo e caracterização

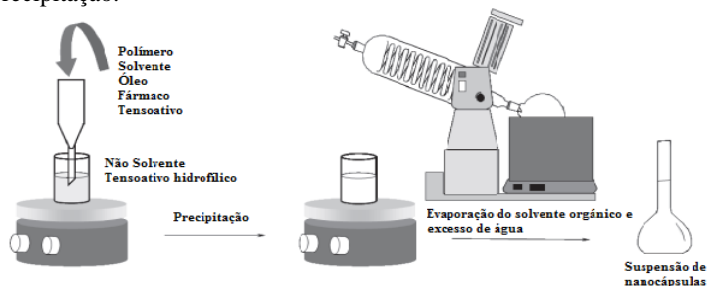
As nanocápsulas poliméricas têm sido extensivamente estudadas como carreadores de fármacos na área farmacêutica e diferentes grupos de pesquisas têm publicado trabalhos à respeito das técnicas de preparo e caracterização desses sistemas de liberação, assim como dos mecanismos de formação (FESSI et al., 1989; QUINTANAR-

GUERRERO et al., 1998). A escolha de uma determinada técnica de preparo depende da natureza do polímero empregado, da natureza do fármaco a ser encapsulado, e da finalidade e da duração terapêutica de interesse. De uma forma geral, há seis técnicas clássicas: deposição interfacial do polímero pré-formado, emulsificação-difusão, dupla emulsificação, emulsificação-coacervação, revestimento de polímero e automontagem (D'MELLO et al., 2009).

A deposição interfacial do polímero pré-formado, também chamada de nanoprecipitação, é considerada uma das primeiras técnicas usadas para encapsulação de fármacos, tendo sido descrita inicialmente por Fessi e colaboradores (1989). Desde o seu desenvolvimento, a técnica é a mais comumente utilizada para formulação de nanocápsulas poliméricas para uso cutâneo, principalmente visando a encapsulação de compostos lipofílicos. O grande interesse na nanoprecipitação deve-se a uma série de vantagens quando comparada a outros métodos de encapsulação, incluindo a sua simplicidade, fácil escalonamento e boa reprodutibilidade, evita a utilização de solventes clorados mais tóxicos, leva a obtenção de partículas com tamanho submicrométrico e distribuição unimodal e, por fim, não há a necessidade de utilizar alta energia (LASSALE; FERREIRA, 2007).

Nesse método, a obtenção de nanocápsulas é baseada na adição de uma fase orgânica contendo o polímero, a substância ativa, o óleo e um tensoativo lipofílico em uma fase não solvente (aquosa), frequentemente adicionada de um ou mais tensoativos hidrofílicos. As nanocápsulas são obtidas como uma suspensão coloidal quando a fase orgânica é adicionada vagarosamente e com agitação moderada à fase aquosa (MORA-HUERTAS et al., 2010; MILADI et al., 2016). Um esquema da técnica da nanoprecipitação é mostrado na Figura 9.

**Figura 9.** Esquema do preparo de nanocápsulas poliméricas pelo método da nanoprecipitação.



Fonte. Adaptado de Guterres e colaboradores (2007).

O processo de preparação de nanocápsulas, aparentemente simples, pode envolver um complexo fenômeno hidrodinâmico interfacial. A adição da solução orgânica à fase aquosa resulta em uma emulsificação espontânea do óleo na forma de nanogotas, devido a uma provável instabilidade interfacial criada pela rápida difusão do solvente orgânico e pelo decréscimo significativo da tensão interfacial. Conseqüentemente, o solvente se desloca das regiões com baixa tensão superficial e o polímero tende a se agregar na superfície do óleo e formar as nanocápsulas (FESSI et al., 1989; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

Os critérios para seleção do óleo utilizado na fase orgânica são a ausência de toxicidade, alta capacidade de dissolução do fármaco de interesse, baixa solubilidade no polímero e vice-versa, e ausência de incompatibilidade química com o polímero. Em geral, os óleos mais utilizados são os que apresentam ácidos graxos saturados, insaturados e ésteres de ácidos graxos em sua composição, como os triglicerídeos de cadeia média (BLOUZA et al., 2006).

Os surfactantes apresentam como função a redução da tensão superficial entre a água e o óleo. Portanto, para a obtenção de gotículas de óleo pequenas e estáveis em suspensão, é necessária a adição desse agente estabilizador. Dependendo da natureza do tensoativo, as nanocápsulas podem ser estabilizadas tanto por repulsão estérica como eletrostática (MOSQUEIRA et al., 2000). Assim como na escolha do óleo, a seleção desses componentes deve levar em consideração não só a estabilidade da formulação, mas também a ausência de toxicidade. Os tensoativos não-iônicos, anfotéricos e suas combinações são empregados com frequência na estabilização das formulações de nanocápsulas. Na fase aquosa, os tensoativos mais utilizados são o poloxamer 188 e o polissorbato 80 (Tween 80). Na fase orgânica, os fosfolípidios, como as lecitinas, e os ésteres de sorbitano são os mais citados na literatura. As lecitinas, em particular, são amplamente utilizadas na área farmacêutica e cosmética por serem atóxicas e biocompatíveis, além conferirem um alto valor de potencial zeta negativo às partículas (GREF; COUVREUR, 2002; MORA-HUERTAS et al., 2010).

Existem diversos parâmetros que podem afetar a obtenção de nanopartículas com as características físico-químicas desejadas, alta eficiência de encapsulação e controle de liberação do fármaco, tais como a solubilidade e concentração do fármaco a ser encapsulado, o tipo do polímero e sua concentração, a sua massa molecular, composição dos copolímeros, pH, temperatura, proporção fase orgânica/aquosa,

velocidade de agitação, entre outros. Consequentemente, um conhecimento profundo desses parâmetros experimentais envolvidos em cada método de preparo é crucial, assim como o efeito produzido pelas suas mudanças nas características da partícula a ser obtida (LASSALLE; FERREIRA, 2007; D'MELLO et al., 2009).

A caracterização das suspensões coloidais de nanocápsulas poliméricas é realizada a fim de monitorar o desenvolvimento de novas formulações, bem como verificar a sua estabilidade ao longo do tempo. A determinação do tamanho médio da partícula e a sua distribuição granulométrica deve ser a primeira informação a ser obtida, pois esses fatores são os principais determinantes da biodistribuição e retenção de nanopartículas em tecidos alvos. A espectroscopia de correlação fotônica, também chamada de espalhamento de luz dinâmico, é a técnica normalmente utilizada para esse fim (CHO et al., 2013).

A avaliação morfológica das nanopartículas é feita usualmente através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), uma vez que essa técnica possibilita não só a obtenção de informações relativas ao tamanho e a forma, como também permite uma diferenciação entre a formação de nanocápsulas e nanoesferas e a determinação da espessura da parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O valor do potencial zeta reflete o potencial da superfície das partículas, o qual é determinado por técnicas de eletroforese. Esse parâmetro é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em função da dissociação de grupos funcionais associados à superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão. Os fosfolipídios, os poloxamers (tensoativos não-iônicos) e os polímeros constituintes das nanocápsulas são os principais componentes presentes na formulação capazes de influenciar o potencial zeta. Os poliésteres e a lecitina, especialmente, fornecem um potencial zeta negativo à interface, enquanto que os poloxamers tendem a reduzir o valor absoluto desse parâmetro. Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, uma vez que as forças repulsivas entre partículas com elevada carga superficial tendem a evitar a agregação das mesmas (SOPPIMATH et al., 2001; SCHAFFAZICK et al., 2003).

## 2.6 INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS

A astaxantina é uma substância reconhecida por seu potencial antioxidante singular, o que garante a esta molécula inúmeras atividades

biológicas. Contudo, a sua baixa estabilidade e solubilidade aquosa resultam na redução da sua biodisponibilidade e de sua atividade antioxidante, o que restringe significativamente a sua aplicação nos campos da medicina, cosméticos e alimentos funcionais. Dessa forma, estratégias tecnológicas visando melhorar as suas propriedades biofarmacêuticas e fornecer uma proteção frente a processos degradativos têm sido propostas (ANARJAN et al., 2013; WANG et al., 2017). Kittikaiwan e colaboradores (2007) revestiram peletes contendo a biomassa de *Haematococcus pluvialis* com filmes de quitosana e avaliaram o seu efeito na estabilidade físico-química da astaxantina sob diferentes condições de armazenamento. Como resultado, foi relatado que houve apenas 3,0% de perda da atividade antioxidante após o processo de encapsulação, e que o estudo de estabilidade a longo-prazo indicou que a presença do filme de quitosana foi capaz de proteger as células da alga contra o estresse oxidativo.

Em outro estudo, Tachaprutinun e colaboradores (2009) desenvolveram nanoesferas poliméricas contendo astaxantina a fim de verificar o potencial da nanoencapsulação na prevenção da degradação térmica. As nanoesferas foram preparadas pela técnica de deslocamento do solvente usando três polímeros: o poli(óxido de etileno)-4-metoxicinamoilftaloilquitosana (PCPLC), o álcool polivinílico-co-vinil-4-metoxicinamato (PB4) e a etilcelulose (EC). Entre os três polímeros estudados, a PCPLC permitiu obter nanoesferas de cerca de 300 nm com 98% de eficiência de encapsulação e 40% de teor de astaxantina. Os autores mostraram por meio de técnicas de RMN e espectroscopia UV/Vis, que quando submetidas à temperatura de 70 °C por 2 h em meio aquoso, a astaxantina nanoencapsulada sofreu degradação térmica mínima da funcionalidade olefínica, enquanto que as moléculas do pigmento livre foram quase completamente destruídas.

Peng e colaboradores (2010) formularam lipossomas de astaxantina com o objetivo de investigar se esse sistema poderia melhorar a solubilidade aquosa desse carotenoide e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade. Lipossomas de fosfatidilcolina contendo astaxantina foram preparados e testados em células de linhagem de hepatoma (Hep3B e HepG2). Os autores mostraram que o tempo de transporte da astaxantina encapsulada para o interior das células foi reduzido significativamente, ativando de modo mais eficiente as enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase, do que a astaxantina livre. Além disso, quando combinada à terapia com radiação gama, a astaxantina encapsulada desencadeou o bloqueio da fase subG1 do ciclo celular de modo dose dependente. Os

autores concluíram que os lipossomas contendo astaxantina têm potencial para aumentar a biodisponibilidade da astaxantina e atuar como terapia adjuvante na radioterapia gama.

Affandi e colaboradores (2011) desenvolveram nanoemulsões de astaxantina visando melhorar a biodisponibilidade da mesma. Para otimizar o processo de produção, os autores exploraram o efeito de diversos parâmetros, como condições de homogeneização e tipo e concentração de tensoativo, nas propriedades físico-químicas das formulações. Além disso, foi avaliada a estabilidade da formulação otimizada nas temperaturas de 5,0 °C e 25 °C com umidade relativa de 60% e a 40 °C com umidade relativa de 75%, por um período de 3 meses. A formulação que apresentou as melhores características foi obtida com velocidade de homogeneização de 9000 RPM durante 5 min, com alta pressão (800 bar) e em 5 ciclos; composta de 4,0% de tensoativo, 16% de óleo e 80% de água. O estudo de estabilidade da nanoemulsão de astaxantina demonstrou que a mesma permaneceu estável em relação ao teor de princípio ativo e às propriedades físico-químicas durante todo o processo de produção e armazenamento, em todas as condições analisadas. Assim, esse resultado evidenciou o potencial de sistemas nanoemulsionados em aumentar a biodisponibilidade de substâncias lábeis de caráter lipofílico.

Da mesma maneira, Tamjidi e colaboradores (2014) formularam e caracterizaram carreadores lipídicos nanoestruturados de astaxantina, como uma alternativa para contornar a sua baixa solubilidade aquosa, baixa biodisponibilidade e sua instabilidade química. Diferentes lipídios líquidos e sólidos foram investigados, a fim de selecionar os mais apropriados para elaboração desses sistemas carreadores, e a influência dos componentes da formulação nas suas características físico-químicas foram avaliados através da metodologia de superfície de resposta. Os nanocarreadores lipídicos foram preparados pela técnica da emulsificação à quente seguida por sonicação, o Tween 80 e a lecitina de soja foram empregados como emulsificantes, e o ácido oleico e o behenato de glicerila foram os lipídios selecionados. Como resultado, verificou-se que a proporção de Tween 80 com a fase lipídica e o teor de ácido oleico na mistura de lipídios, como variáveis independentes, tiveram um efeito significativo nas características físicas na formulação recém preparada e na estabilidade da mesma durante o armazenamento. Por fim, os autores relataram que a formulação obtida pode ser potencialmente explorada como um sistema nanocarreador com apropriada estabilidade para a liberação de astaxantina em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos.

Recentemente, Wang e colaboradores (2017) preparam nanocarreadores constituídos de quitosana e DNA de esperma de salmão e investigaram a captura celular e a capacidade antioxidante da astaxantina nanoencapsulada. Nesse estudo, os nanocarreadores demonstraram uma atividade protetora mais potente contra o dano celular oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio em células Caco-2, quando comparada com a astaxantina livre, melhorando a viabilidade celular. Além disso, os nanocarreadores foram facilmente engolfados pelas células Caco-2 em um curto período, sugerindo que a astaxantina encapsulada poderia ser absorvida por endocitose pelas células epiteliais intestinais.

Além das estratégias acima mencionadas, outras modificações tecnológicas aplicadas à molécula de astaxantina também já foram descritas, como a complexação com  $\beta$ -ciclodextrina (YUAN et al., 2008) e o aumento do caráter hidrofílico através da formação de um sal (HIX et al., 2005; LOCKWOOD; GROSS, 2005).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Matérias-primas

- 2,2- Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (Sigma-Aldrich, EUA);
- Acetato de vitamina E (Pharmanostra, Brasil);
- *Trans*-astaxantina 98% (Sigma-Aldrich, EUA);
- Hidróxido de sódio P. A. (Alphatec, Brasil);
- Lauril sulfato de sódio (Vetec, Brasil);
- Lecitina de soja, 100% de fosfatidilcolina (Lipoid S100, Lipoid GmbH, Alemanha);
- PLGA (50:50) 7.000-17.000 Da (Sigma-Aldrich, EUA);
- Policaprolactona 10.000 Da (Sigma-Aldrich, EUA);
- Poloxamer 407 (Sigma-Aldrich, EUA);
- Triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (Pharmanostra, Brasil);
- Tween 80/Polissorbato 80 (Sigma-Aldrich, EUA);

##### 3.1.2 Solventes e reagentes

- Acetona P.A. (Vetec, Brasil);
- Diclorometano P. A. (Merck Millipore, Alemanha);
- Etanol 96% P. A. (ApliChem GmbH, Alemanha);
- Éter de petróleo P. A. (Vetec, Brasil);
- Metanol grau CLAE (ApliChem GmbH, Alemanha);

##### 3.1.3 Equipamentos

- Balança analítica AUW220D (Shimadzu, Japão);
- Centrífuga (Thermo Scientific, EUA);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu, Japão);
- Espectrofotômetro UV/Visível UV-1800 (Shimadzu, Japão);
- LUMiSizer (LUM GmbH, Alemanha);
- Potenciômetro (Oakton, EUA);
- Reômetro *Brookfield* RVDV-III PLUS (Brookfield Engineering Laboratories, EUA);
- Rotaevaporador R-300 (Buchi, Suíça);
- Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido);

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Preparo da solução extrativa a partir da microalga *Haematococcus pluvialis*

A biomassa liofilizada da microalga *Haematococcus pluvialis* utilizada para o preparo da solução extrativa foi cedida pelo Professor Dr. Roberto Bianchini Derner, do Laboratório de Cultivo de Algas no Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

A extração de carotenoides a partir da biomassa de *H. pluvialis* foi realizada por uma técnica de ruptura celular seguida por uma extração com solventes, conforme o método descrito por Mezzomo e colaboradores (2011). Para a preparação da solução extrativa, foram pesados 5 g de biomassa e adicionados 200 mL de uma mistura de éter de petróleo:acetona:água (15:75:10 V/V/V) como líquido extrator. Essa mistura foi colocada em um banho de ultrassom por 20 min, a fim de romper a rígida parede celular da microalga. A mistura foi então mantida sob agitação magnética por 24 h a 5,0 °C, protegida da luz. Após essa etapa, a mistura foi centrifugada a 3.000 RPM durante 6 min, sendo o sobrenadante coletado. Os procedimentos de agitação magnética e centrifugação foram repetidos até que o sobrenadante se tornasse incolor. Os sobrenadantes foram reunidos e, por fim, a solução extrativa de *H. pluvialis* (SE) obtida foi armazenada em frasco âmbar a -20 °C.

### 3.2.2 Caracterização da solução extrativa de *H. pluvialis*

#### 3.2.2.1 Determinação de teor de resíduo seco

O teor de resíduo seco foi determinado conforme metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2010). Nessa análise, 10 g de solução extrativa foram colocados em pesa-filtros previamente tarados, e submetidos à evaporação em banho-maria até *secura*. O resíduo restante foi colocado em estufa em torno de 105 °C por aproximadamente 3 h, resfriado em dessecador e pesado. Os valores de resíduo seco (RS) foram determinados em porcentagem conforme Equação 1.

$$RS(\%) = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Em que  $m_f$  é a massa da solução extrativa em gramas após a evaporação e secagem e  $m_i$  é massa inicial da solução extrativa em gramas. O resultado foi expresso pela média de três determinações.

### 3.2.2.2 Determinação do pH

A determinação do pH da solução extrativa foi realizada em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. Os resultados equivalem à média de três determinações.

### 3.2.2.3 Determinação do teor de carotenoides totais

A determinação do teor de carotenoides totais foi realizada por método espectrofotométrico, conforme descrito em Nobre e colaboradores (2006). Para o preparo da amostra, 1,0 mL da solução extrativa foi levada à secura em evaporador rotatório sob pressão reduzida, o resíduo obtido foi dissolvido em acetona e transferido para um balão volumétrico de 25,0 mL, sendo o volume final completado com o mesmo solvente.

As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis, primeiramente na faixa de comprimento de onda de 320 a 700 nm, a fim de verificar o comprimento de onda de absorção máxima da astaxantina. Após a seleção do comprimento de onda, as amostras foram analisadas utilizando acetona como branco. O teor de carotenoides totais (CT) foi calculado conforme Equação 2,

$$CT = \frac{A \times 25}{E_{1\%}^{1\text{cm}} \times 100} \quad (2)$$

em que A é a absorbância obtida no comprimento de onda de absorção máxima da astaxantina e  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  é o coeficiente de extinção específico da astaxantina em acetona ou 2198 ( $100 \text{ mL g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). O resultado foi expresso pela média de três determinações.

### 3.2.2.4 Desenvolvimento e validação de método de cromatografia líquida para determinação do teor de astaxantina livre

#### 3.2.2.4.1 Condições cromatográficas

O teor de astaxantina livre foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme metodologia descrita por Anarjan e colaboradores (2012), com modificações. As análises foram realizadas em cromatógrafo LC-20AD (Shimadzu, Japão) equipado com uma bomba binária LC-20AD e acoplado com um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A 206 (DAD). Os experimentos foram realizados em modo de fase reversa, utilizando uma coluna Hypersil GOLD C18 (150 x 4,6 mm, 5,0  $\mu\text{m}$ ) (Thermo Scientific®, EUA), com temperatura de forno a 29 °C. O sistema foi operado em modo gradiente com fase móvel constituída de diferentes proporções de solução de ácido fórmico 0,1% e metanol em fluxo de 1,0 mL/min, conforme descrito na Tabela 1. O volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$  e os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 475 nm, com monitoramento dos espectros de UV/Vis na faixa de 320 a 500 nm. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software LCsolution.

A validação da metodologia foi realizada com base nos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e robustez descritos no “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (Resolução RE 899/2003) e no guia da ICH (2005), reconhecido e adotado por órgãos regulatórios internacionais.

**Tabela 1.** Condições utilizadas no modo gradiente de eluição para determinação do teor de astaxantina livre por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Solução de ácido fórmico 0,1% (V/V)	Metanol (%)
0-4	1,0	15	85
4-14	1,0	0	100
14-17	1,0	0	100
17-22	1,0	15	85

#### 3.2.2.4.2 Preparo da amostra

Para a determinação do teor de astaxantina livre, uma alíquota de 5,0 mL da solução extrativa de *H. pluvialis* foi submetida à evaporação

sob pressão reduzida até *secura*. O resíduo obtido foi então dissolvido em uma mistura de diclorometano:metanol (25:75, V/V), transferido para um balão volumétrico de 5,0 mL e o volume final foi completado com a mesma mistura de solventes. Todas as amostras foram filtradas com membrana de 0,45 µm (PVDP, Millipore, EUA) anteriormente à análise.

### 3.2.2.4.3 Validação da metodologia analítica

#### 3.2.2.4.3.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da construção de três curvas de calibração, em três dias diferentes. Para o preparo da solução estoque, 1,0 mg de astaxantina padrão, exatamente pesado, foi dissolvido em 6,25 mL de diclorometano em um balão volumétrico de 25,0 mL, sendo o volume final completado com metanol. A partir desta solução, soluções de astaxantina nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 µg/mL foram preparadas usando metanol como solvente. Todas as soluções foram mantidas sob atmosfera de nitrogênio até o momento da análise. As soluções foram analisadas por CLAE conforme condições cromatográficas descritas em 3.2.2.4.1.

Gráficos da área do pico da astaxantina *versus* concentração foram construídos e o coeficiente de determinação e a equação da reta foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados.

#### 3.2.2.4.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados utilizando as Equações 3 e 4, respectivamente:

$$LD = \frac{DP_i \times 3,3}{IC} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{DP_i \times 10}{IC} \quad (4)$$

Onde:  $DP_i$  corresponde ao desvio padrão do intercepto com o eixo y obtido a partir das três curvas de calibração e IC corresponde à inclinação da reta.

### 3.2.2.4.3.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos ensaios de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia). A repetibilidade foi avaliada após análise de seis amostras da solução extrativa de *H. pluvialis* no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada pela análise de seis amostras em três dias diferentes. A precisão foi expressa como porcentagem do desvio padrão relativo (DPR %) entre as análises.

### 3.2.2.4.3.4 Exatidão

Para avaliação da exatidão do método, soluções padrões de astaxantina em três níveis de concentração (níveis baixo, médio e alto) foram preparadas usando diclorometano:metanol como solvente (25:75, V/V). Uma alíquota de 500 µL de cada uma destas soluções foi adicionada a 500 µL de amostras da solução extrativa de *H. pluvialis*. Todas as soluções preparadas foram mantidas sob atmosfera de nitrogênio até o momento da análise. Cada nível foi avaliado em triplicata e a exatidão do método foi estimada pela quantidade de astaxantina recuperada (R%) após adição da solução padrão na amostra, conforme a Equação 5:

$$R(\%) = \frac{C_{exp.}}{C_{teor.}} \times 100 \quad (5)$$

em que  $C_{exp.}$  corresponde à concentração média de astaxantina (µg/mL) encontrada na solução extrativa após a adição do padrão e  $C_{teor.}$  corresponde à concentração teórica.

### 3.2.2.4.3.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio da análise da solução extrativa de *H. pluvialis* após pequenas variações nas condições cromatográficas, conforme mostrado na Tabela 2. Os resultados foram avaliados quanto ao tempo de retenção e teor de astaxantina livre na amostra.

**Tabela 2.** Parâmetros avaliados para determinação da robustez da metodologia analítica para determinação do teor de astaxantina livre por cromatografia líquida de alta eficiência.

<b>Parâmetro</b>	<b>Nível Inferior</b>	<b>Nível Superior</b>
<b>Comprimento de onda (nm)</b>	473	477
<b>Temperatura do forno (°C)</b>	27	31

### 3.2.2.5 Determinação do teor de astaxantina total na solução extrativa de *H. pluvialis*

O teor de astaxantina total na solução extrativa de *H. pluvialis* foi determinado após hidrólise dos ésteres de astaxantina, conforme metodologia descrita por Yuan (1999). Primeiramente, 5,0 mL da solução extrativa foram evaporados até *secura* em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi dissolvido em uma mistura de diclorometano:metanol (25:75 V/V), transferido para um balão volumétrico de 5,0 mL e o volume final foi completado com a mesma mistura de solventes. Em seguida, 1,0 mL de uma solução metanólica de hidróxido de sódio 0,09 M foi adicionado à amostra (proporção 1:5 V/V) e essa mistura (6,0 mL) foi concentrada para 5,0 mL sob injeção de nitrogênio. A mistura foi mantida em temperatura ambiente, protegida da luz e sob atmosfera de nitrogênio. Em intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas da mistura foram coletadas, diluídas 10 vezes com metanol e analisadas por metodologia analítica de CLAE/DAD, conforme condições descritas em 3.2.2.4.1.

A estabilidade da astaxantina livre durante a reação de saponificação foi avaliada empregando uma solução padrão de astaxantina 4,0 µg/mL, a qual foi submetida às mesmas condições de hidrólise descritas acima. Em intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas da solução de astaxantina foram coletadas, diluídas 10 vezes com metanol e analisadas por metodologia analítica de CLAE/DAD, conforme condições descritas em 3.2.2.4.1. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

### 3.2.3 Desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas

#### 3.2.3.1 Preparo de nanocápsulas brancas (sem carotenoides)

As nanocápsulas poliméricas foram preparadas pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação), descrito por Fessi e colaboradores (1989). Brevemente, 100 mg de policaprolactona (PCL) e 250  $\mu$ L de uma mistura de triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (TCM) foram adicionados em um balão volumétrico de 25,0 mL e dissolvidos com acetona com auxílio de banho ultrassônico. Em seguida, 1,5 mL de uma solução de lecitina de soja 50 mg/mL, previamente solubilizada em uma solução de etanol:acetona (30:70; V/V), foram adicionados ao balão volumétrico e o volume final completado com acetona. Os 25 mL de solução orgânica resultante foi então vertida, com o auxílio de uma seringa, a 40 mL de uma fase aquosa contendo polissorbato 80 (Tween 80), nas concentrações 0,25, 0,5 e 1,0% (m/V, do volume final), sob agitação magnética, à temperatura ambiente e protegida da luz.

As suspensões coloidais obtidas foram submetidas à evaporação sob pressão reduzida para remoção do solvente orgânico e concentração até o volume final de 10 mL. Posteriormente, as suspensões foram filtradas através de papel-filtro quantitativo com tamanho de poro de 8,0  $\mu$ m e armazenadas em frasco âmbar a temperatura de 5,0 °C. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. A composição final das formulações de nanocápsulas brancas encontra-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Composição final das formulações brancas.

Formulação	NCB-T <sub>0,25</sub>	NCB-T <sub>0,50</sub>	NCB-T <sub>1,0</sub>
PCL (mg)	100	100	100
Lecitina <sup>1</sup> (mg)	75	75	75
MCT ( $\mu$ L)	250	250	250
Tween 80 (%)	0,25	0,5	1,0
Água qsp (mL)	10	10	10

<sup>1</sup>Foi utilizada uma solução de lecitina 50 mg/mL previamente dissolvida em uma mistura de etanol:acetona (30:70, V/V).



### 3.2.3.2 Preparo das nanocápsulas poliméricas contendo carotenoides de *H. pluvialis*

Inicialmente, uma quantidade pré-definida de solução extrativa de *H. pluvialis* foi submetida à evaporação sob pressão reduzida até *secura*. O resíduo obtido foi então dissolvido em acetona, transferido para um balão volumétrico e o volume foi completado com o mesmo solvente. Esta solução foi denominada SE.

A preparação das nanocápsulas foi realizada conforme descrito em 3.2.3.1, com a diferença que quantidades distintas de SE foram adicionadas à fase orgânica da formulação e a concentração de polissorbato 80 (Tween 80) na fase aquosa foi mantida em 0,5% (m/V, do volume final). Nessa etapa também foi adicionado 0,1% (V/V, do volume final) do antioxidante acetato de vitamina E, com o objetivo de auxiliar na proteção dos carotenoides contra os processos oxidativos. Além disso, o polímero poli-ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) também foi testado. As formulações foram preparadas em triplicata, protegidas da luz e armazenadas em frasco âmbar a temperatura de 5,0 °C. A composição final das formulações de nanocápsulas contendo os carotenoides é mostrada na Tabela 4.

**Tabela 4.** Composição final das formulações de nanocápsulas contendo carotenoides da microalga *Haematococcus pluvialis*.

Formulações	NC-SE <sub>15</sub>	NC-SE <sub>18</sub>	NC-SE <sub>21</sub>
PCL ou PLGA (mg)	100	100	100
Lecitina <sup>1</sup> (mg)	75	75	75
MCT (µl)	250	250	250
Vit E (%)	0,1	0,1	0,1
SE <sup>2</sup> (mL)	15	18	21
Tween 80 (%)	0,5	0,5	0,5
Água qsp (mL)	10	10	10

<sup>1</sup>Foi utilizada uma solução de lecitina 50 mg/mL previamente dissolvida em uma mistura de etanol:acetona (30:70, V/V).

<sup>2</sup>SE: Solução extrativa de *H. pluvialis* em acetona.

### 3.2.4 Caracterização química e físico-química das nanocápsulas poliméricas

### 3.2.4.1 Determinação do diâmetro médio, distribuição granulométrica e potencial zeta

O diâmetro médio das nanopartículas foi determinado por espectroscopia de correlação fotônica e o potencial zeta por anemometria laser Doppler, utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido). Ambas as análises foram realizadas a 25 °C, após diluição apropriada da amostra (1:200 V/V) em água ultrapura (Milli-Q®, Millipore, EUA). Para a determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica, as análises foram realizadas através de um ângulo fixo de detecção a 173°. Nas análises do potencial zeta, as amostras foram colocadas em células eletroforéticas com um potencial de  $\pm 150$  mV, sendo os valores potenciais calculados como a média dos valores da mobilidade eletroforética utilizando a equação de Smoluchowski (SZQ et al., 2003).

### 3.2.4.2 Avaliação da morfologia

A morfologia das nanocápsulas foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando um microscópio JEM-1011-100 kv (Tóquio, Japão) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFSC. As amostras foram depositadas em *grids* de cobre de 200-*mesh* revestidos com carbono, secas à temperatura ambiente e coradas com solução aquosa de ácido fosfotúngstico 0,5% (m/V). As amostras foram visualizadas com aumentos de 15.000 a 120.000 vezes.

### 3.2.4.3 Determinação do teor de carotenoides totais

O teor de carotenoides totais foi determinado por espectrofotometria no visível, conforme metodologia previamente descrita em 3.2.2.3. Uma alíquota de 1,0 mL de cada uma das suspensões de nanocápsulas foi transferida para um balão volumétrico de 25,0 mL e o volume foi completado com acetona. Uma suspensão de nanocápsulas brancas foi preparada nas mesmas condições e utilizada como branco das leituras. As análises foram realizadas no comprimento de onda de 475 nm e o teor de carotenoides totais (CT) foi calculado conforme Equação 2. Os resultados foram expressos em equivalente em astaxantina ( $\mu\text{g/mL}$ ) pela média de três determinações.

### 3.2.4.4 Determinação do teor e eficiência de encapsulação da astaxantina livre nas nanocápsulas e determinação do teor de astaxantina total

O teor de astaxantina livre (Concentração total  $C_t$ ) na suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> foi determinado por metodologia analítica em CLAE/DAD conforme item 3.2.2.4. Para o preparo da amostra, uma alíquota da suspensão de nanocápsulas foi diluída em mistura de diclorometano:metanol (25:75) em uma proporção 1:20 (V/V). A especificidade do ensaio foi feita com a análise de uma suspensão de nanocápsulas brancas nas mesmas condições.

A eficiência de encapsulação foi estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração total de astaxantina livre encontrada na suspensão de nanocápsulas e a concentração presente no sobrenadante após ultrafiltração/centrifugação das amostras em unidades Amicon Ultra-15 (Ultracel®-100 K 100000 MW; Millipore, Irlanda) por 40 min, com velocidade de 4.000 g a 15 °C. Os ultrafiltrados foram injetados no cromatógrafo e todas as amostras foram filtradas em filtro seringa de 0,45 µm (Millipore, EUA) anteriormente à análise. A eficiência de encapsulação foi calculada conforme Equação 6,

$$EE (\%) = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100 \quad (6)$$

onde,  $C_t$  é Concentração total de astaxantina (µg/mL) determinada na suspensão coloidal de nanocápsulas e  $C_s$  (µg/mL) é concentração de astaxantina determinada no sobrenadante. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

O teor de astaxantina total para suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> foi determinado conforme item 3.2.2.5. Uma alíquota de 0,25 µL de suspensão foi transferida para um balão volumétrico de 5,0 mL e o volume foi completado com uma mistura de diclorometano:metanol (25:75, V/V). Em seguida, 1,0 mL de uma solução metanólica de hidróxido de sódio 0,09 M foi adicionado à amostra e essa mistura (6,0 mL) foi concentrada até 5,0 mL por meio de injeção de gás nitrogênio. A mistura foi mantida em temperatura ambiente durante 3 h, protegida da luz e sob atmosfera de nitrogênio. Após, as amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore, EUA) e analisadas por CLAE/DAD.

### 3.2.5 Determinação do potencial antioxidante *in vitro* da solução extrativa de *H. pluvialis* livre e nanoencapsulada pelo método do sequestro do radical livre (DPPH)

A atividade antioxidante da solução extrativa de *H. pluvialis* livre e nanoencapsulada foi avaliada pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), descrito por Choi e colaboradores (2002), com algumas modificações. Primeiramente, uma alíquota da solução extrativa de *H. pluvialis* foi submetida à evaporação sob pressão reduzida até *secura*. O resíduo obtido foi solubilizado com uma solução de acetona:metanol 1:9 (V/V) em um balão volumétrico, a fim de obter uma solução com concentração equivalente a 80 µg/mL de carotenoides totais. A partir desta, soluções de diferentes concentrações em metanol foram preparadas, variando de 20 a 0,5 µg/mL.

Para avaliação da atividade antioxidante da suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> contendo os carotenoides de *H. pluvialis*, uma alíquota da suspensão coloidal foi dissolvida em diclorometano:metanol 25:75 (V/V), sendo esta solução posteriormente diluída com metanol para obtenção de soluções com concentrações de carotenoides totais variando de 10 a 0,5 µg/mL.

Em tubos de ensaios, 2,0 mL de cada solução foram adicionados a 2,0 mL de uma solução metanólica de DPPH 0,3 mM. A reação foi incubada ao abrigo de luz, em temperatura ambiente, durante 30 min. Após, as absorvâncias das amostras foram medidas a 517 nm, utilizando a solução de respectiva concentração em metanol (sem DPPH) como branco e uma solução de DPPH como controle negativo. Para o controle positivo, soluções de ácido ascórbico foram preparadas em metanol nas concentrações de 10 a 0,5 µg/mL seguindo o mesmo procedimento descrito acima. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. A porcentagem de atividade antioxidante (%) foi calculada usando a Equação 7:

$$AA (\%) = 100 - \left[ \left( \frac{Abs\ a - Abs\ b}{Abs\ c} \right) \times 100 \right] \quad (7)$$

onde, *Abs a*, *Abs b* e *Abs c* correspondem às absorvâncias da amostra, do branco e do controle negativo, respectivamente. Os valores de IC<sub>50</sub> (concentração antioxidante necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial de DPPH) foram obtidos através da análise da regressão linear das curvas de concentração de carotenoides totais *versus* porcentagem de atividade antioxidante.

### **3.2.6 Definição da estabilidade química dos carotenoides frente à temperatura**

Para definição da estabilidade química dos carotenoides, a solução extrativa de *H. pluvialis* e a suspensão de nanocápsulas contendo a solução extrativa (PLGA-SE<sub>15</sub>) foram armazenadas protegidas da luz, à temperatura ambiente (25 °C) e na geladeira (5,0 °C). Nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias, alíquotas de cada uma das amostras foram coletadas e analisadas quanto ao teor de carotenoides totais e de astaxantina livre e total por espectrofotometria de absorção no visível e CLAE/DAD, conforme descrito em 3.2.2.3 e 3.2.2.4, respectivamente. Neste estudo, o efeito da adição de vitamina E na formulação sobre a estabilidade dos carotenoides foi avaliada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.2.7 Preparo e caracterização de hidrogéis termossensíveis contendo as nanocápsulas de PLGA**

Para preparo dos hidrogéis, o polímero poloxamer 407 foi adicionado à suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> contendo carotenoides de *H. pluvialis*, de modo a obter concentrações finais de 16% e 25% (m/V). Essas misturas foram mantidas a 4,0 °C por 12 h para a completa dispersão do polímero gelificante. Após esse período, os hidrogéis contendo as nanocápsulas foram submetidos à agitação magnética, a fim de obter uma formulação homogênea e, posteriormente, armazenados a 4,0 °C. Esse mesmo procedimento foi realizado para o preparo de hidrogéis brancos, sem a adição das nanocápsulas. Todas as formulações de hidrogéis foram preparadas em triplicata.

#### **3.2.7.1 Determinação do teor de carotenoides totais e de astaxantina livre e total nos hidrogéis**

O teor de carotenoides totais foi determinado por espectrofotometria de absorção no visível, conforme descrito em 3.2.2.3, porém, utilizando uma amostra de hidrogel contendo as nanocápsulas brancas como branco. O teor de astaxantina livre nos hidrogéis foi determinado pela metodologia analítica em CLAE/DAD validada conforme descrito em 3.2.2.4, após diluição apropriada de uma amostra de hidrogel contendo as nanocápsulas poliméricas com carotenoides de *H. pluvialis*, em uma mistura de diclorometano:metanol (25:75, V/V). O

teor de astaxantina total nos hidrogéis foi determinado após reação de saponificação da amostra durante 3 h, conforme metodologia descrita em 3.2.2.5.

### 3.2.7.2 Caracterização reológica

A caracterização reológica dos hidrogéis foi feita com a utilização de um reômetro rotacional Brookfield RVDV-IIIPLUS. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software Rheocalc® 32. As análises foram realizadas em temperaturas de 4,0 °C e 35 °C, a fim de obter dados reológicos do sistema na fase sol e gel. Gráficos da tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento foram construídos para avaliação do comportamento reológico dos hidrogéis. Os perfis de escoamento de fluidos não-Newtonianos foram caracterizados com a aplicação de três modelos matemáticos: (a) Lei das Potências, para valores indicativos de índice de fluxo; (b) Bingham, para valores indicativos de viscosidade plástica ( $\eta_0$ ); e (c) Herschel Bulkley para valores indicativos de pontos de ruptura ou limite de escoamento ( $\rho A$ ). O modelo com o valor de  $r^2$  mais próximo de 1 foi escolhido como o que melhor descreve o perfil de escoamento das formulações.

### 3.2.8 Definição da estabilidade acelerada das suspensões coloidais e dos hidrogéis

A estabilidade acelerada das suspensões de nanocápsulas e dos hidrogéis contendo as nanocápsulas foi definida em centrífuga analítica LUMiSizer® (L.U.M. GmbH, Alemanha). Para a análise, 400  $\mu$ L de cada amostra foram colocados em células óticas de policarbonato e submetidas à rotação de 4.000 RPM durante 5000 s, com temperatura de 25 °C para as suspensões coloidais e de 5 °C e 25 °C para os hidrogéis, com leituras em intervalo de tempo de 10 s. A estabilidade das formulações foi avaliada por meio do perfil de transmissão tempo *versus* espaço e pelo índice de instabilidade, em que, quanto mais próximo de zero, menor é a tendência de ocorrência de fenômenos de separação de fases, como cremagem, coalescência e floculação.

### 3.2.9 Determinação do perfil de liberação *in vitro* dos carotenoides da microalga *H. pluvialis*

A determinação dos perfis de liberação *in vitro* dos carotenoides da microalga *H. pluvialis* foram realizados em membranas de diálise,

para a solução extrativa livre em acetona e nanoencapsulada e para os hidrogeis de poloxamer preparados com a solução extrativa livre e nanoencapsulada.

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados pela técnica do saco de diálise, adaptado de Panwar e colaboradores (2010). Para os ensaios, 5,0 mL da solução extrativa de *H. pluvialis*, da suspensão de nanocápsulas de PLGA-SE<sub>15</sub> e dos hidrogeis contendo a solução extrativa livre e nanoencapsulada foram colocados em sacos de diálise (MWCO 14.000, Sigma Aldrich, EUA). O hidrogel com a solução extrativa livre foi preparado com uma solução concentrada de carotenoides dispersos em acetona, a fim de manter a mesma concentração encontrada no hidrogel com a suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub>. Os sacos de diálise foram então colocados em 150 mL de tampão fosfato salino pH 7,4 contendo 0,25% (m/V) de lauril sulfato de sódio, e mantidos a 37 °C, sob agitação magnética e protegidos da luz. Em intervalos de tempos pré-determinados, alíquotas do meio de liberação foram coletadas e analisadas quanto ao teor de carotenoides totais. Após coleta, o meio de liberação foi imediatamente resposto.

Para determinação dos carotenoides totais no meio de liberação, uma curva de calibração foi construída usando a solução extrativa de *H. pluvialis* na faixa de concentração de 0,5 a 6,0 µg/mL, utilizando tampão fosfato salino com 0,25% de lauril sulfato de sódio como solvente. As análises foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 480 nm. A concentração de carotenoides totais no meio de liberação foi então estimada e a partir dos resultados obtidos, perfis de liberação de carotenoides totais (%) *versus* tempo (h) foram construídos. Modelos matemáticos que descrevem os comportamentos de liberação *in vitro* de fármacos foram aplicados a esses perfis. O modelo com o valor de  $r^2$  mais próximo de 1 foi escolhido como o que melhor descreve o perfil de liberação dos carotenoides totais das formulações analisadas.

### 3.2.10 Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni ou Dunnett para comparação entre as médias em caso de diferença significativa, usando o software GraphPad Prism 5.0. As diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ .





## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA OBTIDA A PARTIR DA MICROALGA *Haematococcus pluvialis*

A microalga *Haematococcus pluvialis* é reconhecida atualmente como a fonte biológica mais rica do carotenoide astaxantina. Entretanto, o processo de extração dessa substância torna-se um desafio devido à espessura e composição da sua parede celular. A presença de diversos compostos resistentes impede que solventes orgânicos utilizados convencionalmente em processos extrativos entrem em contato com a célula, dificultando assim, a obtenção da astaxantina intracelular (SARADA et al., 2006; KIM et al., 2015). Nesse contexto, diversos métodos de ruptura da parede celular já foram investigados a fim de obter uma extração eficiente de astaxantina dos aplanósporos de *H. pluvialis*, como aqueles que utilizam agitação com pérolas de vidro, maceração, ultrassom, micro-ondas, tratamentos ácidos e alcalinos, ruptura enzimática e fluidos supercríticos (CHOI; HONG; SIM, 2015; KIM et al., 2015; HAQUE et al., 2016).

Nesse trabalho foi utilizada uma metodologia que combina um processo de ruptura celular em banho de ultrassom, seguido de uma extração com solventes. A utilização do ultrassom tem sido amplamente utilizada na extração de produtos naturais, uma vez que essa técnica é rápida e eficiente. O aprimoramento da extração obtida com o ultrassom é atribuído, principalmente, ao efeito das cavitações acústicas produzidas no solvente pela passagem das ondas ultrassônicas. Esse fenômeno leva a um processo de instabilidade e uma consequente ruptura da parede celular. Além disso, o ultrassom também permite uma maior penetração do solvente no tecido, aumentando a área de contato entre o sólido e o líquido. Como resultado, o soluto rapidamente difunde da biomassa para o solvente, liberando os compostos ativos intracelulares de interesse para o meio extrativo (ZOU et al., 2013; HAQUE et al., 2016).

A caracterização da solução extrativa obtida a partir da biomassa de *H. pluvialis* foi realizada analisando os parâmetros de resíduo seco, pH e teores de carotenoides totais e de astaxantina livre e total. Os valores de resíduo seco e pH encontram-se demonstrados na Tabela 5.

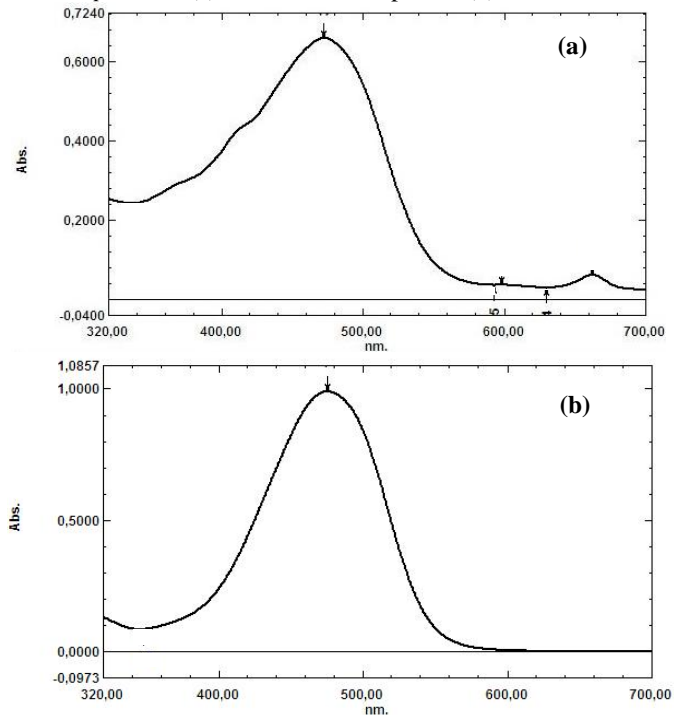
**Tabela 5.** Valores de resíduo seco e pH da solução extrativa de *Haematococcus pluvialis*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP</b>
<b>Resíduo seco (% , m/m)</b>	0,23 ± 0,02
<b>pH</b>	6,26 ± 0,03

O teor de carotenoides totais foi avaliado por espectroscopia UV/Vis, devido à presença de um sistema de ligações duplas conjugadas, característico na maioria dos compostos deste grupo. O espectro de luz no visível é a primeira ferramenta utilizada na identificação de carotenoides, onde o comprimento de onda de máxima absorção e a forma do espectro são ambos definidos pela quantidade de duplas ligações na sua estrutura química (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; MELENDEZ-MARTINEZ et al., 2006).

Os espectros de absorção UV/Vis obtidos a partir da solução extrativa de *H. pluvialis* e da astaxantina padrão encontram-se na Figura 10. A astaxantina apresenta um comprimento de onda de absorção máxima em torno de 480 nm, retratado por um pico único largo. No espectro obtido a partir da solução extrativa de *H. pluvialis* (Figura 9a), pôde-se perceber a presença de compostos carotenoides representados pela astaxantina de uma forma acentuada, além de um segundo pico de absorção de baixa intensidade entre 600 e 700 nm, o que remete possivelmente a uma extração concomitante de compostos clorofilados (LAMBERTSEN; BRAEKKAN, 1971; GHIGGI, 2007; RÉGNIER et al., 2015).

**Figura 10.** Espectros de absorção no UV/Vis da solução extrativa de *Haematococcus pluvialis* (a) e da astaxantina padrão (b).



No espectro de absorção da solução extrativa também foi possível observar ombros localizados em comprimentos de onda entre 350 e 450 nm (Figura 9a). Durante a sua fase vegetativa, a microalga *H. pluvialis* apresenta uma quantidade significativa de clorofila e outros carotenoides, principalmente de luteína. Já no processo de encistamento, a presença desses pigmentos fotossintéticos diminui, sendo substituída pelo grande acúmulo de astaxantina e de seus ésteres. No entanto, estes compostos ainda podem estar presentes, como indicado no espectro de absorção da solução extrativa, podendo ter ocorrido a sobreposição dos picos de absorção com aquele da astaxantina na faixa de comprimento de onda da análise (DRAGOS et al., 2010).

O comprimento de onda de absorção máxima verificado nessa análise foi de 475 nm e o teor de carotenoides totais na solução extrativa de *H. pluvialis* foi de 80,65 µg/mL. Considerando que ao final foram obtidos em torno 1000 mL de solução extrativa, foi possível extrair aproximadamente 80,65 mg de carotenoides a partir de uma quantidade de 5 g de biomassa, o que representa 16,13 mg de carotenoides por grama de biomassa em equivalente de astaxantina. Este resultado está de acordo com valores relatados por outros autores. Nobre e colaboradores (2006) empregaram um método de extração com pérolas de vidro usando acetona como solvente, o qual forneceu um rendimento de 13,5 mg de astaxantina por grama de biomassa. Em outro estudo, Dong e colaboradores (2014) compararam três métodos de extração diferentes auxiliados por ultrassom: um com tratamento prévio com ácido clorídrico seguido de extração com acetona e os outros dois utilizando hexano/propanol e metanol/acetona como solventes de extração. O primeiro método apresentou o melhor rendimento, de 20 mg/g de astaxantina na biomassa, e os dois últimos resultaram em valores de 10 a 14 mg/g de astaxantina na biomassa.

É importante destacar que as condições de cultivo da microalga, como temperatura, pH do meio, período de cultivo, salinidade e intensidade de luz influenciam o metabolismo desse micro-organismo e, conseqüentemente, a síntese de compostos de interesse (DE MORAIS et al., 2015). Dessa forma, não só a escolha do método de extração, mas também as condições de cultivo podem levar a diferenças na composição e no teor de substâncias ativas extraídas a partir da microalga (FELTL et al., 2005).

#### 4.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ASTAXANTINA LIVRE

A cromatografia líquida é a técnica mais precisa para separar e quantificar carotenoides em extratos naturais, inclusive em concentrações extremamente baixas. O método mais comumente utilizado para análises de carotenoides é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando a detecção por UV/Vis, visto que esse método apresenta uma alta sensibilidade e proporciona uma separação adequada em curtos intervalos de tempo (FELTL et al., 2005).

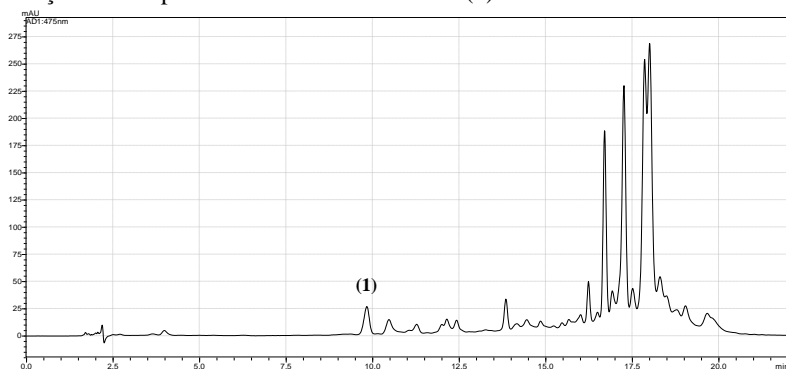
A fração carotenoide da microalga *Haematococcus pluvialis* é constituída principalmente de astaxantina na forma esterificada.

Entretanto, uma quantificação precisa por cromatografia líquida dos ésteres de astaxantina é ainda um desafio, devido à diversidade de ácidos graxos passíveis de se ligarem às hidroxilas terminais da molécula. Ainda, a eluição em diferentes tempos de retenção dos ésteres, assim como a ausência de padrões comerciais para calibração, dificulta o processo de quantificação (YUAN, 1999).

Em contraste, vários métodos foram desenvolvidos e validados para determinação da astaxantina livre (SARADA; TRIPATHI; RAVISHANKAR, 2002; HIGUERA-CIAPARA et al., 2003; RAO et al., 2009; ANARJAN et al., 2012). Nesse trabalho, uma metodologia analítica foi desenvolvida e validada partindo de condições previamente descritas na literatura, utilizando um cromatógrafo de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (DAD). Diferentes proporções da solução de ácido fórmico 0,1% e de metanol, assim como diferentes tempos de corrida e temperaturas do forno da coluna foram testadas durante o desenvolvimento do método.

Em sistemas de CLAE de fase reversa, os carotenoides não esterificados eluem primeiro, seguido sequencialmente pelos monoésteres menos polares,  $\beta$ -caroteno e, por último, os diésteres apolares. Na Figura 11 é apresentado o cromatograma representativo obtido nas condições de análise otimizadas para determinação do teor de astaxantina livre na solução extrativa de *H. pluvialis*. Neste caso, a astaxantina livre exibiu um tempo de retenção de aproximadamente 9,9 min com tempo de análise de 22 min.

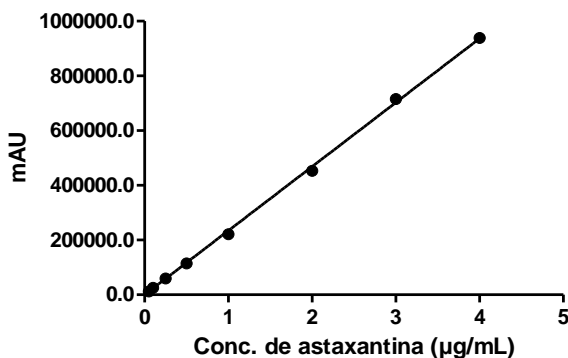
**Figura 11.** Cromatograma obtido na análise da solução extrativa de *Haematococcus pluvialis* por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no comprimento de onda de 480 nm. (1) Astaxantina livre.



### 4.2.1 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse em um determinado intervalo de concentração (SHABIR, 2003). O método desenvolvido para a determinação da astaxantina livre mostrou ser linear na faixa de concentração entre 0,05 e 4,0 µg/mL, com um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,999 e equação de reta correspondendo a  $y = 235421x - 3419,2$ , onde  $x$  representa a concentração de astaxantina livre em µg/mL e  $y$  a área absoluta do pico (Figura 12).

**Figura 12.** Curva de calibração da astaxantina padrão obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.



### 4.2.2 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade do fármaco que pode ser detectada em uma amostra, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato. O limite de quantificação (LQ) é definido como sendo a menor quantidade do fármaco em uma amostra capaz de ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão (ICH, 2005). Os valores de LD e LQ foram determinados a partir da triplicata das curvas de calibração, e corresponderam a 0,013 e 0,039 µg/mL, respectivamente.

### 4.2.3 Precisão

A precisão de um método bioanalítico é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos, a partir de

medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea. Este é um importante parâmetro que possibilita decidir se o método é confiável ou não para o objetivo da análise (CASSIANO et al., 2009).

Os resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método cromatográfico para determinação da astaxantina livre estão mostrados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) para todas as análises encontraram-se abaixo de 5%, demonstrando uma variabilidade entre as amostras intra e interdia aceitável.

**Tabela 6.** Resultados obtidos na análise da repetibilidade do método desenvolvido por CLAE para quantificação da astaxantina livre na solução extrativa de *H. pluvialis*.

Repetições	Concentração (µg/mL)	Média (µg/mL)	DPR (%)
1	1,43		
2	1,42		
3	1,36	1,40	1,95
4	1,38		
5	1,42		
6	1,41		

**Tabela 7.** Resultados obtidos na análise da precisão intermediária do método desenvolvido por CLAE para quantificação da astaxantina livre na solução extrativa de *H. pluvialis*.

Dias	Concentração (µg/mL)	Média (µg/mL)	DPR (%)
1	1,40		
2	1,43	1,43	2,10
3	1,46		

#### 4.2.4 Exatidão

A exatidão é um parâmetro que representa o grau de concordância entre o valor obtido pelo método analítico e o valor nominal, aceito como referência (ICH, 2005). Neste estudo a exatidão do método foi determinada a partir do ensaio de adição de padrão, que consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de referência na matriz da amostra, neste caso a solução extrativa de *H. pluvialis* (RIBANI et al., 2004). Segundo a legislação brasileira, a exatidão pode ser calculada como porcentagem de recuperação da

quantidade de substância referência adicionada à matriz (BRASIL, 2003).

Conforme mostrado na Tabela 8, os valores de recuperação da astaxantina livre na solução extrativa variaram de 98,29 a 101,13%, evidenciando a exatidão do método.

**Tabela 8.** Recuperação da astaxantina livre após adição de solução padrão em amostras de solução extrativa de *H. pluvialis*.

Concentração de astaxantina livre ( $\mu\text{g/mL}$ )					
Extrato nominal	Sol. Padrão adicionada	Extrato + Sol. Padrão ( $C_{\text{teor.}}$ )	Extrato + Sol. Padrão ( $C_{\text{exp.}}$ )	Recuperação (%)	DPR* (%)
	0,14	1,52	1,51	99,34	0,66
1,38	0,39	1,77	1,79	101,13	0,67
	1,54	2,92	2,87	98,29	0,35

\*DPR: desvio padrão relativo.

#### 4.2.5 Robustez

A robustez de um método analítico mede sua suscetibilidade frente às pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina (CASSIANO et al., 2009). Para avaliar a robustez do método desenvolvido, os parâmetros comprimento de onda de detecção e temperatura de forno foram modificados, com posterior análise do teor e do tempo de retenção da astaxantina livre. Os resultados estão mostrados na Tabela 9.

Como se pode notar, as pequenas variações realizadas no método não levaram a uma mudança no teor de astaxantina livre. Ao variar a temperatura do forno 2,0 °C acima ou abaixo em relação à temperatura utilizada rotineiramente, é possível verificar uma leve mudança no tempo de retenção da astaxantina, possivelmente pela alteração de viscosidade dos solventes ao passar pela coluna. Entretanto, essa alteração não influenciou no teor de astaxantina obtido, confirmando a robustez do método desenvolvido.



**Tabela 9.** Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método desenvolvido por CLAE para quantificação da astaxantina livre na solução extrativa de *H. pluvialis*.

Parâmetros	Teor (µg/mL)	DPR (%)	Tempo de Retenção (min.)
<b>Comp. de onda (nm)</b>	<b>473</b>	1,20	2,66
	<b>475</b>	1,21	1,57
	<b>477</b>	1,21	1,32
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>27</b>	1,23	1,30
	<b>29</b>	1,21	1,57
	<b>31</b>	1,22	1,88

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ASTAXANTINA TOTAL NA SOLUÇÃO EXTRATIVA DE *H. pluvialis*

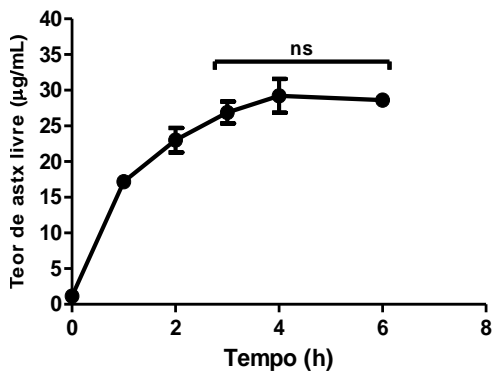
Na microalga *H. pluvialis*, o carotenoide astaxantina existe predominantemente como ésteres formados pela combinação de vários ácidos graxos com diferentes isômeros de astaxantina. Assim, em diferentes cepas de algas e condições de cultura, a composição de ésteres de astaxantina é variável (YUAN; CHEN, 2000). Considerando a dificuldade de separação cromatográfica e quantificação destes compostos, a hidrólise dos ésteres de astaxantina foi realizada visando à quantificação da astaxantina total na solução extrativa e nas etapas seguintes do trabalho.

A reação de hidrólise é realizada mediante adição de uma base forte, neste caso o hidróxido de sódio, para que ocorra a clivagem da ligação éster. Entretanto, a concentração da solução da base é de fundamental importância para promover a hidrólise adequada dos ésteres e minimizar a degradação da astaxantina durante o processo (MOSQUERA; GALVEZ, 1998). Diversos métodos para saponificação de carotenoides já foram descritos na literatura, com variações no tipo de álcali e na temperatura utilizada para reação. Uma vez que altas concentrações de álcalis e o calor podem levar à degradação e à isomerização dessas substâncias, uma saponificação suave deve ser realizada (YUAN; CHEN, 2000). Portanto, nesse estudo a reação foi realizada com uma baixa concentração de hidróxido de sódio e sem aquecimento.

Na Figura 13 estão apresentadas as mudanças no teor de astaxantina livre em função do tempo de reação de saponificação. É possível perceber que a velocidade de hidrólise dos ésteres foi maior na primeira

hora de reação, e decresceu até atingir um platô, onde não foi mais observada uma variação significativa no teor de astaxantina.

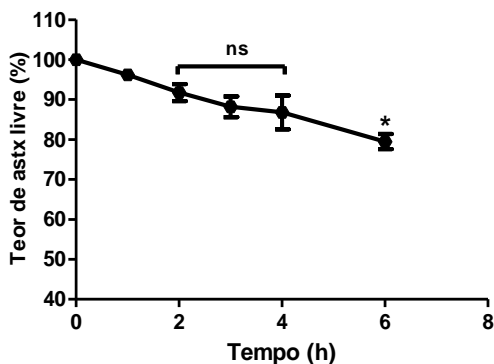
**Figura 13.** Mudança no teor de astaxantina livre (astx) na solução extrativa de *H. pluvialis* em função do tempo de reação de saponificação. As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$  (ns= não significativo).



A estabilidade da astaxantina durante a reação de saponificação foi investigada empregando-se uma solução padrão deste carotenoide com concentração conhecida ( $4,0 \mu\text{g/mL}$ ). O teor de astaxantina em função do tempo de reação encontra-se demonstrado na Figura 14. Pode-se observar que um decréscimo de cerca de 10% no teor de astaxantina ocorreu entre 2 e 4 h de reação, enquanto que após 6 h, este decréscimo foi de cerca de 20%. Considerando estes resultados, pode-se concluir que a condição que melhor satisfaz o objetivo de alcançar uma máxima eficiência no processo de hidrólise dos ésteres, juntamente com a menor taxa de degradação de astaxantina livre, é utilização de uma saponificação branda com um tempo de reação de 3 h.

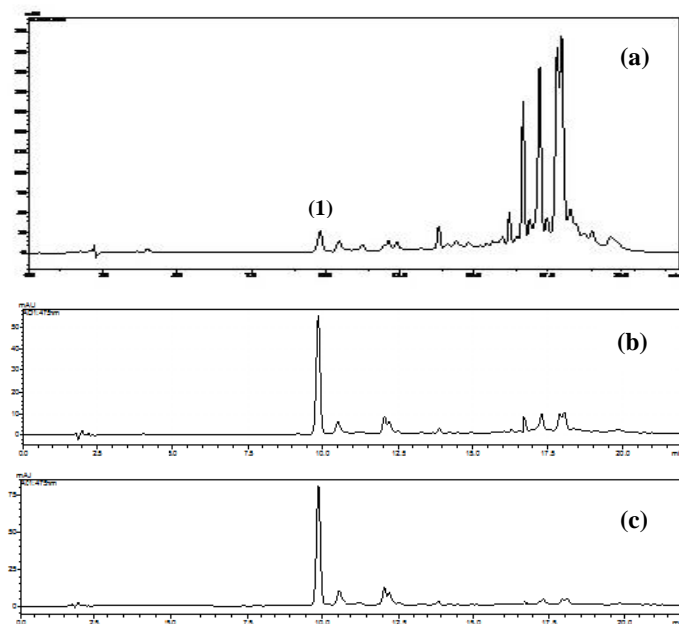
Neste contexto, o teor de astaxantina total na solução extrativa de *H. pluvialis* no presente trabalho foi estimado em  $26,89 \pm 1,54 \mu\text{g/mL}$ , partindo de uma solução extrativa com concentração inicial de astaxantina livre em torno de  $1,17 \mu\text{g/mL}$ . Esse resultado demonstra que um alto percentual do teor de carotenoides totais encontrado na solução extrativa de *H. pluvialis* é representado pela astaxantina e seu ésteres, conforme já descrito na literatura.

**Figura 14.** Avaliação da estabilidade da astaxantina padrão durante a reação de saponificação. \*As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$  (ns= não significativo).



Na Figura 15 estão mostrados os cromatogramas obtidos antes e durante o processo de saponificação de uma amostra de solução extrativa de *H. pluvialis*, confirmando a hidrólise total dos ésteres de astaxantina após 4 h de reação.

**Figura 15.** Cromatogramas obtidos por CLAE durante o processo de saponificação (a) anterior à hidrólise (b) 2 horas (c) 4 horas. (1) Astaxantina livre.



#### 4.4 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

##### 4.4.1 Avaliação das características físico-químicas das nanocápsulas

Neste estudo, nanocápsulas poliméricas foram desenvolvidas para encapsular os carotenoides de *H. pluvialis* devido à afinidade inerente destes compostos pelo núcleo oleoso das partículas e pela possibilidade da parede polimérica em proteger os mesmos frente à oxidação. A nanoprecipitação tem sido a principal técnica relatada na literatura no preparo de nanocápsulas poliméricas, principalmente devido à facilidade e rapidez de execução, assim como a sua aplicabilidade para uma ampla gama de matérias-primas (POHLMANN et al., 2016). Nesse método, uma solução de um solvente orgânico miscível em água contendo um tensoativo lipofílico, a substância ativa, um óleo e uma substância formadora de filme (polímero), é vertida em uma fase aquosa contendo

água e um tensoativo hidrofílico. As nanocápsulas são formadas instantaneamente pela deposição do polímero na interface das gotículas geradas, após a rápida difusão do solvente orgânico em direção à fase aquosa (FESSI et al., 1989; MORA-HUERTAS et al., 2010).

As características das nanocápsulas formadas dependem de vários fatores, como a natureza química e a concentração do polímero e da substância ativa a ser encapsulada, a quantidade de surfactante, a razão de volumes da fase orgânica/fase aquosa, a concentração do óleo e a velocidade de difusão da fase orgânica na fase aquosa (GREF; COUVREUR, 2006; MORA-HUERTAS et al., 2010). Durante o desenvolvimento das nanopartículas brancas (sem carotenoides), diferentes concentrações do polímero PCL e de lecitina de soja foram testadas, bem como outras proporções de fase orgânica/fase aquosa. Muitas formulações apresentaram um alto índice de polidispersão, agregados e precipitados, sendo então descartadas. Nesses estudos iniciais, a concentração de 75 mg de lecitina mostrou-se adequada para estabilizar uma quantidade de 250  $\mu\text{L}$  de triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico e a proporção de fase orgânica/fase aquosa escolhida foi de 25/40 mL. A partir desses resultados, o efeito da concentração do tensoativo hidrofílico Tween 80 sobre as características físico-químicas das suspensões coloidais de nanocápsulas foi avaliado. Os resultados encontram-se relatados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Caracterização físico-química da suspensão de nanocápsulas brancas.

Formulação	Tamanho (nm)	IPD*	Potencial Zeta (mV)	pH
NCB-T <sub>0,25</sub>	220,9 <sup>a</sup> $\pm$ 4,8	0,133 <sup>a</sup> $\pm$ 0,014	-38,3 <sup>a</sup> $\pm$ 5,9	6,36 $\pm$ 0,10
NCB-T <sub>0,50</sub>	198,1 <sup>b</sup> $\pm$ 6,4	0,112 <sup>a</sup> $\pm$ 0,004	-39,6 <sup>a</sup> $\pm$ 2,7	6,57 $\pm$ 0,25
NCB-T <sub>1,0</sub>	198,7 <sup>b</sup> $\pm$ 2,5	0,133 <sup>a</sup> $\pm$ 0,002	-24,6 <sup>b</sup> $\pm$ 5,7	6,73 $\pm$ 0,22

\*IPD = Índice de Polidispersão

Valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n= 3)

Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05)

Como pode ser observado, todas as formulações apresentaram diâmetro médio de cerca de 200 nm e distribuição unimodal de tamanho de partícula, visto que o índice de polidispersão foi menor que 0,2. No entanto, as formulações preparadas com a menor concentração de

Tween 80 apresentaram diâmetro médio significativamente maior que aquelas obtidas com a concentração de 0,5 e 1,0%.

O potencial zeta é o parâmetro que reflete a carga de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003). O potencial zeta das formulações variou de -24,6 a -39,6 mV, sendo que o menor valor foi obtido com a utilização da maior concentração de polissorbato 80 (Tween 80). O polissorbato 80 é um tensoativo não-iônico, portanto, a redução do potencial zeta observado decorreu do mascaramento das cargas negativas pelas cadeias de óxido de etileno deste surfactante que se localizam na interface com a fase aquosa. Por outro lado, a carga negativa das suspensões pode ter sido originada, em parte, pela dissociação dos grupamentos carboxílicos terminais da PCL localizados na superfície das partículas. Além disso, as lecitinas são tensoativos naturais obtidos da soja ou gema de ovo, constituído principalmente por fosfatidilcolina e pequenas quantidades de lipídios ácidos, os quais, por sua vez, também podem conferir carga superficial negativa às partículas (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996, TEIXEIRA et al., 2004).

O valor do potencial zeta está relacionado com uma apropriada estabilidade físico-química da suspensão coloidal de nanocápsulas; quanto mais alto o valor em módulo, maiores são as forças repulsivas entre as partículas, impedindo a formação de agregados. De uma forma geral, tem sido estabelecido que valores entre 25 e 30 mV em módulo conferem às suspensões uma boa estabilidade coloidal (ASTETE; SABLIOV, 2006; MORA-HUERTAS et al., 2010). Todavia, tensoativos não iônicos podem estabilizar suspensões coloidais por efeito estérico, mesmo aquelas exibindo baixos valores de potencial zeta (SANTOS et al., 2012; MAZZARINO, 2013).

Considerando os resultados mostrados acima, a concentração de 0,5% de Tween 80 foi a escolhida para dar sequência ao desenvolvimento de nanocápsulas contendo carotenoides de *Haematococcus pluvialis*. Suspensões de nanocápsulas foram então preparadas pela incorporação da solução extrativa na fase orgânica das formulações, em diferentes concentrações. Nesta etapa do trabalho, o PLGA foi igualmente testado como polímero da parede polimérica. As características físico-químicas das nanocápsulas de PCL e PLGA, contendo a solução extrativa de *H. pluvialis* podem ser visualizadas nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

**Tabela 11.** Características físico-químicas das nanocápsulas de PCL contendo a solução extrativa de *H. pluvialis*.

Formulação	Tamanho (nm)	IPD*	Potencial Zeta (mV)	pH
PCL-SE <sub>21</sub>	229,7 <sup>a</sup> ± 9,5	0,135 <sup>a</sup> ± 0,019	-39,1 <sup>a</sup> ± 2,3	6,51 ± 0,20
PCL-SE <sub>18</sub>	203,2 <sup>b</sup> ± 5,9	0,154 <sup>a</sup> ± 0,034	-37,9 <sup>a,b</sup> ± 0,6	6,82 ± 0,06
PCL-SE <sub>15</sub>	201,9 <sup>b</sup> ± 3,9	0,128 <sup>a</sup> ± 0,032	-38,7 <sup>a</sup> ± 1,4	6,67 ± 0,20
<b>PCL-Branca</b>	187,1 <sup>b</sup> ± 6,4	0,110 <sup>a</sup> ± 0,020	-29,5 <sup>b</sup> ± 5,6	6,51 ± 0,40

\*IPD = Índice de Polidispersão

Valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3)

Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05)

**Tabela 12.** Características físico-químicas das nanocápsulas de PLGA contendo a solução extrativa de *H. pluvialis*.

Formulação	Tamanho (nm)	IPD*	Potencial Zeta (mV)	pH
PLGA-SE <sub>21</sub>	241,0 <sup>a</sup> ± 51,9	0,279 <sup>a</sup> ± 0,088	-51,0 <sup>a</sup> ± 5,5	5,86 ± 0,10
PLGA-SE <sub>18</sub>	242,2 <sup>a</sup> ± 30,4	0,260 <sup>a</sup> ± 0,099	-48,5 <sup>a,b</sup> ± 4,9	5,79 ± 0,09
PLGA-SE <sub>15</sub>	199,0 <sup>a</sup> ± 2,8	0,145 <sup>a</sup> ± 0,019	-40,3 <sup>a,b</sup> ± 5,0	6,01 ± 0,21
<b>PLGA-Branca</b>	193,3 <sup>a</sup> ± 14,7	0,207 <sup>a</sup> ± 0,016	-36,7 <sup>b</sup> ± 2,9	5,92 ± 0,17

\*IPD = Índice de Polidispersão

Valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3)

Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05)

É possível verificar nas Tabelas 11 e 12, que as formulações de nanocápsulas contendo a solução extrativa de *H. pluvialis* exibiram distribuição monomodal de tamanho de partícula, com diâmetro médio variando de 201 a 229 nm e de 199 a 242 nm, e índice de polidispersão variando de 0,110 a 0,154 e de 0,145 a 0,279 para as nanocápsulas preparadas com PCL e PLGA, respectivamente. No entanto, ambos os tipos de polímero e a quantidade de solução extrativa mostraram afetar o tamanho das partículas. Tem sido relatado que o aumento do diâmetro de nanopartículas com a adição da substância a ser encapsulada está relacionada com uma mudança de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial do núcleo oleoso. Da mesma maneira, a massa molecular do polímero é um fator que pode influenciar no tamanho das

partículas, evidenciado pelo valor encontrado nas formulações preparadas com o polímero PLGA, visto que este apresenta uma massa molecular levemente maior que a do PCL utilizado nesse estudo (MOSQUEIRA et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Nessa análise, o potencial zeta das formulações testadas variou entre -29 e -39 mV (Tabela 11) para as formulações preparadas com PCL e entre -36 e -51 mV para as formulações preparadas com PLGA (Tabela 12), demonstrando uma boa estabilidade coloidal das suspensões. É possível observar também que as formulações brancas apresentaram uma carga superficial menor em relação às nanocápsulas contendo a solução extrativa. Este resultado indica que componentes presentes na solução extrativa encontram-se adsorvidos na superfície das partículas.

Uma propriedade importante que deve ser avaliada e que pode afetar a estabilidade dos carotenoides é o pH. Devido à grande quantidade de duplas ligações, as substâncias deste grupo são susceptíveis a diversos processos de degradação, especialmente quando em contato com altas temperatura, oxigênio e pH muito ácidos ou alcalinos (MÉLENDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004; QIAN et al., 2012). Nesse contexto, todas as suspensões coloidais de nanocápsulas tiveram seus valores de pH ajustados, deixando-as levemente ácidas. O valor escolhido levou em consideração o valor da própria solução extrativa, que apresentou um pH médio de 6,26. Para fins de comparação, as suspensões de nanocápsulas brancas tiveram os valores de pH ajustados da mesma maneira.

Após alguns dias de armazenamento, as formulações preparadas com o polímero PCL se mostraram instáveis, apresentando precipitados. Este fato demonstra que o PCL foi incapaz de estabilizar as partículas, seja por uma diferença de massa molar quando comparada com o polímero PLGA ou por uma diferença de distribuição molar. Essa hipótese pode ser corroborada pela diferença de potencial zeta das formulações, em que as preparadas com PLGA obtiveram valores mais altos em módulo. Portanto, apenas as formulações desenvolvidas com PLGA foram selecionadas para dar continuidade ao trabalho.

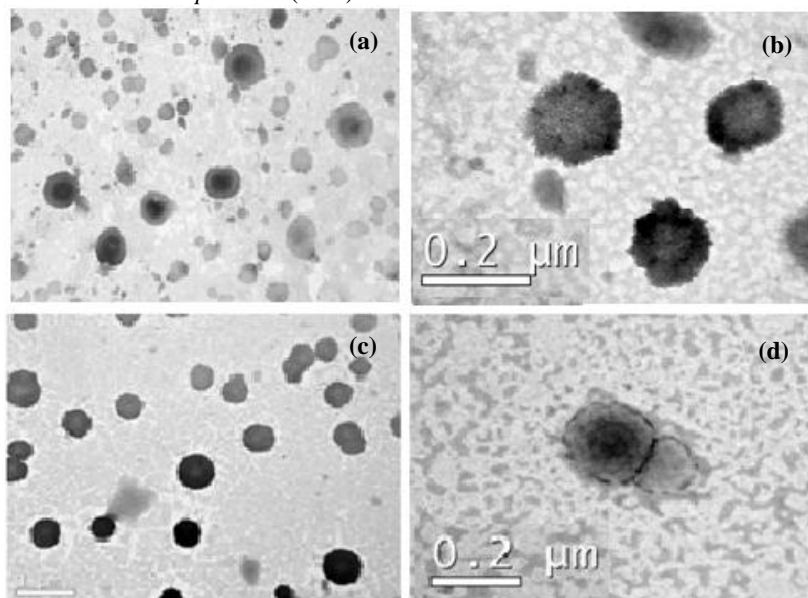
#### **4.4.2 Avaliação da morfologia**

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanocápsulas de PLGA brancas e contendo a solução extrativa de *H. pluvialis* (PLGA-SE<sub>15</sub>) podem ser visualizadas na Figura 16. Como pode ser observado, as nanocápsulas apresentaram formato



esférico e superfície irregular, com tamanho de cerca de 200 nm, estando de acordo com os resultados de tamanho obtidos por espectroscopia de correlação fotônica. Além disso, a presença da parede polimérica ao redor do núcleo oleoso pode ser claramente visualizada nestas micrografias, evidenciando a formação de uma estrutura vesicular de nanocápsulas.

**Figura 16.** Micrografias obtidas por TEM da suspensão de nanocápsulas brancas (a e b) e da suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> contendo carotenoides de *H. pluvialis* (c e d).

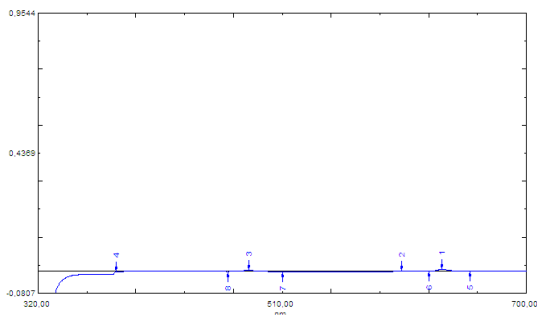


#### 4.4.3 Determinação do teor de carotenoides totais

A determinação do teor de carotenoides totais nas nanocápsulas de PLGA contendo a solução extrativa de *H. pluvialis* foi realizada por espectrofotometria de absorção no visível. A fim de verificar se algum dos componentes da suspensão coloidal poderia afetar a quantificação dos carotenoides, um espectro de varredura de uma suspensão de nanocápsulas brancas de PLGA foi obtido na faixa de comprimento de onda de 320 a 700 nm (Figura 17). Como pode-se observar, nenhum dos componentes da formulação exibiu absorção na faixa de comprimento

de onda avaliado, mostrando que a metodologia empregada é específica para a análise dos carotenoides.

**Figura 17.** Espectro de absorção de uma suspensão de nanocápsulas brancas de PLGA na faixa de comprimento de onda de 320 a 700 nm.



Os valores do teor de carotenoides totais para as suspensões de nanocápsulas encontram-se expostos na Tabela 13. A concentração de carotenoides totais variou de 156,16 a 106,37  $\mu\text{g/mL}$ , sendo diretamente proporcional à quantidade de solução extrativa adicionada. Entretanto, nas formulações em que se empregou 21 e 18 mL de solução extrativa de *H. pluvialis*, foi possível verificar a presença de precipitados vermelhos após poucos dias de armazenamento, o que se remete a um provável excesso de carotenoides adicionado. Dessa forma, apesar de as suspensões com maiores quantidade de solução extrativa apresentarem teores de carotenoides totais mais elevados, essas formulações não foram estáveis. Em contraste, a formulação com a incorporação de 15 mL da solução extrativa manteve-se uniforme, mostrando-se promissora para o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica.

**Tabela 13.** Teor de carotenoides totais das suspensões de nanocápsulas de PLGA contendo a solução extrativa de *H. pluvialis*.

Formulação	Teor de CT ( $\mu\text{g/mL}$ )
PLGA-SE <sub>21</sub>	156,16 $\pm$ 12,57
PLGA-SE <sub>18</sub>	113,58 $\pm$ 7,37
PLGA-SE <sub>15</sub>	106,37 $\pm$ 3,53

Valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n =3)

#### 4.4.4 Determinação do teor de astaxantina e eficiência de encapsulação

O teor de astaxantina livre e total nas nanocápsulas de PLGA contendo 15 mL de solução extrativa de *H. pluvialis* (PLGA-SE<sub>15</sub>) foi determinado por metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência, conforme descrito em 3.2.2.4. O teor de astaxantina total foi determinado após reação de saponificação dos ésteres de astaxantina, com um tempo de reação de 3 h, conforme descrito em 3.2.2.5. O ensaio de especificidade realizado demonstrou que nenhum dos componentes das nanocápsulas apresentou absorção no comprimento de onda de análise. Os resultados estão mostrados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Teor de astaxantina livre e astaxantina total na suspensão de nanocápsulas de PLGA contendo 15 mL de solução extrativa de *H. pluvialis*.

Formulação	Teor de astaxantina livre (µg/mL)	Teor de astaxantina total (µg/mL)
PLGA-SE <sub>15</sub>	2,08 ± 0,39	49,33 ± 0,63

Valores são expressos como média ± desvio padrão (n =3)

A concentração de astaxantina livre no sobrenadante obtido pelo método de ultrafiltração/centrifugação da formulação PLGA-SE<sub>15</sub> foi menor que o limite de quantificação do método desenvolvido por CLAE, indicando que apenas uma pequena concentração (<0,039 µg/mL) não foi encapsulada. Visto que o teor de astaxantina livre na formulação ficou em torno de 2,0 µg/mL, é possível afirmar que o valor de eficiência de encapsulação foi maior que 98%, indicando que quase a totalidade deste composto encontra-se associado às partículas. Este elevado valor de eficiência de encapsulação está relacionado à grande afinidade da astaxantina pelo núcleo oleoso das nanocápsulas. No entanto, a possibilidade de parte deste composto encontrar-se adsorvido às partículas não pode ser descartada.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DA SOLUÇÃO EXTRATIVA DA MICROALGA *H. pluvialis* LIVRE E NANOENCAPSULADA

Os antioxidantes são moléculas amplamente conhecidas e estudadas devido ao seu envolvimento no mecanismo de defesa de patologias associadas ao ataque de radicais livres. Existem inúmeras substâncias derivadas de fontes naturais, a exemplo dos carotenoides,

que têm sido consideradas promissoras para serem exploradas como antioxidantes, em particular para aplicação tópica na fotoproteção e quimioprevenção (GODIC et al., 2014).

O estudo em questão teve como intuito determinar a atividade antioxidante dos carotenoides extraídos da microalga *H. pluvialis*, reconhecida por produzir altas concentrações do carotenoide astaxantina, bem como o potencial antioxidante da suspensão de nanocápsulas desenvolvida contendo os carotenoides da solução extrativa. Esse ensaio foi realizado pelo método colorimétrico com 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), o qual se baseia na avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres de uma substância. O DPPH é caracterizado como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado em toda a molécula, o que a confere uma coloração violeta. Quando este radical reage com um doador de hidrogênio, o mesmo é reduzido a hidrazina, resultando em uma mudança de cor do violeta para amarelo-pálido (MOLYNEUX, 2003).

Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos na determinação da atividade antioxidante para solução extrativa de *H. pluvialis* livre e nanoencapsulada encontram-se na Tabela 15.

**Tabela 15.** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos na avaliação da capacidade sequestradora do radical DPPH da solução extrativa de *H. pluvialis* livre e nanoencapsulada.

<b>Amostra</b>	<b>IC<sub>50</sub>* (µg/mL ± DP)</b>
<b>SE Livre</b>	1,96 <sup>a</sup> ± 0,02
<b>PLGA-SE<sub>15</sub></b>	0,61 <sup>b</sup> ± 0,03
<b>Ácido Ascórbico</b>	5,70 <sup>c</sup> ± 0,27

\*IC<sub>50</sub>= Atividade sequestradora de radical (concentração necessária para redução de 50% do radical DPPH).

Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05)

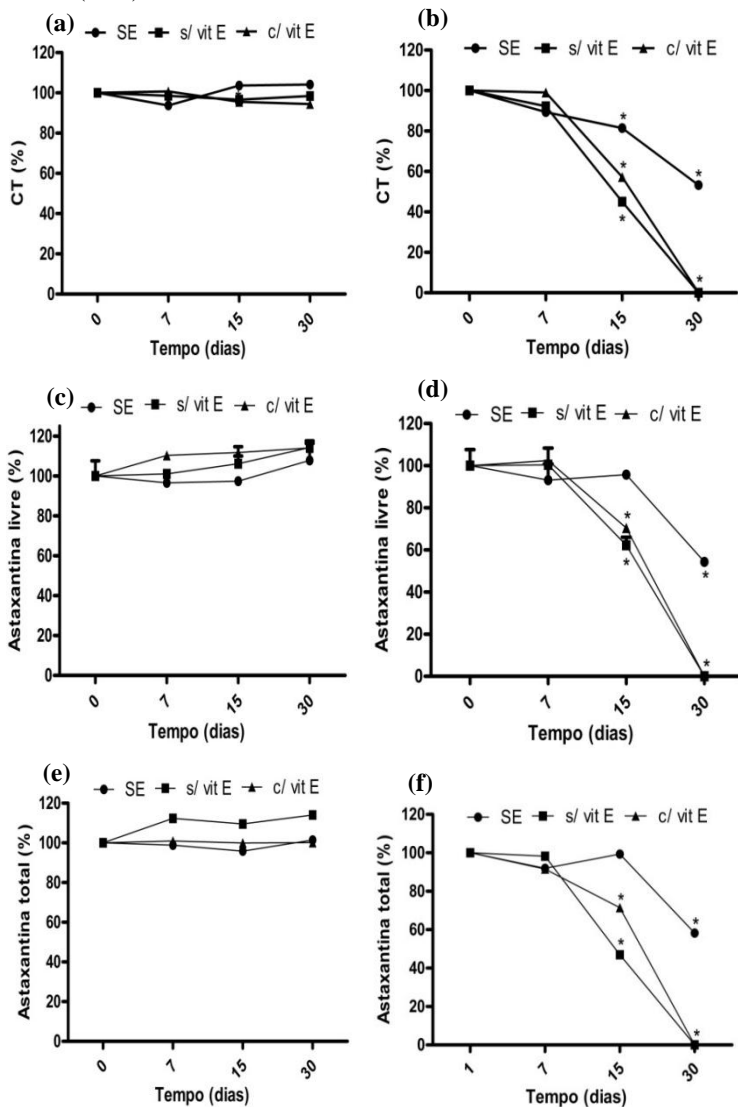
A astaxantina é descrita na literatura como um carotenoide com alto poder antioxidante. Sabendo que a fração carotenoide da microalga *H. pluvialis* é composta, principalmente, de astaxantina livre e seus ésteres, esse ensaio foi capaz de confirmar o elevado potencial sequestrador de radical dessa molécula. Quando comparada a um controle positivo, no caso o ácido ascórbico, os carotenoides extraídos de *H. pluvialis* na forma livre apresentaram uma atividade antioxidante cerca de três vezes maior. Da mesma maneira, é possível verificar um aumento expressivo da atividade antioxidante da solução extrativa da

microalga *H. pluvialis* quando ela se encontra na forma nanoencapsulada, apresentando um valor três vezes maior que na sua forma livre. A atividade antioxidante de uma suspensão de nanocápsulas brancas também foi testada nas mesmas concentrações, porém, nenhuma atividade foi encontrada. Assim, uma investigação mais aprofundada deve ser realizada para confirmar o porquê do aumento da atividade antioxidante *in vitro* dos carotenoides nanoencapsulados.

#### 4.6 DEFINIÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DOS CAROTENOIDES FRENTE À TEMPERATURA

Os carotenoides são moléculas altamente instáveis a diversos fatores externos, assim, nesse estudo a estabilidade dos carotenoides de *H. pluvialis* foi definida após armazenamento das formulações a 5,0 °C e a temperatura ambiente (25 °C). Neste ensaio também foi avaliado o efeito da adição do antioxidante vitamina E sobre a estabilidade das formulações. Os resultados obtidos no estudo de estabilidade química das formulações PLGA-SE<sub>15</sub> e da solução extrativa de *H. pluvialis* durante 30 dias em ambas as temperaturas encontram-se mostrados na Figura 18.

**Figura 18.** Avaliação da estabilidade química da formulação PLGA-SE<sub>15</sub>, com e sem adição de vitamina E, e da solução extrativa livre (SE), armazenadas em diferentes temperaturas durante um período de 30 dias. (a) Teor de carotenoides totais a 5,0 °C; (b) Teor de carotenoides totais a 25 °C; (c) Teor de astaxantina livre a 5,0 °C; (d) Teor de astaxantina livre a 25 °C; (e) Teor de astaxantina total a 5,0 °C; (f) Teor de astaxantina total a 25 °C. \*p < 0,05 quando comparado com o teor inicial (n=3).



Conforme pode ser observado na Figura 18, tanto as formulações de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub>, como a solução extrativa apresentaram teores de carotenoides totais e de astaxantina livre e total inalterados durante o período de estudo ao serem armazenadas na geladeira (5,0 °C). Em contraste, quando armazenadas a temperatura ambiente (25 °C), tanto a solução extrativa de *H. pluvialis*, quanto as suspensões de nanocápsulas poliméricas tiveram os teores de carotenoides significativamente reduzidos. Quanto a estes compostos, as nanocápsulas permaneceram estáveis nos primeiros 7 dias, com decaimento entre 30 a 50% do teor após 15 dias de armazenamento. A completa perda da estrutura das suspensões coloidais foi observada macroscopicamente após 30 dias de armazenamento, não sendo possível a quantificação dos carotenoides. Na avaliação da estabilidade da solução extrativa, pode-se notar que os teores de astaxantina livre e astaxantina total permaneceram inalterados após 15 dias de armazenamento e que após 30 dias houve uma redução de aproximadamente 50% nos valores dos mesmos.

Essa maior degradação dos compostos ativos na suspensão de nanocápsulas, em relação à solução extrativa livre pode ser um indicativo de hidrólise do polímero PLGA, evidenciado pela modificação visual das suspensões, as quais apresentaram precipitados escuros a partir na segunda semana de armazenamento. Em água, o PLGA se degrada através da quebra das suas ligações ésteres em oligômeros, e por último, em monômeros. A velocidade com que ocorre a hidrólise depende de vários fatores, como massa molar e proporção de ácido láctico e glicólico no copolímero e presença de enzimas. Em particular, o PLGA 50:50 utilizado neste trabalho leva de 1 a 2 semanas para se degradar, sendo o mais rapidamente degradável copolímero desta classe (AGRAWAL et al., 1997; MAKADIA; SIEGEL, 2011; GENTILE et al., 2014).

No curto tempo de estudo, uma incompatibilidade entre compostos presentes na solução extrativa de *H. pluvialis* e o polímero pode ter acelerado a degradação do PLGA, que ao gerar compostos ácidos como o ácido láctico e glicólico, pode ter contribuído para a mais rápida degradação dos carotenoides. Entretanto, estudos de estabilidade mais aprofundados precisariam ser realizados para confirmar estes resultados. Finalmente, para a estabilidade frente à temperatura, a adição de vitamina E nas formulações não proporcionou algum tipo de proteção aos carotenoides presentes na solução extrativa. Com o resultado obtido neste estudo, pode-se afirmar que é de fundamental importância o

cuidado no armazenamento das formulações, mantendo-as sempre em baixas temperaturas para garantir a sua integridade química.

#### 4.7 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGEIS TERMOSENSÍVEIS CONTENDO AS NANOCÁPSULAS CONTENDO CAROTENOIDES DE *H. pluvialis*

As suspensões coloidais de nanocápsulas apresentam baixa viscosidade, o que dificulta a sua aplicação tópica. Assim, com o objetivo de obter hidrogéis termossensíveis, o poloxamer 407 foi adicionado na fase externa das suspensões de nanocápsulas de PLGA-SE<sub>15</sub>. O poloxamer 407 é um copolímero anfifílico sintético, que consiste de um segmento hidrofóbico de poli (oxipropileno) entre dois blocos hidrofílicos de poli (oxietileno) (ROWE; SHESKY; QUINN, 2009). Devido à sua natureza anfifílica, as moléculas de poloxamer formam agregados micelares espontaneamente, dependendo da sua concentração e temperatura. A desidratação dos blocos hidrofóbicos combinados com a hidratação dos blocos hidrofílicos levam à formação de micelas esféricas que sofrem subsequente empacotamento, resultando em uma rede tridimensional cúbica, a qual constitui a principal estrutura dos hidrogéis de poloxamer (PEREIRA et al., 2013).

O processo de formação de um gel a partir das cadeias poliméricas de poloxamer ocorre quando há o aumento da temperatura até um valor limite, chamado de temperatura de transição sol-gel. Esse parâmetro é altamente dependente da concentração de poloxamer; quanto menor a sua concentração, maior a temperatura de transição. De uma forma geral, hidrogéis de poloxamer apresentam temperatura de transição sol-gel variando de 15 °C a 35 °C para concentrações na faixa de 28 a 15% (m/m). Entretanto, esse valor pode sofrer alterações com a inclusão de fármacos e outros aditivos na preparação do hidrogel, uma vez que eles podem interferir na formação das micelas e na desidratação dos blocos hidrofóbicos de poli (oxipropileno). Deste modo, dispersões de poloxamer exibem propriedades de um fluido em temperaturas mais baixas, porém, formam geis *in situ* facilmente quando em contato com a temperatura corporal (DUMORTIER et al., 2006; PEREIRA et al., 2013; BUWALDA et al., 2014). Essa característica garante um perfil particularmente interessante para formulações de uso tópico cutâneo, visto que ela permite uma aplicação facilitada na forma de um *spray* que gelifica ao contato com a pele, evitando o escoamento e melhorando o contato da forma farmacêutica com o sítio de absorção.



Inicialmente, as concentrações de poloxamer 407 de 16 e 25% (m/V) foram testadas para a preparação dos hidrogeis. No entanto, a adição de 25% de poloxamer à suspensão de nanocápsulas levou à formação de um hidrogel altamente viscoso quando exposto à temperatura ambiente. Além disso, a elevada viscosidade deste hidrogel proporcionou características sensoriais inadequadas à aplicação tópica cutânea. Por outro lado, a formulação contendo 16% de poloxamer mostrou uma viscosidade adequada, boa espalhabilidade, além de promover a formação de um filme na pele para um potencial controle de liberação dos compostos nanoencapsulados. Assim, essa concentração foi escolhida para a preparação dos hidrogeis contendo as nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub>.

#### 4.7.1 Determinação das características físico-química no hidrogel termossensível contendo a suspensão de nanocápsulas de PLGA-SE<sub>15</sub>

Após a incorporação do poloxamer 407 na suspensão de nanocápsulas, as características físico-químicas de tamanho de partícula e potencial zeta, assim como o teor de carotenoides totais e de astaxantina no hidrogel foram avaliadas. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 16.

**Tabela 16.** Características de tamanho de partícula, potencial zeta, teor de carotenoides totais (CT) e de astaxantina (Astx) do hidrogel de poloxamer 407 contendo a suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub>.

Formulação	Tamanho (nm) (IPD) <sup>1</sup>	Potencial Zeta (mV)	CT (µg/mL)	Astx livre (µg/mL)	Astx total (µg/mL)
<b>HG PLGA- SE<sub>15</sub></b>	208,0 ± 10,3 (0,166)	-27,5 ± 0,4	89,53 ± 9,02	1,68 ± 0,19	39,46 ± 0,54

<sup>1</sup>Entre parênteses, índice de polidispersão (IPD).

Valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3)

Como pode ser observado na Tabela 16, o diâmetro médio das partículas se manteve em valores similares àqueles previamente encontrados para a suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub>. Da mesma maneira, a adição de poloxamer para formação do hidrogel não influenciou no índice de polidispersão, mantendo a característica de distribuição monomodal de tamanho de partícula. Entretanto, é possível verificar que o valor de potencial zeta sofreu um decréscimo em módulo de -40 mV na suspensão de nanocápsulas para -27,5 mV no hidrogel

(ver Tabela 12). Os teores de carotenoides totais e astaxantina livre e total sofreram uma redução de cerca de 20% no hidrogel (ver Tabela 13 e 14), provavelmente decorrente de um efeito de diluição das formulações com a adição do poloxamer 407.

#### 4.7.2 Avaliação das propriedades reológicas dos hidrogeis termossensíveis contendo a suspensão de nanocápsulas

As formas farmacêuticas de aplicação tópica cutânea são geralmente elaboradas como emulsões ou geis devido ao seu potencial tecnológico de controle de viscosidade. Nesse contexto, as características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de formulações semissólidas. Na preparação de hidrogeis poliméricos, o tipo de polímero empregado pode influenciar o comportamento reológico desta e, portanto, pode afetar a estabilidade física do produto, assim como o seu comportamento sobre a pele (liberação do ativo pelo veículo e formação de filme na pele), resultando em diferentes graus de aceitação do mesmo pelo consumidor (TADROS, 2004; GUTERRES et al., 2007).

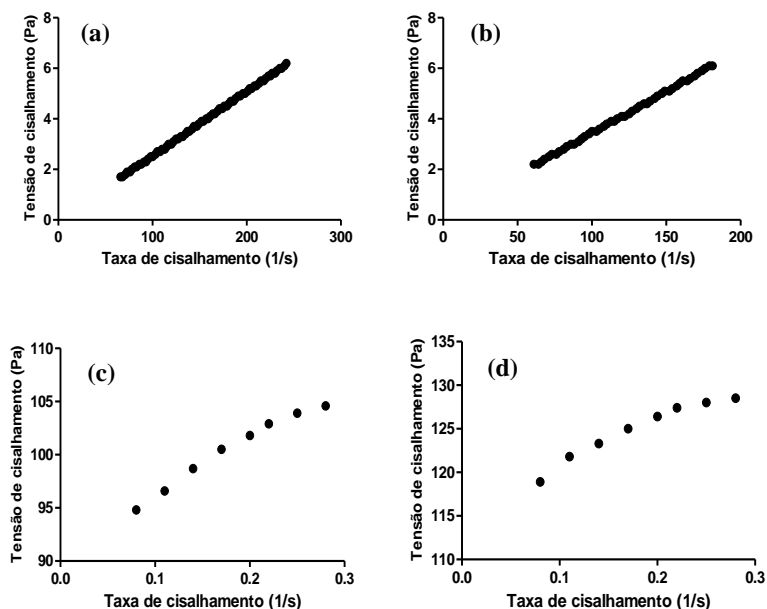
As formulações que possuem partículas assimétricas, a exemplo da maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos, apresentam fluxo não-Newtoniano; ou seja, em que a viscosidade depende da tensão de cisalhamento aplicada, sendo este representado por três tipos principais de perfil de escoamento: plástico, pseudoplástico e dilatante (ANSEL et al., 2000). Nesse estudo avaliou-se a viscosidade dos hidrogeis de poloxamer preparados ou não com a suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> em duas temperaturas diferentes, a fim de verificar essa propriedade da formulação nas temperaturas aproximadas de armazenamento (geladeira) e de aplicação (pele). Os valores de viscosidade e do índice de fluxo dos hidrogeis encontram-se descritos na Tabela 17

**Tabela 17.** Valores de viscosidade e índice de fluxo dos hidrogeis de poloxamer 407 contendo ou não a suspensão de nanocápsulas de PLGA-SE<sub>15</sub> nas temperaturas de 4,0 °C e 35 °C.

Formulação	Viscosidade (mPa ± DP)		Índice de fluxo (n)	
	4,0 °C	35 °C	4,0 °C	35 °C
HG PLGA-SE <sub>15</sub>	33,0 ± 2,35	140186 ± 8,90	0,96	0,07
HG Polax. 16%	22,5 ± 1,77	115581 ± 3,89	1	0,08

Na temperatura de 4,0 °C, ambos os hidrogéis foram caracterizados como fluidos Newtonianos, uma vez que a sua viscosidade manteve-se constante independente da tensão de cisalhamento e do tempo. Porém, quando as formulações foram analisadas a 35 °C, houve uma mudança no comportamento reológico dos hidrogéis, tornando-se não Newtonianos (Figura 19).

**Figura 19.** Comportamento reológico dos hidrogéis de poloxamer preparados com e sem a adição da suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> em diferentes temperaturas. (a) HG branco 4,0 °C; (b) HG com PLGA-SE<sub>15</sub> 4,0 °C; (c) HG branco 35 °C; (d) HG com PLGA-SE<sub>15</sub> 35 °C.



Dentre os modelos matemáticos analisados, a lei das Potências foi a que melhor se adaptou ao perfil reológico dos hidrogéis desenvolvidos na temperatura de 35 °C ( $r^2 = 0,9911$  e  $0,9751$ , para os hidrogéis com e sem a adição da formulação PLGA-SE<sub>15</sub>, respectivamente). Segundo a lei das Potências, o índice de fluxo ou de escoamento caracteriza o desvio de fluidos em relação ao comportamento Newtoniano ( $n = 1$ ). Fluidos pseudoplásticos apresentam um valor de  $n$  abaixo de 1, e os dilatantes acima de 1 (MITCHEL, 2004).

É possível verificar que na análise a 35 °C, os hidrogeis apresentaram um valor de  $n$  muito baixo, o que determina um perfil de escoamento pseudoplástico. Materiais com esse comportamento apresentam suas moléculas em um estado desordenado quando em repouso e, quando submetidos a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada. Para as formulações dermocosméticas, o fluxo pseudoplástico é o mais comum, uma vez que elas têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento (CORRÊA et al., 2005).

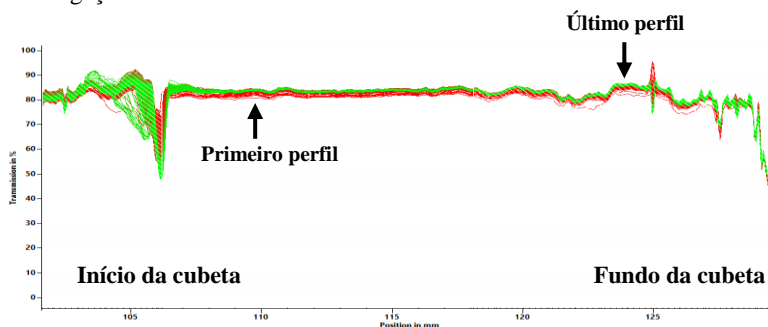
Além disso, também pode-se notar um aumento importante na viscosidade do hidrogel preparado com a suspensão de nanocápsulas nessa mesma temperatura, sugerindo que as nanocápsulas estejam dispersas entre as redes do gel, aumentando a resistência da formulação ao fluxo.

#### 4.8 DEFINIÇÃO DA ESTABILIDADE ACELERADA DAS SUSPENSÕES COLOIDAIIS E HIDROGEIS

A avaliação do comportamento de separação das dispersões é vital durante o processo de desenvolvimento de uma formulação. Neste contexto, diversas técnicas vêm sendo utilizadas para avaliação dos possíveis fenômenos de separação de fases (HOSCHIED et al., 2015). Nesse trabalho utilizou-se a centrifuga analítica LUMiSizer® para avaliação da estabilidade acelerada, uma vez que a mesma permite uma detecção rápida e confiável de fenômenos de instabilidade, como floculação, sedimentação e cremagem. Através da análise de perfis de transmissão de luz é possível determinar a estabilidade da amostra. Formulações estáveis fornecem perfis constantes e uniformes sob a ação de uma força centrífuga, enquanto amostras que apresentam potencial para separação de fases exibem diferentes perfis de transmissão de luz durante o tempo de análise (CADDEO et al., 2013; YUAN et al., 2013).

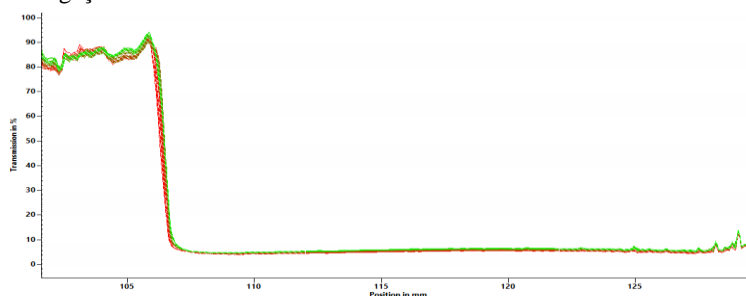
Nesse estudo, primeiramente foi definido a estabilidade das suspensões de nanocápsulas de PLGA contendo as diferentes concentrações de solução extrativa de *H. pluvialis* em temperatura ambiente. Os perfis de transmissão de luz de todas as formulações mostraram-se similares, sem evidências da ocorrência de fenômenos de instabilidade, como sedimentação, floculação ou cremagem, visto que os mesmos mantiveram-se constantes durante todo o período de análise (Figura 20).

**Figura 20.** Representação dos perfis de transmissão de luz das suspensões de nanocápsulas de PLGA contendo carotenoides de *H. pluvialis* sujeitas à centrifugação de 4000 RPM a 25 °C.



Da mesma forma, o hidrogel de poloxamer 407 preparado com a suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> foi analisado, porém, nas temperaturas de 5,0 °C e 25 °C, visando definir a estabilidade da formulação no estado fluido e gel. A formulação em ambas as temperaturas se apresentou estável, representadas por perfis constantes, conforme observado na Figura 21. Em virtude da semelhança de perfil da formulação em ambas as temperaturas analisadas, apenas o perfil de transmissão a 25 °C foi apresentado.

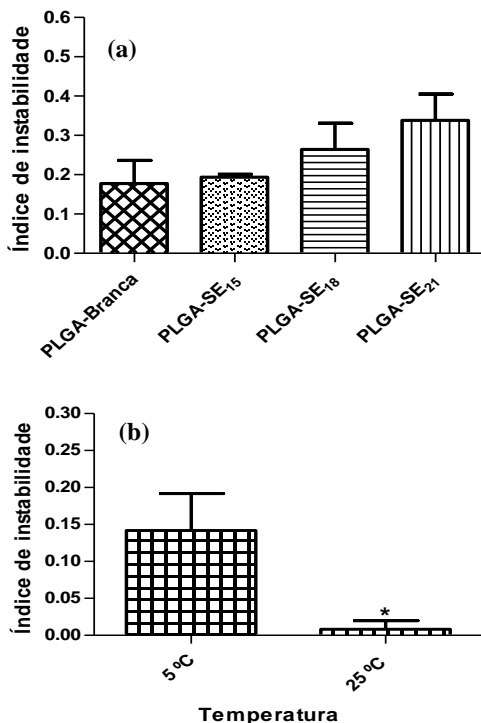
**Figura 21.** Representação dos perfis de transmissão de luz de amostras do hidrogel de poloxamer preparado com a formulação PLGA-SE<sub>15</sub> sujeitas à centrifugação de 4000 RPM a 5° e a 25 °C.



A estabilidade de uma dispersão coloidal também pode ser avaliada pelo valor do índice de instabilidade fornecido nessa análise, em que quanto mais próximo de 1, maior a probabilidade de ocorrer fenômenos de instabilidade. Na Figura 22 estão exibidos os valores dos

índices encontrados para as diferentes suspensões de nanocápsulas contendo carotenoides de *H. pluvialis* a 25 °C e para o hidrogel preparado com a formulação PLGA-SE<sub>15</sub>, em diferentes temperaturas.

**Figura 22.** Índices de instabilidade das diferentes suspensões de nanocápsulas de PLGA contendo carotenoides de *H. pluvialis* a 25 °C (a) e do hidrogel preparado com a formulação PLGA-SE<sub>15</sub> a 5,0 °C e a 25 °C (b).



Como se pode verificar, todas as suspensões de nanocápsulas desenvolvidas com PLGA apresentaram um índice de instabilidade entre 0,15 e 0,35, o que demonstra a estabilidade das formulações frente à separação de fases. Além disso, é possível notar que a formulação contendo 15 mL de solução extrativa da microalga *H. pluvialis* mostrou um índice mais baixo quando comparado às outras formulações, indicando que a adição de uma menor quantidade de solução extrativa à formulação fornece suspensões coloidais mais estáveis.

Na análise do hidrogel de poloxamer 407 contendo as nanocápsulas de PLGA-SE<sub>15</sub>, o índice de instabilidade encontrado na

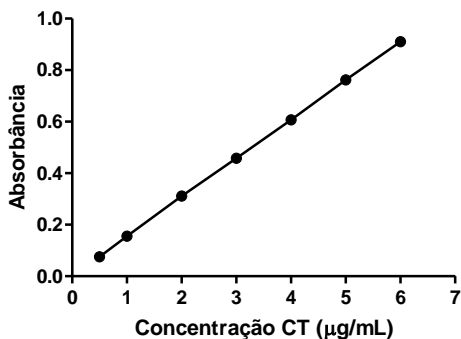
temperatura de 5,0 °C foi significativamente maior que a 25 °C. Este resultado seria esperado, visto que a 25 °C há um aumento da viscosidade devido ao processo de gelificação, o que reduziria a tendência de separação de fases das partículas dispersas.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DOS CAROTENOIDES EXTRAÍDOS DA MICROALGA *H. pluvialis* A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

A liberação de uma substância encapsulada a partir de nanoestruturas poliméricas, assim como a biodegradação do polímero, são fatores importantes para o desenvolvimento de uma formulação bem sucedida. O perfil de liberação é um processo bastante complexo que depende de diversos fatores, como desorção da substância ativa da superfície das partículas, difusão através do polímero, degradação da matriz, cristalinidade do fármaco, afinidade entre o fármaco e a matriz coloidal, entre outros (SOPPIMATH et al., 2001).

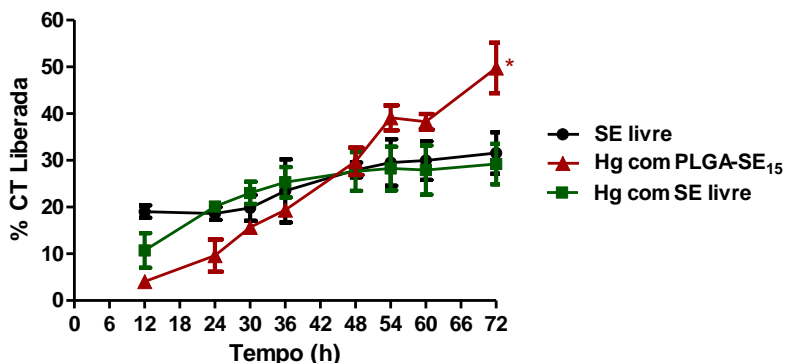
Para determinação do teor de carotenoides totais no meio de liberação constituído de tampão fosfato salino pH 7,4 contendo 0,25% de lauril sulfato de sódio, uma curva de calibração foi obtida a partir da solução extrativa de *H. pluvialis* (Figura 23). A curva de calibração exibiu coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9999 e equação da reta  $y = 0,1515x + 0,0033$ , evidenciando a linearidade do método de análise no intervalo de concentração entre 0,5 e 6,0 µg/mL.

**Figura 23.** Curva de calibração de carotenoides de *H. pluvialis* em tampão fosfato salino pH 7,4 contendo 0,25% de lauril sulfato de sódio (m/V) obtida por espectrofotometria de absorção a 480 nm.



Os perfis de liberação dos carotenoides totais a partir da solução extrativa livre de *H. pluvialis* em acetona e dos hidrogéis contendo a solução extrativa livre em acetona e nanoencapsulada encontram-se na Figura 24.

**Figura 24.** Perfis de liberação dos carotenoides totais a partir da solução extrativa de *H. pluvialis* livre em acetona e dos hidrogéis de poloxamer 407 (Hg) preparados com a solução extrativa livre a nanoencapsulada. \* $p < 0,05$ , ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni.



Conforme observado na Figura 24, após 72 h de ensaio, o percentual de carotenoides totais liberado a partir da solução extrativa e do hidrogel de poloxamer 407 contendo a solução extrativa livre não diferiram significativamente entre si, exibindo um valor de cerca de 30%. No entanto, no mesmo período, o percentual de carotenoides totais liberado a partir do hidrogel de PLGA-SE<sub>15</sub> foi cerca de 50%, diferindo significativamente da solução extrativa e do hidrogel contendo a solução extrativa livre. Em todos os casos, os perfis de liberação foram prolongados, o que pode ser explicado pela elevada hidrofobicidade destes compostos, principalmente dos ésteres de astaxantina. No caso da solução extrativa e do hidrogel contendo a solução extrativa livre, a acetona pode ter rapidamente difundido através da membrana de diálise em direção ao meio de liberação, provocando a precipitação dos compostos no interior do saco de diálise, o que tornou mais lento o processo de difusão dos carotenoides através da membrana de diálise.

A liberação dos carotenoides totais a partir do hidrogel de poloxamer contendo as nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> parece ser um processo mais complexo. Uma vez estando dissolvido no núcleo oleoso



ou adsorvido na superfície das nanocápsulas, os carotenoides podem se difundir mais facilmente através da parede polimérica de PLGA e do hidrogel, atravessar a membrana de diálise e atingir o meio de liberação. Além disso, no período de tempo avaliado, a degradação/erosão parcial do PLGA pode ter ocorrido, contribuindo para a mais rápida liberação dos carotenoides (MAKADIA; SIEGEL, 2011). Por outro lado, após os carotenoides serem liberados das nanocápsulas, essas substâncias entram em contato com micelas de poloxamer 407 do hidrogel, formadas na temperatura de 37 °C. Este copolímero apresenta diversas propriedades, entre elas a de aumentar a solubilidade de fármacos no interior das micelas (DUMORTIER et al., 2006). Assim, essa característica também pode ter afetado a velocidade de liberação dos carotenoides a partir dos hidrogéis contendo as nanocápsulas

O perfil de liberação dos carotenoides a partir da suspensão de nanocápsulas de PLGA-SE<sub>15</sub> não pôde ser obtido, visto que durante as 72 h de experimento a quantidade liberada de carotenoides totais no meio esteve abaixo do limite de quantificação. Devido ao caráter lipofílico dos carotenoides, estas substâncias apresentam elevada afinidade pelo núcleo oleoso, o que é corroborado pelo elevado valor obtido de eficiência de encapsulação. Portanto, o processo de liberação dos carotenoides totais a partir da suspensão de nanocápsulas de PLGA parece ser um processo muito lento, sendo favorecido quando veiculado em hidrogéis de poloxamer.

O perfil de liberação de fármacos a partir de sistemas de liberação imediata e modificada pode ser representado por diversos modelos matemáticos (ZHANG et al., 2010). Dentre os modelos testados, o que melhor se ajustou ao perfil de liberação da solução extrativa de *H. pluvialis* em acetona e do hidrogel de poloxamer 407 contendo a formulação PLGA-SE<sub>15</sub> foi o de ordem zero (Tabela 18). Esse modelo baseia-se na liberação lenta da substância ativa a partir de formas farmacêuticas que não se desagregam. As formas farmacêuticas que seguem esse perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, constituindo-se como uma das melhores formas de veicular fármacos para liberação prolongada. Esse modelo pode ser expresso, de um modo simples, pela seguinte relação:  $Q_t = Q_0 + K_0t$ , sendo  $Q_t$  a quantidade de fármaco liberada no tempo  $t$ ,  $Q_0$  a quantidade inicial de fármaco na solução (na maior parte das vezes,  $Q_0 = 0$ ) e  $K_0$  a constante de liberação de ordem zero. Desse modo, um gráfico da fração liberada do fármaco *versus* tempo será linear, se as condições previamente estabelecidas forem cumpridas (COSTA, 2002). Nesse ensaio, os valores de  $K_0$  encontrados foram de 0,79 e 0,26 para o hidrogel contendo

a formulação PLGA-SE<sub>15</sub> e para solução extrativa de *H. pluvialis* em acetona, respectivamente.

Por outro lado, o perfil de liberação do hidrogel contendo a solução extrativa livre de *H. pluvialis* foi melhor representado pelo modelo Korsmeyer-Peppas. Este modelo é geralmente utilizado para descrever a liberação de fármacos quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: um devido ao transporte de fármaco que obedece às leis de Fick ou transporte Fickiano (difusão), e outro por consequência dos fenômenos de inchamento/relaxamento das cadeias poliméricas do gel (expansão dinâmica) e que envolve a transição de um estado semi-rígido a outro mais flexível, chamado transporte Caso-II. Assim, nesta representação tem-se em conta não só a difusão do fármaco, mas também o relaxamento do gel como processos determinantes na liberação do fármaco (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

**Tabela 18.** Valores de  $r^2$  após aplicação dos modelos matemáticos de liberação de fármacos.

Modelos	SE em acetona	Hg com SE livre	Hg com PLGA-SE <sub>15</sub>
<b>Ordem Zero</b>	0,9215	0,7915	0,9837
<b>Primeira Ordem</b>	0,9205	0,8132	0,9650
<b>Hiagushi</b>	0,8904	0,8426	0,9402
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	0,8812	0,8936	0,9836
<b>Hixson-Crowell</b>	0	0,8066	0,9743

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pele é o órgão mais externo do corpo humano; portanto, está constantemente exposta a diversos fatores externos, entre eles a radiação ultravioleta. A exposição crônica a luz solar é relatada como o principal fator etiológico no desenvolvimento de câncer de pele, também sendo responsável pelo fotoenvelhecimento e diversas reações imunossupressoras (ICHIHASHI et al., 2003). Nesse contexto, a prevenção desses efeitos deletérios através da utilização de terapias fotoprotetoras de uso oral ou tópica cutânea torna-se necessária.

Nesse trabalho, o desenvolvimento de uma formulação dermocosmética inovadora visando à fotoproteção e à quimioprevenção foi proposta, levando em consideração a crescente demanda dos consumidores por compostos naturais que possam atuar na prevenção de diversos tipos de doenças. Os carotenoides, em particular a astaxantina, vêm demonstrando um grande potencial no combate dos danos causados pela radiação UV, evidenciado por inúmeros ensaios *in vitro* e *in vivo* já publicados. Entretanto, a aplicação clínica desses compostos apresenta certas limitações devido à sua elevada instabilidade e baixa solubilidade aquosa. Dessa forma, a nanoencapsulação foi escolhida como estratégia para melhorar as propriedades biofarmacêuticas dos carotenoides, por ser uma metodologia simples e que apresenta muitas vantagens.

A extração dos carotenoides a partir da microalga *Haematococcus pluvialis* permitiu a obtenção de uma solução com alta concentração desses compostos, principalmente de astaxantina e seus ésteres. A preparação de nanocápsulas poliméricas contendo a solução extrativa foi realizada pela técnica da nanoprecipitação após um estudo de formulação. Dentre os resultados obtidos, a concentração de 0,5% do tensoativo hidrofílico polissorbato 80 e a incorporação de 15 mL da solução extrativa de *H. pluvialis* nas formulações levaram à obtenção de suspensões coloidais com características físico-químicas mais adequadas. Igualmente, a melhor estabilidade das suspensões coloidais foi obtida com a utilização do polímero PLGA para a preparação das nanocápsulas.

A formulação selecionada após o estudo de formulação (PLGA-SE<sub>15</sub>) permitiu a formação de partículas esféricas com clara definição da parede polimérica e do núcleo oleoso. Ainda, os teores de astaxantina e de carotenoides totais encontrados nessa suspensão coloidal se mostraram elevados e com uma eficiência de encapsulação maior que 98%, o que indica uma alta afinidade desses compostos hidrofóbicos pela partícula.

Entre os principais problemas associados à aplicação terapêutica de carotenoides, pode-se citar a sua instabilidade frente à temperatura. Nesse trabalho, a formulação PLGA-SE<sub>15</sub> mostrou-se estável quimicamente quando armazenada a 5,0 °C por 30 dias. Todavia, ao ser armazenada a temperatura ambiente, os teores de carotenoides totais e astaxantina foram significativamente reduzidos. Além disso, pôde-se verificar que a adição de vitamina E nas formulações não proporcionou algum tipo de proteção aos carotenoides presentes na solução extrativa. Nesse contexto, foi possível concluir que é de fundamental importância o cuidado no armazenamento das formulações, mantendo-as sempre em baixas temperaturas para garantir a sua integridade química.

Ainda levando em consideração a estabilidade de sistemas nanoparticulados, uma das principais vantagens da nanoencapsulação é a proteção da substância ativa contra processos degradativos através do revestimento polimérico. Devido à grande instabilidade dos carotenoides à luz, sugere-se para estudos posteriores a investigação do potencial protetor da parede de PLGA para esses compostos, após exposição da suspensão à luz por um determinado período de tempo.

A suspensão de nanocápsulas contendo os carotenoides extraídos da microalga *H. pluvialis* foi elaborada e caracterizada visando atividades biológicas específicas para proteção cutânea. Para a verificação do potencial antioxidante, o método do sequestro do radical livre DPPH foi escolhido. Nesse ensaio, foi possível comprovar o elevado poder desses compostos contra o estresse oxidativo, apresentando uma atividade antioxidante cerca de 9 vezes maior do que a encontrada para o controle positivo avaliado. Ainda, é importante ressaltar que estudos mais aprofundados devem ser realizados em relação às possíveis propriedades biológicas da suspensão coloidal desenvolvida, principalmente visando comprovar a sua utilização como um fotoprotetor natural, além de verificar o seu papel quimiopreventivo.

O desenvolvimento de uma formulação farmacêutica bem sucedida também depende amplamente de suas características reológicas. Com o objetivo de fornecer um perfil de aplicação e espalhabilidade mais adequado para a suspensão de nanocápsulas contendo os carotenoides, hidrogeis termossensíveis foram preparados com a adição de poloxamer 407 às suspensões. Ao ser armazenado em uma temperatura de 4,0 °C, a qual representa a temperatura de um local de armazenamento apropriado para os carotenoides; o hidrogel preparado com a formulação PLGA-SE<sub>15</sub> se apresentou como um fluido Newtoniano, indicando que a sua viscosidade permanece constante durante o armazenamento. Já a 35 °C, a qual representa a temperatura

aproximada do local de aplicação, o hidrogel apresentou uma alta viscosidade com um comportamento pseudoplástico; isso demonstra que em contato com a pele, a viscosidade diminui à medida que é feita o espalhamento do produto. Como base nesses resultados, sugere-se que o hidrogel desenvolvido nesse trabalho possui propriedades favoráveis para aplicação em *spray*, assim como características adequadas em termos de espalhabilidade cutânea.

A liberação de um fármaco a partir de uma forma farmacêutica é uma etapa essencial a ser estudada no desenvolvimento de uma nova formulação. O perfil de liberação fornece informações referentes à quantidade de substância ativa que de fato irá exercer a ação terapêutica pretendida. O hidrogel desenvolvido com a suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> apresentou um perfil de liberação de carotenoides totais controlado, representado pelo modelo cinético de ordem zero. Essa formulação obteve aproximadamente 50% dos carotenoides liberados ao final das 72 horas de experimento, exibindo uma diferença significativa em relação à solução extrativa livre em acetona e o hidrogel preparado com a solução extrativa livre. Esse maior percentual encontrado na formulação contendo as nanocápsulas pode estar relacionado com a incorporação do copolímero poloxamer 407, o qual possivelmente atuou como um promotor de liberação dos carotenoides, ao servir de veículo para suspensão de nanocápsulas devido ao seu potencial de aumentar a solubilidade de moléculas com caráter lipofílico.

Apesar de os ensaios de liberação apresentarem resultados promissores para obtenção de uma formulação dermocosmética, modificações na composição da mesma ainda podem ser realizadas com o intuito de adequar o seu perfil de liberação. Estudos posteriores devem visar o alcance de um maior percentual de carotenoides totais liberados em um menor período de tempo, porém, mantendo o sistema com um perfil controlado.



## 6 CONCLUSÕES

- O método de extração empregado permitiu a obtenção de soluções extrativas da *Haematococcus pluvialis* com eficiência, apresentando uma alta concentração de carotenoides totais e de astaxantina.
- O método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido com sucesso e provou ser linear, exato, preciso e robusto para quantificação da astaxantina livre em todas as etapas do trabalho.
- Os ésteres de astaxantina foram hidrolisados após um período de 3 a 4 h de reação de saponificação, com uma taxa de degradação de astaxantina de aproximadamente 10% após a terceira hora. Apesar deste percentual de degradação, o teor de astaxantina total pôde ser determinado na solução extrativa e nas diferentes formulações.
- A preparação de suspensões de nanocápsulas poliméricas pelo método da nanoprecipitação demonstrou-se viável e de simples execução, garantindo a obtenção de uma formulação estável com características físico-químicas adequadas.
- A eficiência de encapsulação da astaxantina nas nanocápsulas foi elevada (acima de 98%), evidenciando a grande afinidade destas substâncias hidrofóbicas pela partícula.
- A solução extrativa livre e nanoencapsulada apresentaram uma alta atividade antioxidante pelo método do DPPH, confirmando o seu potencial biológico na prevenção do estresse oxidativo.
- A formulação PLGA-SE<sub>15</sub> mostrou-se estável quimicamente quando armazenada a 5,0 °C por 30 dias. Entretanto, ao ser armazenada a temperatura ambiente, os teores de carotenoides totais e astaxantina foram significativamente reduzidos. Ainda, pôde-se verificar que a adição de vitamina E nas formulações não proporcionou algum tipo de proteção aos carotenoides presentes na solução extrativa.

- Os hidrogeis termossensíveis de poloxamer 407 preparados com suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> apresentaram-se como um fluido Newtoniano quando expostos a temperatura de armazenamento (4,0 °C). Já a 35 °C, os hidrogeis apresentaram uma alta viscosidade com um comportamento pseudoplástico, o que demonstra um perfil interessante dessa formulação em relação às propriedades de aplicação e espalhabilidade.
- As suspensões de nanocápsulas e o hidrogel desenvolvido exibiram um perfil de transmissão de luz uniforme e plano, demonstrando a estabilidade das formulações. Os índices de instabilidade corroboraram com o perfil encontrado e evidenciaram a alta estabilidade do hidrogel contendo as nanocápsulas frente à separação de fases.
- O hidrogel desenvolvido com a suspensão de nanocápsulas PLGA-SE<sub>15</sub> apresentou um perfil de liberação de carotenoides totais controlado, representado pelo modelo cinético de ordem zero. O percentual liberado foi significativamente maior para essa formulação quando comparado à solução extrativa livre em acetona e o hidrogel preparado com a solução extrativa livre.
- Face aos resultados apresentados, a formulação nanoencapsulada contendo carotenoides da microalga *Haematococcus pluvialis* desenvolvida e caracterizada nesse trabalho, juntamente com o hidrogel preparado com essa formulação, mostrou ser uma estratégia promissora para obtenção de um produto de uso tópico cutâneo, visando às atividades fotoprotetora e a quimiopreventiva. Entretanto, estudos ainda podem ser realizados com o intuito de adequar a estabilidade e o perfil de liberação dos carotenoides a partir das formulações.



## 7 REFERÊNCIAS

ABLA; M. J.; SINGH, N. D.; BANGA, A. K. Role of Nanotechnology in Skin Delivery of Drugs. In: DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous Penetration Enhancers- Chemical Methods in Penetration Enhancement Nanocarriers**. Heidelberg: Springer, 2016, cap 1.

AFFANDI, M. M. M.; JULIANTO, T.; MAJEED, A. Development and stability evaluation of astaxanthin nanoemulsion. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, n. 1, p. 142-148, 2011.

AGRAWAL, C. M.; HUANG, D.; SCHMITZ, J. P.; ATHANASIOU, K. A. Elevated Temperature Degradation of a 50:50 Copolymer of PLA-PGA. **Tissue Engineering**, v. 3, n. 4, p. 345-354, 1997.

AMBATI, R. R.; PHANG, S. M.; RAVI, S.; ASWATHANARAYANA, R. G. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications -A Review. **Marine Drugs**, v. 12, p. 128-152, 2014.

ANARJAN, N.; NEHDI AND, A. I.; TAN, C. P. Influence of astaxanthin, emulsifier and organic phase concentration on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. **Chemistry Central Journal**, v.7, 2013.

ANARJAN, N.; TAN, C. P.; NEHDI, I. A.; LING, T. C. Colloidal astaxanthin: Preparation, characterization and bioavailability evaluation. **Food Chemistry**, v. 135, p.1303–1309, 2012.

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. J. **Farmacotécnica - Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, p. 281-316, 2000.

ASTETE, C. E.; SABLIOV, C. M. Synthesis and Characterization of PLGA Nanoparticles. **Journal of Biomaterial Science- Polymer Edition**, v. 17, n. 3, p. 247–289, 2006.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 872p., 2005.

BARONI, A.; BUOMMINO, E.; DE GREGORIO, V.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V.; WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, p. 257–262, 2012.

BENDICH, A.; OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. **The FASEB Journal**, v.3, p. 1927-1932, 1989.

BENSON, H. A. Structure, function and permeation. In: BENSON, H. A.; WATKINSON, A. C. **Topical and transdermal drug delivery: Principles and practice**. New Jersey: John Wiley & Son Inc., 2012. Pg. 18-33.

BHUVANESWARI, S.; ARUNKUMAR, E.; VISWANATHAN, P.; ANURADHA, C. V. Astaxanthin restricts weight gain, promotes insulin sensitivity and curtails fatty liver disease in mice fed a obesity-promoting diet. **Process Biochemistry**, v.45, p.1406–1414, 2010.

BLOUZA, I. L.; CHARCOSSET, C; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 124–131, 2006.

BOLZINGER, M. A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 156–165, 2007.

BOUSSIBA, S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 108, p. 111–117, 2000.

BOUWSTRA, J. A. The skin barrier, a well-organized membrane. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123 124, p. 403-413, 1997.

BRASIL. **Resolução RE 899 determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2003.

BRITTON, G. Structure and Properties of Carotenoids in Relation to Function. **The FASEB Journal**, v.9, p. 1551-1558, 1995.

BUCKS, D. A. W. Skin structure and metabolism: relevance to the design of cutaneous therapeutics. **Pharmaceutical Research**, p. 148-152.

BUWALDA, S. J.; BOERE, K. W. M.; DIJKSTRA, P. J.; FEIJEN, J.; VERMONDEN, T.; HENNINK, W. E. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 254-273, 2014.

CADDEO, C.; MANCONI, M.; FADDA, A. M.; LAI, F.; LAMPIS, S.; DIEZ-SALES, O.; SINICO, C. Nanocarriers for antioxidant resveratrol: Formulation approach, vesicle self-assembly and stability evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 327-332, 2013.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, n.5, p.531-536, 1996.

CAMERA, E.; MASTROFRANCESCO, A.; FABBRI, C.; DAUBRAWA F.; PICARDO, M.; SIES, H.; STAHL, W. Astaxanthin, canthaxanthin and b-carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress-responsive enzymes. **Experimental Dermatology**, n. 18, p. 222-231, 2008.

CAPELLI, B.; BAGCHI, D.; CYSEWSKI, G. R. Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. **Nutrafoods**, v. 12, p. 145-152, 2013.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, F. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.146, p. 60-78, 2007.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos

cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, v. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHEN, L.; HU, J. A.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review, **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1013-1024, 2012.

CHO, E. J.; HOLBACK, H.; LIU, K. C.; ABOUELMAGD, S. A.; PARK, J.; YEO, Y. Nanoparticles characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular Pharmaceutics**, p. 1-50, 2013.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; H, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, n. 6, p. 1161-1168, 2002.

CHOI, Y. Y.; HONG; M. E.; SIM, S. J. Enhanced Astaxanthin Extraction Efficiency from *Haematococcus pluvialis* via the Cyst Germination in Outdoor Culture Systems. **Process Biochemistry**, v.50, p.2275–2280, 2015.

COOPERSTONE, J. L.; SCHWARTZ, S. J. Recent insights into health benefits of carotenoids. In: CARLE, R.; SCHWEIGGERT, R. **Hand Book on Natural Pigments in Food and Beverages**. Ohio: Woodhead Publishing, 2016. Pg. 473-497.

COROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CORRÊA, N. M., CAMARGO JUNIOR, F. B., IGNÁCIO, R. F., LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.73-78, 2005.

COSTA, P. J. C. Avaliação in vitro da lioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 141-153, 2002.

D'MELLO, S.R.; DAS, S. K.; DAS, N. G. Polymeric Nanoparticles for Small-Molecule Drugs: Biodegradation of Polymers and Fabrication of Nanoparticles. In: PATHAK, Y.; THASSU, D. **Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization**. New York: Informa Healthcare, 2009, cap. 2.

DARVIN, M. E.; FLUHR, J. W.; SCHANZER, S.; RICHTER, H.; PATZELT, A.; MEINKE, M. C.; ZASTROW, L.; GOLZ, K.; DOUCET, O.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Dermal carotenoid level and kinetics after topical and systemic administration of antioxidants: Enrichment strategies in a controlled in vivo study. **Journal of Dermatological Science**, v. 64, p. 53–58, 2011.

DE ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNANDEZ, C.; SOUZA SOARES, L. A. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 2, pg. 99-109, 2012.

DE JONG, W. H.; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133-149, 2008.

DE MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; DE MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-15, 2015.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. **Science**, v. 298, p. 2149-2153, 2002.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, Produtos e Aplicações. **Ciência Rural Santa Maria**, v.36, n.6, p.1959-1967, 2006.

DONG, S.; HUANG, Y.; ZHANG, R.; WANG, S.; LIU, Y. Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

DRAGOȘ, N.; BERCEA, V.; BICA, A.; DRUGĂ, B.; NICOARĂ, A. Astaxanthin production from a new strain of *Haematococcus pluvialis* grown in batch culture. **Annals of RSCB**, v. 15, n. 2, p. 353-361, 2010.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, 2002.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709- 2728, 2006.

ESTEBAN, R.; MORAN, J. F., BECERRIL, J. M.; GARCÍA-PLAZAOLA, J. I. Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. **Environmental and Experimental Botany**, 2015.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Summary of Color Additives for Use in the United States in Foods, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices**, 2015.

FELTL, L.; PACÁKOVÁ, V.; TULÍKA, K. S.; VOLKA, K. Reliability of Carotenoid Analyses: A Review. **Current Analytical Chemistry**, v.1, p 93-102, 2005.

FERREIRA, M. M.; ZAMITH, H. P. S.; ABRANTES, S. M. P. Astaxantina: seu uso como corante natural alimentício. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 73, n. 1, p. 1-8, 2014.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmacy**, n. 55, R1–R4, 1989.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 3, n. 12, 2000.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558-66, 2004.

GENTILE, P.; CHIONO, V.; CARMAGNOLA, I.; HATTON, P. V. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. **Internacional Journal of Molecular Science**, v.15, p. 3640-3659, 2015.

GHIGGI, V. Estudo do Crescimento e Indução da Produção do Pigmento Astaxantina por *Haematococcus pluvialis*. 2007. 119p. **Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos)** – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GODIC, A.; POLJŠAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

GOTO, S.; KOGURE, K.; ABE, K.; KIMATA, Y.; KITAHAMA, K.; YAMASHITA, E.; TERADA, H. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1512, p. 251-258, 2001.

GOYAL, R.; MACRI, L. K.; KAPLAN, H. M.; KOHN, J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 77-92, 2016.

GRAF, R.; COUVREUR, P. Nanocapsules: Preparation, characterization and therapeutic applications. In: TORCHILIN, V. P. **Nanoparticulates as drug carriers**. London: Imperial College Press, 2006. P. 255-276.

GREWE, C. B.; GRIEHL, C. The carotenoid astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. In: POSTEN, C.; WALTER, C. **Microalgal Biotechnology: Integration and Economy**. Berlin: De Gruyter GmbH, 2012. P. 129-144.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G., COLEPICCOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

GUEDES, A.C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as Sources of Carotenoids. **Marine Drugs**, v.9, p. 625-644, 2011.

GUERIN, M; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends in Biotechnology**, v, 1, n.5, p. 210-216, 2003.

GUIRY, M. D. AlgaeBase, 2016. Disponível em: <<http://www.algarbase.org>>. Acesso em: 17 de dez. 2016.

GUJJAR, M.; BANGA, A. K. Vehicle influence on permeation through intact and compromised skin. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 472, p. 362-368, 2014.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 12, 1995.

HADGRAFT, J. Skin Deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 291-299, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The Antioxidants of Human Extracellular Fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 280, n. 1, p. 1-8, 1990.

HAMA, S.; TAKAHASHI, K.; INAI, Y.; SHIOTA, K.; SAKAMOTO, R.; YAMADA, A.; TSUCHIYA, H.; KANAMURA, K.; YAMASHITA, E.; KOGURE, K. Protective Effects of Topical Application of a Poorly Soluble Antioxidant Astaxanthin Liposomal Formulation on Ultraviolet-Induced Skin Damage. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 8, 2012.

HAQUE, F., DUTTA, A.; THIMMANAGARI, M.; CHIANG, Y. W. Intensified Green Production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, p. 1-11, 2016.

HAQUE, T.; RAHMAN, K. M.; THURSTON, D. E.; HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis.



**European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.77, p. 279–289, 2015.

HERRERO, C.; OROSA, M.; ABALDE, J.; RIOBOO, C.; CID, A. Astaxanthin Production in Cysts and Vegetative Cells of the Microalga *Haematococcus pluvialis* Flotow. In: JOHNSEN, M. N. **Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy**. New York: Nova Science Publishers, 2012, Pg. 359-371.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FÉLIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 2, p. 185-196, 2006.

HIX, L. M.; FREY, D. A.; MCLAWS, M. D.; OSTERLIE, M.; LOCKWOOD, S. F.; BERTRAM, J. S. Inhibition of chemically-induced neoplastic transformation by a novel tetrasodium diphosphate astaxanthin derivative. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 1634-1641, 2005.

HOSCHEID, J.; OUTUKI, P. M.; KLEINUBING, S. A.; SILVA, M. F.; BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C. Development and characterization of Pterodon pubescens oil nanoemulsions as a possible delivery system for the treatment of rheumatoid arthritis. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 484, p. 19-27, 2015.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2B (R1), 2005.

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, p. 21-39, 2003.

ITTAH, Y.; KANNER, J.; GRANIT, R. Hydrolysis Study of Carotenoid Pigments of Paprika (*Capsicum annum L.* Variety Lehava) by HPLC/Photodiode Array Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p. 899-901, 1993.

JAIME, L.; RODRIGUEZ-MEIZOSO, I.; CIFUENTES, A.; SANTOYO, S.; SUAREZ, S.; BÁNEZ, E.; SENORANS, F. J. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids'

extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae, **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 105–112, 2010.

JI, X.; PENG, D.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; WANG, Y.; GAO, Y.; LU, N.; TANG, P. Astaxanthin improves cognitive performance in mice following mild traumatic brain injury. **Brain Research**, v, 1659, p. 88-95, 2016.

JIANG, X.; CHEN, L.; SHEN, L.; CHEN, Z.; XU, L.; ZHANG, J.; YU, X. Trans-astaxanthin attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and depressive-like behavior in mice. **Brain Research**, v.1649, p. 30-37, 2016.

JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from Microbial Sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, n.4, p. 297-326, 1991.

JOO, H. H.; LEE, H. Y.; GUAN, Y. S.; KIM, J. C. Colloidal Stability and *in vitro* Permeation Study of Poly(E-Caprolactone) Nanocapsules Containing Hinokitiol. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.14, p. 608–613, 2008.

KAMATH, B. S.; SRIKANTA, B. M.; DHARMESH, S. M.; SARADA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 590, p. 387–395, 2008.

KAUR, I. P.; KAPILA, M.; AGRAWAL, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. **Ageing Research Reviews**, v. 6, p. 271–288, 2007.

KIDD, P. Astaxanthin, Cell Membrane Nutrient with Diverse Clinical Benefits and Anti-Aging Potential. **Alternative Medicine Review**, v. 16, n. 4, p. 355-364, 2011.

KIELHORN, J.; MANGELSDORF, I. Skin structure and function. In: KIELHORN, J.; MANGELSDORF, I. **Dermal absorption**. Geneva: World Health Organization Press, 2006. Pg. 10-22.

KIM, D. Y.; VIJAYAN, D.; PRAVEENKUMAR, R.; HAN, J. I.; LEE, K.; PARK, J. Y.; CHANG, W. S.; LEE, J. S.; OH, Y. K. Cell-Wall

- Disruption and Lipid/Astaxanthin Extraction from Microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. **Bioresource Technology**, 2015.
- KITTIKAIWAN, P.; POWTHONGSOOK, S.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, P. Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement. **Carbohydrate Polymers**, v.70, p. 378–385, 2007.
- KRINSKY, N. I.; YEUM, K. J. Carotenoid–radical interactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 754-760, 2003.
- LAMBERTSEN, G.; BRAEKKAN, O. R. Method of Analysis of Astaxanthin and its Occurrence in Some Marine Products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 22, 1971.
- LANG, N. J. Electron microscopic studies of extraplastidic astaxanthin in *Haematococcus*. **Journal of Phycology**, v. 4, p. 12–19, 1968.
- LASSALE, V.; FERREIRA, M. L. PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. **Macromolecular Science**, v. 7, p. 767-783, 2007.
- LEE, Y. K.; ZHANG, D. H. Production of astaxanthin by *Haematococcus*. In: COHEN, Z. **Chemicals from microalgae**. London: Taylor & Francis, 1999. P. 173-190.
- LIAO, K. S.; WEI, C. L.; CHEN, J. C.; ZHENG, H. Y.; CHEN, W. C.; WU, C. H.; WANG, T. J.; PENG, Y. S.; CHANG, P. Y.; LIN, Y. W. Astaxanthin enhances pemetrexed-induced cytotoxicity by downregulation of thymidylate synthase expression in human lung cancer cells. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 353-361, 2016.
- LIN, K. H.; LIN, K. C.; LU, W. J.; THOMAS, P. A.; JAYAKUMAR, T.; SHEU, J. R. Astaxanthin, a Carotenoid, Stimulates Immune Responses by Enhancing IFN- and IL-2 Secretion in Primary Cultured Lymphocytes *in vitro* and *ex vivo*. **International Journal of Molecular Science**, v. 17, n. 44, p. 1-10, 2016.

LIU, X.; KRUGER, P.; MAIBACH, H.; COLDITZ, P. B.; ROBERTS, M. S. Using skin for drug delivery and diagnosis in the critically ill. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 77, p. 40-49, 2014.

LOBO, V.; PATIL, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LOCKWOON, S. F.; GROSS, G. J. Disodium Disuccinate Astaxanthin (Cardax™): Antioxidant and Antiinflammatory Cardioprotection. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 23, n. 3, p. 199–216, 2005.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 1-12, 2005.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial Potential for *Haematococcus* Microalgae as a Natural Source of Astaxanthin. **Tibtech**, v. 18, p. 160-167, 2000.

LU, Y. P.; LIU, S. Y.; SUN, H.; WUA, X. M.; LIA, J. J.; ZHUA, L. Neuroprotective effect of astaxanthin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity *in vitro* and on focal cerebral ischemia *in vivo*. **Brain Research**, v. 1360, p. 40-48, 2010.

LUSCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 34, p. 203-222, 2008.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, p.1377-1397, 2011.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-51, 2002.

MASUMA, R.; KASHIMA, S.; KURASAKI, M.; OKUNO, T. Effects of UV wavelength on cell damages caused by UV irradiation in PC12 cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 125, p. 202–208, 2013.

MATHEWS—ROTH, M. M. Carotenoids and Cancer Prevention — Experimental and Epidemiological Studies. **Pure & Applied Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 717-722, 1985.

MAZZARINO, L. Sistemas Nanoestruturados Decorados com Quitosana para Liberação Bucal da Curcumina. 2013. 277p. **Tese (Programa de Pós-Graduação em Farmácia)** – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MCNULTY, H. P.; BYUN, J.; LOCKWOOD, S. F.; JACOB, R. F.; MASON, R. P. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 167–174, 2007.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F.J. Relationship Between the Colour and the Chemical Structure of Carotenoid Pigments. **Food Chemistry**, v. 101, p.1145–1150, 2007.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Estabilidad de los Pigmentos Carotenoides en los Alimentos. **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, v. 54, n. 2, 2004.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 3-17, 2002.

MEZZOMO, N.; MAESTRI, B.; DOS SANTOS, R. L.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, v.85, n.3, p.1383-1391, 2011.

MIAO, F.; LU, D.; LI, Y.; ZENG, M. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 352, p.176–181, 2006.

MILADI, K.; SFAR, S.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Nanoprecipitation process: From particle preparation to *in vivo* application. In: VAUTHIER, C.; PONCHEL, G. **Polymer nanoparticles for nanomedicine: A guide for design, preparation and development**. Cham: Springer, 2016. P. 17-54.

MITCHEL, B. S. **An Introduction to Materials Engineering and Science for Chemical and Materials Engineers**. 1<sup>a</sup> ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 976p., 2004.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONROY-RUIZ, J.; SEVILLA, M. A.; CARRON, R.; MONTERO, J. M. Astaxanthin-enriched-diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats. **Pharmacology Research**, v. 63, n. 1, p. 44-50, 2011.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n.5, 2000.

MOSQUERA, M. I. M.; GÁLVEZ, A. P. Study of Lability and Kinetics of the Main Carotenoid Pigments of Red Pepper in the De-esterification Reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p. 566-569, 1998.

MOSS, G. P.; GULLICK, D. R.; WILKINSON, S. C. Skin structure and physiology. In: MOSS, G. P.; GULLICK, D. R.; WILKINSON, S. C. **Predictive methods in percutaneous absorption**. Berlin: Springer, 2015. P. 1-24

NAGARAJ, S.; RAJARAM, M.G.; ARULMURUGAN, P.; BASKARABOOPATHY, A.; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN,

- K. R.; SUNDARARAJ, R.; RENGASAMY, R. Antiproliferative potential of astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* Flotow on human hepatic cancer (HepG2) cell line. **Biomedicine & preventive nutrition**, v. 2, n. 3, p.149-222, 2012.
- NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p. 1150-1154, 2000.
- NOBRE, B.; MARCELO, F.; PASSOS, R.; BEIRÃO, L.; PALAVRA, A.; GOUVEIA, L.; MENDES, R. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 787-790, 2006.
- OKADA, Y.; ISHIKURA, M; MAOKA, T. Bioavailability of astaxanthin in *Haematococcus* algal extract: the effects of timing of diet and smoking habits. **Bioscience. Biotechnology. Biochemistry.**, v.73, n. 9, p.1928-1932, 2009.
- OLAIZOLA, M. The production and health benefits of astaxanthin. In: BARROW, C.; SHAHIDI, F. *Marine Nutraceuticals and Functions Foods*. Londres: CRC Press, 2007. P. 322-366.
- OLAIZOLA, M.; HUNTLEY, M. E. Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. **Biomaterials and Bioprocessing**, v. 9, p. 143-164, 2003.
- PANWAR, P.; PANDLEY, B.; LAKHERA, P. C.; SINGH, K. P. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 101-108, 2010.
- PENG, C. H.; CHANG, C. H.; PENG, R. Y.; CHYAU, C. C. Improved membrane transport of astaxanthin by liposomal encapsulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.75, p. 154-161, 2010.
- PEREIRA, G. G.; DIMER, F. A.; GUTERRES, S. S.; KECHINSKI, C. P.; GRANADA, J. A.; CARDOZO, N. S. M. Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing

polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1121-1125, 2013.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 2, p.89-96, 2008.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.48, n. 1, p. 1-19 2003.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

POHLMANN, A. R.; DETONI, C.B.; PAESE, K.; CORADINI, K.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Polymeric Nanocapsules for Topical Delivery. In: DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous Penetration Enhancers- Chemical Methods in Penetration Enhancement Nanocarriers**. Heidelberg: Sprieger, 2016, cap. 13.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. E. Mechanisms of Free Radical Oxidation of Unsaturated Lipids. **Lipids**, v.30, n. 4, p. 277-290, 1995.

QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Physical and Chemical Stability of B-Carotene-Enriched Nanoemulsions: Influence of pH, Ionic Strength, Temperature, and Emulsifier Type. **Food Chemistry**, v. 132, p.1221-1229, 2012.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocápsulas from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 7, p. 1056-1062, 1998.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang and Dale Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RAO, A. R.; SINDHUJA, H. N.; DHARMESH, S. M.; SANKAR, K. U.; SARADA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Effective Inhibition of Skin



Cancer, Tyrosinase, and Antioxidative Properties by Astaxanthin and Astaxanthin Esters from the Green Alga *Haematococcus pluvialis*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p. 3842-3851, 2013.

RAO, R.; SARADA, A. R.; BASKARAN, V.; RAVISHANKAR, G. A. Identification of carotenoids from green alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC-MS (APCI) and their antioxidant properties. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 11, p. 1333-1341, 2009.

RÉGNIER, P.; BASTIAS, J.; RODRIGUEZ-RUIZ, V.; CABALLERO-CASERO, N.; CABALLO, C.; SICILIA, D.; FUENTES, A.; MAIRE, M.; CREPIN, M.; LETOURNEUR, D.; GUEGUEN, V.; RUBIO, S.; PAVON-DJAVID, G. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Prevents Oxidative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity. **Marine Drugs**, v.13, p. 2857-2874, 2015.

RENSTROM, B.; BORCH, G.; SKULBERG, O. M.; LIAAEN-JENSEN, S. Optical purity of (3S)-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 11, p. 2561-2564, 1981.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICARDO, P. M. N. Quantificação de astaxantina e  $\alpha$ -tocoferol em lagostim *Procambarus clarkii* e seus subprodutos por UHPLC-DAD e determinação da sua actividade antioxidante. 2013. 138p. **Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar)** – Universidade de Coimbra, Portugal.

ROBERTS, M. S.; MOHAMMED, Y.; PASTORE, M. N.; NAMJOSHI, S.; YOUSEF, S.; ALINAGHI, A.; HARIDASS, I. N.; ABD, E.; LEITE-SILVA, V. R.; BENSON, H. A. E; GRICE, J. E. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, v. 247, p. 86–105, 2017.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A Guide to Carotenoid Analysis in Food. 1<sup>a</sup> ed. Washington: ILSI Press, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoides y Preparación de Alimentos: La Retención de los Carotenoides Provitamina A en Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados**. 1ª ed. São Paulo: John Snow, Inc, 1997.

ROWE, R. C.; SHESKY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6ª ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

SAHA, S. K.; MCHUGH, E.; HAYES, J.; MOANE, S.; WALSH, D.; MURRAY, P. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 128, p.118–124, 2013.

SANTIS, A. K. De. Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica. 2008. 157p. **Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmácia)** – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SANTOCONO, M.; ZURRIA, M.; BERRETTINI, M.; FEDELI, D.; FALCIONI, G. Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 85, p.205–215, 2006.

SANTOS, A. C. Estudo ecofisiológico de *Haematococcus pluvialis*. 2015. 129p. **Tese (Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais)** – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

SANTOS, G. S.; PEREIRA, G. G.; BENDER, E. A.; COLOMÉ, L. M.; GUTERRES, S. S. Desenvolvimento e caracterização e nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1388-1394, 2012.

SANTOS, M. F.; MESQUITA, J. F. Ultrastructural Study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis. **Cytologia**, v. 49, p. 215-228, 1984.

SARADA, R.; VIDHYAVATHI, R.; USHA, D.; RAVISHANKAR, G. A. An Efficient Method for Extraction of Astaxanthin from Green Alga

*Haematococcus pluvialis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 7585-7588, 2006.

SARADA, R; TRIPATHI, S.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 623–627, 2002.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 427–443, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R; GUTERRES, S. S.; FREITA, L. L.; POHLMANN, A R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p. 726- 737, 2003.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding: the differences and similarities between validation requirements of the US food and drug administration, the US pharmacopeia and the international conference on harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p.57–66, 2003.

SHAH, M. R.; LIANG, Y.; CHENG, J. J.; DAROCH, M. Astaxanthin Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 532, 2016.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, p. 31-38, 1991.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82, p. 291-295, 1997.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.3, p.125-131, 2010.

- SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N. Potential applications of antioxidants - A review. **Journal of Pharmacy Research**, v.7, p. 828-835, 2013.
- SOCACIU, C.; LAUSCH, C.; DIEHL, H. A. Carotenoids in DPPC Vesicles: Membrane Dynamics. **Spectrochimica Acta Part A**, v.55, p. 2289 – 2197, 1999.
- SOEHNGE, H.; OUHTIT, A.; ANANTHASWAMY, H. N. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. **Frontier in Bioscience**, v. 2, p. 538-551, 1997.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.
- STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 345–351, 2003.
- STEENVOORDEN, D. P. T.; HENEGOUWEN, G. M. J. B. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 41, p. 1-10, 1997.
- SUGANUMA, S.; NAKAJIMA, H.; OHTSUKI, M.; IMOKAWA, G. Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrixmetalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v. 58, p. 136–142, 2010.
- SZE, A.; ERICKSON, D.; REN, L.; LI, D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 26, p. 402–410, 2003.
- TACHAPRUTINUN, A.; UDOMSUP, T.; LUADTHONG, C.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.374, p. 119–124, 2009.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108 –109, p. 227–258, 2004.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 26, p. 366-374, 2014.

TANAKA, T.; MAKITA, H.; OHNISHI, M.; MORI, H.; SATOH, K.; HARA, H. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. **Cancer Research**, v. 18, p. 4059-4064, 1995.

TEMPLE, N. J. Antioxidants and disease: more questions than answers. **Nutrition Research**, v. 20, n. 3, p. 449-459, 2000.

TROMMER, H.; NEUBERT, R.H.H. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. **Skin Pharmacology Physiology**, v.19, p.106–121, 2006.

TRUSCOTT, T. G. The photophysics and photochemistry of the carotenoids. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v.6 p. 359-371, 1990.

UENOJO, M., JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Biotransformação para Formação de Compostos de Aroma. **Química Nova**, v. 30, n.3, p. 616-622, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, n, 39, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p.1-40, 2006.

VARELA, J. C.; PEREIRA, H.; VILA, M.; LEON, R. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynthesis Research**, p. 1-15, 2015.

VECCHI, M.; MULLER, R. K. Separation of (S, 3's) -, (3R, 3'R) -and (3S, 3'R) -Astaxanthin via (-) - Camphanic Acid Esters. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 10083, p. 195-196, 1979.

VENUGANTI, V. V.; PARUMAL, O. P. Nanosystems for Dermal and Transdermal Drug Delivery. In: PATHAK, Y.; THASSAU, D. **Drug Delivery Particles Formulations and Characterization**. New York: Informa Health Care, 2009, cap 9.

VERSCHOOTEN, L.; DECLERCQ, L.; GARMYN, M. Adaptive response of the skin to UVB damage: role of the p53 protein. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, p. 1-7, 2006.

VOGT, A.; WISCHKE, C.; NEFFE, A. T.; MA, N.; ALEXIEV, U.; LENDLEIN, A. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin — Do existing technologies match clinical challenges?. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 3-15, 2016.

WAN, M.; HOU, D.; LI, Y.; FAN, J.; HUANG, J.; LIANG, S.; WANG, W.; PAN, R.; WANG, J.; LI, S. The effective photoinduction of *Haematococcus pluvialis* for accumulating astaxanthin with attached cultivation. **Bioresource Technology**, v.163, p. 26-32, 2014.

WANG, C.; ARMSTRONG, D. W.; CHANG, C-D. Rapid baseline separation of enantiomers and a mesoform of all-trans-astaxanthin, 13-cis-astaxanthin, adonirubin, and adonixanthin in standards and commercial supplements. **Journal of Chromatography A**, v. 1194, p. 172-177, 2008.

WANG, Q.; ZHAO, Y.; GUAN, L.; ZHANG, Y.; DANG, Q.; DONG, P.; LI, J.; LIANG, X. Preparation of astaxanthin-loaded DNA/chitosan nanoparticles for improved cellular uptake and antioxidation capability. **Food Chemistry**, 2017.

WEN, X.; HUANG, A.; HU, J.; ZHONG, Z.; LIU, Y.; LI, Z.; PAN, X.; LIU, Z. Neuroprotective effect of astaxanthin against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells: Involvement of the Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. **Neuroscience**, v. 303, p. 558-568, 2015.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control**, v. 34, p. 98-110, 2006.

WIKI, W. Biological Functions and Activities of Animal Carotenoids. **Pure & Applied Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 141-146, 1991.

WOJCIK, M.; BURZYNSKA-PEDZIWIATR, I.; WOZNIAK, L. A. A Review of Natural and Synthetic Antioxidants Important for Health and Longevity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3262-3288, 2010.

YANG, Y.; BAE, M.; KIM, B.; PARK, Y. K.; KOO, S. I.; LEE, J. I. Astaxanthin prevents and reverses the activation of mouse primary hepatic stellate cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 29, p. 21-26, 2016.

YANG, Y.; KIM, B.; LEE, J-Y. Astaxanthin Structure, Metabolism and Health Benefits. **Journal of Human Nutrition & Food Science**, v.1, n. 1003, 2013.

YIN, Y.; WENQI, L.; SON, Y. O.; SUN, L.; LU, J.; KIM, D.; WANG, X.; YAO, H.; WANG, L.; PRATHEESHKUMAR, P.; HITRON, A. J.; LUO, J.; GAO, N.; SHI, X.; ZHANG, Z. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 269, p. 89–99, 2013.

YOSHIDA, H.; YANAI, H.; ITO, K.; TOMONO, Y.; KOIKEDA, T.; TSUKAHARA, H.; TADA, N. Administration of natural astaxanthin increases serum HDL-cholesterol and adiponectin in subjects with mild hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, v. 209, p. 520–523, 2010.

YOSHIHISA, Y.; REHMAN, M. U.; SHIMIZU, T. Astaxanthin, a xanthophyll carotenoid, inhibits ultra- violet-induced apoptosis in keratinocytes. **Experimental Dermatology**, n. 23, p. 178-183, 2014.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p.176-186, 2001.

YUAN, C.; JIN, Z.; XU, X.; ZHUANG, H.; SHEN, W. Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 109, p. 264–268, 2008.

YUAN, F.; XU, D.; QI, X.; ZHAO, J. Impact of High Hydrostatic Pressure on the Emulsifying Properties of Whey Protein Isolate–Chitosan Mixtures. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 1024–1031, 2013.

YUAN, J. P. Characteristics and Chromatographic Separation of Astaxanthin and its Esters from the Microalga *Haematococcus pluvialis*. 1999. 211p. **Tese (Doctor of Philosophy)** - University of Hong Kong, Hong Kong.

YUAN, J. P.; CHEN, F. Hydrolysis Kinetics of Astaxanthin Esters and Stability of Astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during Saponification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, pg. 31-35, 1999.

YUAN, J. P.; CHEN, F. Purification of Trans-astaxanthin from a High-yielding Astaxanthin Ester-producing Strain of the Microalga *Haematococcus pluvialis*. **Food Chemistry**, v. 68, p.443-448, 2000.

YUAN, J. P.; PENG, J.; YIN, K.; WANG, J. H. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. 150–165, 2011.

ZAGHDOUDI, K.; PONTVIANNE, S.; FRAMBOISIER, X.; ACHARD, M.; KUDAIBERGENOVA, R.; AYADI-TRABELSI, M.; KALTHOUM-CHERIF, J.; VANDERESSE, R.; FROCHOT, C.; GUIAVARC'H, Y. Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki L.*), peach (*Prunus persica L.*) and apricot (*Prunus armeniaca L.*), **Food Chemistry**, v. 184, p.131–139, 2015.

ZHANG, B. Y.; GENG, Y. H.; LI, Z. K.; HU, H. J.; LI, Y. G. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. **Aquaculture**, v. 295, p. 275–281, 2009.

ZHANG, J.; SUN, Z.; SUN, P.; CHEN, T.; CHEN, F. Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. **Food & Function**, v. 5, 413–425, 2014.



ZHANG, Y.; HUO, M.; ZHOU, J.; ZOU, A.; LI, W.; YAO, C.; XIE, C. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 263-271, 2010.

ZOU, T. B.; JIA, Q.; LI, H. W.; WANG, C. X.; WU, H. F. Response Surface Methodology for Ultrasound-Assisted Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Marine Drugs**, v. 11, p. 1644-1655, 2013.