

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais

KELE CRISTINA FERREIRA DANTAS

**DESENVOLVIMENTO DE NANOSSISTEMAS POLIMÉRICOS PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE ÁCIDO ASCÓRBICO, NIACINAMIDA E ÁCIDO FERÚLICO
LIVRES E COMPLEXADOS AO ZINCO PARA FINS DERMOCOSMÉTICOS**

Belo Horizonte - Minas Gerais

2024

KELE CRISTINA FERREIRA DANTAS

DESENVOLVIMENTO DE NANOSSISTEMAS POLIMÉRICOS PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE ÁCIDO ASCÓRBICO, NIACINAMIDA E ÁCIDO FERÚLICO LIVRES
E COMPLEXADOS AO ZINCO PARA FINS DERMOCOSMÉTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
Multicêntrico em Química como requisito para a obtenção
do título de Doutora em Química

Orientadora: Prof^a Dr^a Priscila Pereira Silva Caldeira

Dantas, Kele Cristina Ferreira.
D192d Desenvolvimento de nanossistemas poliméricos para liberação controlada de ácido ascórbico, niacinamida e ácido ferúlico livres e complexados ao zinco para fins dermocosméticos / Kele Cristina Ferreira Dantas. – 2024.
144 f. : il.
Orientadora: Priscila Pereira Silva Caldeira.

Tese (doutorado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2024.
Bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. Polímeros. 3. Cosméticos. 4. Ácido ascórbico. 5. Niacinamida. I. Caldeira, Priscila Pereira Silva. II. Título.

CDD: 646.72

KELE CRISTINA FERREIRA DANTAS

**DESENVOLVIMENTO DE NANOSSISTEMAS POLIMÉRICOS PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE ÁCIDO ASCÓRBICO, NIACINAMIDA E ÁCIDO FERÚLICO
LIVRES E COMPLEXADOS AO ZINCO PARA FINS DERMOCOSMÉTICOS**

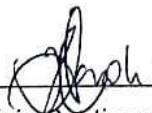
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Química.

Belo Horizonte, 08 de novembro de 2024.

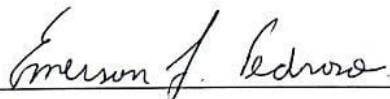
Aprovada pela Banca Examinadora:



Profa. Dra. Priscila Pereira Silva Caldeira (Orientadora)



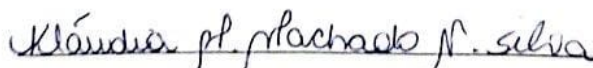
Profa. Dra. Patrícia Santiago de Oliveira Patricio



Prof. Dr. Emerson Fernandes Pedroso



Profa. Dra. Gisele Assis Castro Goulart



Profa. Dra. Kláudia Maria Machado Neves Silva

Agradecimentos

Ao Senhor da minha vida, o qual tens meu folêgo de vida nas mãos e sem Ele não posso prosseguir. À Deus toda minha gratidão e honra.

À minha orientadora Professora Doutora Priscila Pereira Silva Caldeira, um presente de Deus para mim. Estou certa de que não poderia viver essa jornada sem essa orientação. Vivemos juntas os dilemas de maternar, de cumprir rotinas diárias de casa e pesquisar, as delícias e as angústias de tudo isso. As preocupações e correrias. As descobertas incríveis que são conseguidas com a Ciência e as mais incríveis ainda que é assistir o crescimento e desenvolvimento de um ser humano diariamente. À você, Priscila, o meu muito obrigada e o meu desejo de muitas parcerias ainda.

Ao meu grupo de pesquisa Qinetec por parcerias, contribuições, apoio e convívio. Ao Pedro, em especial, pela participação tão intensa na etapa dos experimentos finais.

À minha colega de jornada, Jânia. Trilhamos esse caminho praticamente o tempo todo juntas. Foram congressos, artigo, vivência laboratorial, ansiedades e alívios. Enfim, ter você por perto foi muito bom. Que a nossa amizade perdure.

Aos meus colegas do Grupo de Catálise e Processos Tecnológicos (GCPT) dos professores Raquel e Eudes, do Laboratório de Eletroquímica e Físico-Química Apicada dos Professores João paulo e Paulo e do Grupo Intechlab dos professores Emerson, Patrícia e Paterson que também contribuíram realizando análises, me recebendo para utilização de equipamentos, conversando e sendo cooperadores.

Ao Centro Federal Tecnológico de Minas Gerais pela estrutura fornecida e apoio financeiro. Aos professores do Programa Multicêntrico em Química, à Rede Mineira de Química, À Fapemig pela concessão de bolsas em um período crucial para continuidade deste trabalho. À Fundação Ezequiel Dias que já foi meu ambiente profissional de trabalho por anos e que nunca fechou as portas para mim. Em especial, aos colegas do Serviço de Controle Físico Químico e aos colegas do Departamento de Pesquisa Fitoquímica.

Ao meu esposo, Thiago. Faltam-me palavras para dizer o quanto você é essencial e participante da minha jornada. Ter você comigo é um privilégio. Obrigada por me apoiar, por estar comigo, por enfrentar e vencer os desafios diários de se constituir uma família e zelar por ela em dias tão difíceis como os de hoje. Eu amo amar você.

À dupla mais querida da minha vida, às duas crianças que me deixam louca e ao mesmo tempo me fazem a pessoa mais feliz e abençoada desta vida. Àqueles que viraram minha vida ao avesso e me mostraram que o melhor lado era esse. Eu só entrei nessa jornada certa que se nãooubessem vocês, Mariana e Henrique, em alguma etapa, não me caberia também. Enfim, chegamos juntos! Filhos eu amo vocês!

Aos meus pais, Pedro e Nelia, muito obrigada por cuidarem de mim, se estou aqui hoje devo grande parte a vocês. Sim mesmo grande e crescida, a presença de vocês e o cuidado é precioso para mim.

E vocês não precisam necessariamente entender sobre tudo que trabalho e sim permanecer comigo. Isso me impulsiona. Ser a Kekezinha de vocês me faz tão bem!

À minha irmã Kamila por sempre estar, por desejar minha companhia, por conversar comigo, pelas lindas sobrinhas que me deste e por nunca se afastar. Você é incrível como irmã! Eu amo a maneira como estamos contruindo nosso relacionamento, estreitando laços para uma vida toda.

Aos meus familiares, sogros, cunhados, cunhada, concunhada, avós, tios, primos. Obrigada por ser família e me proporcionar um lugar de conforto no mundo.

Aos meus irmãos em Cristo e amigos, cada palavra, cada boa ação direcionada a mim contribuiu para eu ser quem sou hoje.

Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidas duas nanoformulações para encapsulamento de princípios ativos para uso como dermocosmético. Na primeira nanoformulação foram empregados os polímeros alginato de sódio e poloxamer 407 para carrear os ativos niacinamida (NA), ácido ascórbico (AA) e um complexo de zinco (II) inédito contendo esses ativos como ligantes (complexo **1**). A presença dos ativos e do complexo nas nanopartículas (NPs), que variaram de 261 a 476nm, foi confirmada através da espectrometria vibracional. O estudo desse sistema indicou limitações importantes em relação à estabilidade da nanoformulação devido a valores de potencial Zeta abaixo de 30mV em módulo e em relação a quantificação do ativo ácido ascórbico nas NPs. Assim, um estudo para avaliação da degradação do AA em soluções aquosas foi realizado, sendo desenvolvido um método colorimétrico com íons Fe^{3+} e 1,10-fenantrolina para quantificação direta de AA nas NPs. Objetivando superar as limitações do sistema anterior, um segundo nanossistema à base dos polímeros quitosana, alginato e poloxamer 407 foi preparado. Para formação das NPs, um complexo polieletrólítico de alginato-quitosana foi usado para recobrir o ativo disperso em micelas de poloxamer. Esse sistema foi usado para carrear o ativo AA e ácido ferúlico (FcA). As NPs foram obtidas empregando-se diferentes quantidades de AA no preparo (1 a 20mg) e apresentaram tamanho médio entre 291 e 399nm, potencial Zeta superior a 34mV e índice de polidispersão menor que 0,32, parâmetros adequados à administração tópica, indicativos de homogeneidade e boa estabilidade das NPs em solução. Os valores de encapsulamento variaram de 10 a 27%, que é esperado para ativos instáveis e altamente solúveis como o AA. A cinética de liberação de AA a partir das NPs foi monitorada em sistemas que simulam condições fisiológicas relevantes (pele pH 5,5 e sangue pH 7,4). Para ambas as condições, o modelo cinético que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o de Korsmeyer-Peppas com um expoente difusional que denotou um transporte super caso II. Em relação ao FcA, os resultados de eficiência de encapsulamento foram inferiores a 4% e, portanto, optou-se por sintetizar um complexo de FcA e zinco (complexo **2**), a fim de avaliar um possível encapsulamento futuro desse complexo no nanossistema desenvolvido. Neste trabalho também foi abordado o processo de modificação química do polímero biodegradável poloxamer 407 para conjugá-lo ao FcA. Devido à atividade antioxidante, maior estabilidade térmica e maior tempo de prateleira, o polímero modificado apresentou potencial para encapsulamento de ativos sensíveis à oxidação em formulações de produtos farmacológicos e/ou cosméticos.

Palavras-chaves: nanopartículas poliméricas; cosmético; ácido ascórbico; ácido ferúlico; niacinamida.

Abstract

In this work, two nanoformulations were developed for encapsulation of active ingredients of interest for dermocosmetic use. In the first nanoformulation, the polymers sodium alginate and poloxamer 407 were used to carry the active ingredients niacinamide (NA), ascorbic acid (AA) and a new zinc (II) complex containing these active ingredients as ligands (complex 1). The presence of the active ingredients and the complex in the nanoparticles (NPs) that ranged from 261 to 476nm was confirmed through vibrational spectrometry. The study of this system indicated important limitations regarding the stability of the nanoformulation due to Zeta potential values below 30mV in module and regarding the quantification of the active ingredient ascorbic acid in the NPs. Thus, a study on the degradation of AA in aqueous solutions was carried out and a colorimetric method using Fe^{3+} ions and 1,10-phenanthroline for direct quantification of AA in the NPs was developed. Aiming to overcome the limitations of the previous system, a second nanosystem based on chitosan, alginate and poloxamer 407 polymers was prepared. For the formation of NPS, a polyelectrolytic complex of alginate-chitosan was used to coat the active dispersed in poloxamer micelles. This system was used to carry the active AA and ferulic acid (FcA). NPs were obtained using different amounts of AA in the preparation (1 to 20 mg) and presented an average particle size between 291 and 399 nm with a Zeta potential exceeding 34 mV and a polydispersity index lower than 0.32, which indicates an adequate size for topical administration, homogeneity and good stability of the NPs in solution. The encapsulation values ranged from 10 to 27%, as expected for unstable and highly soluble actives such as AA. The release kinetics of AA from the NPs were monitored in systems that simulate relevant physiological conditions (skin pH 5.5 and blood pH 7.4). For both conditions, the kinetic model that best fitted the experimental data was the Korsmeyer-Peppas with a diffusional exponent that denoted a super case II transport. Regarding FcA, the encapsulation efficiency results were less than 4% and, therefore, it was decided to synthesize a complex of FcA and zinc (complex 2) in order to evaluate a possible future encapsulation of this complex in the developed nanosystem. In addition, this work addressed the chemical modification process of the biodegradable polymer poloxamer 407 to conjugate it to FcA. Due to the antioxidant activity, greater thermal stability and longer shelf life, the modified polymer showed potential to be applied in the encapsulation of active ingredients sensitive to oxidation in formulations of pharmacological and/or cosmetic products.

Keywords: polymeric nanoparticles; cosmetic; ascorbic acid; ferulic acid; niacinamide.

Lista de figuras

Figura 1: Principais nanossistemas em cosméticos.....	20
Figura 2: Algumas vantagens do uso de nanocarreadores em cosméticos. Fonte: Autoria própria..	22
Figura 3: Características importantes das formulações cosméticas baseadas em nanotecnologia. Adaptada de Santos et al., 2019.....	23
Figura 4: Algumas vantagens e desvantagens do uso de nanocosméticos. Adaptada de Gupta et al., 2022.....	25
Figura 5: Representação das principais rotas de penetração de nanopartículas na pele: (A) intracelular, (B) transporte apendicular e (C)intercelular. Figura de própria autoria feita com o auxílio do programa online canva.com.....	26
Figura 6: Representação da estrutura geral de um Pluronic®.....	28
Figura 7: Representação da interação das micelas formadas a partir de pluronics com moléculas de água.....	28
Figura 8: Estruturas químicas do bloco G, bloco M e do bloco alternado.....	29
Figura 9: Formação de um gel de alginato por cátions de zinco, resultando em junções ligadas ao zinco do tipo “caixa de ovo”. Fonte: Adaptada de Paques et al., 2014.....	31
Figura 10: Representação da interação SA-PLX. Adaptada de Rapee Khlibsuwan , Watcharee Khunkitti, 2020.....	32
Figura 11: Representação da estrutura química da Quitina e da Quitosana (CS). Fonte: Regattieri et al. (2016).....	33
Figura 12: Ilustração esquemática das interações iônicas entre quitosana e alginato. Adaptada de (Wasupalli & Verma, 2018).....	34
Figura 13: Representação da estrutura química da Niacinamida/Nicotinamida e do Ácido nicotínico/Niacina.....	37
Figura 14: Estruturas químicas presentes na ionização do ácido ascórbico em água.....	39
Figura 15: Estrutura química do ácido ferúlico (FcA).....	40
Figura 16: Esquema do procedimento para obtenção de nanopartículas de alginato e pluronic pelo método de gelificação ionotrópica com íons zinco.....	50
Figura 17: Espectros vibracionais do PLX, SA, da nanopartícula 1B (sistema com PLX, SA e reticulação com Zn^{2+}).....	57

Figura 18: Espectros vibracionais do NA, AA , da nanopartícula 1B e 7B(sistema com PLX, NA, AA, SA e reticulação com Zn^{2+}).....	58
Figura 19: Espectros vibracionais do complexo, da nanopartícula 1B e da 9B (sistema com PLX , complexo, SA e reticulação com Zn^{2+}).....	59
Figura 20: Representação gráfica do estudo de liberação dos ativos a partir das nanopartículas (6mg) em meio tamponado pH 5,5 e 37°C, simulando condições da pele humana.....	63
Figura 21: Gráfico dos dados da liberação de AA em pH 5,5 ajustados ao modelo Korsmeyer-Peppas para descrever a cinética de liberação do AA a partir das NPs.....	64
Figura 22: Degradação do ácido ascórbico em meio tamponado pH 5,5.....	66
Figura 23: Gráfico da curva de calibração de AA utilizando regressão linear.....	71
Figura 24: Representação gráfica do estudo de degradação do AA exposto a luz e da degradação com o tempo.....	73
Figura 25: Esquema do procedimento para obtenção das nanopartículas de PLX com o ativo AA e revestidas pelo complexo polieletrólítico SA-CS.....	77
Figura 26: Representação da formação de micelas de PLX em solução aquosa/etanol e da interação de AA com parte hidrofílica.....	80
Figura 27: Espectros de PLX, CS, SA, NPs não carregados (NPs), NPs carregados com AA (AA-NPs) e AA. As setas vermelhas no espectro de NPs indicam as bandas $\nu(O-H)$, $\nu_{ass}(COO-)$ e $\nu_{sim}(COO-)$, enquanto em AA-NPs, as setas vermelhas designam as bandas características de AA nesta nanoformulação.....	82
Figura 28: Termogramas DSC de NPs em branco (NPs), NPs carregados com AA (AA-NPs) e dos precursores (polímeros PLX, SA e CS). Taxa de aquecimento 10.00°C/min (Perkin – Elmer Pyris Diamond DSC).....	83
Figura 29: Distribuição do Tamanho médio das partículas dos sistemas S1 a S7.....	85
Figura 30: Distribuição do Potencial Zeta das partículas dos sistemas S1 a S7.....	86
Figura 31: %EE (quadrados pretos) e %LC (círculos azuis) em função da quantidade de AA adicionada durante o processo de preparação de NPs. Os resultados são expressos como médias $\pm$ sd, n = 3.....	89
Figura 32: Relação entre tamanho médio de partículas e % de capacidade de carga (%LC).....	90
Figura 33: Gráfico da regressão linear da curva de calibração de AA (método colorimétrico em pH 5,5 e em pH 7,4).....	91

Figura 34: Perfil de liberação <i>in vitro</i> de AA de NPs (S7) em tampão HEPES 5.5 (quadrados pretos) e 7.4 (círculos azuis) sob condições sink a 37°C. Os resultados são expressos como médias $\pm$ dp, n = 3.....	92
Figura 35: Gráfico dos dados da liberação de AA em pH 5,5 ajustados ao modelo Korsmeyer-Peppas para descrever a cinética de liberação do AA a partir das NPs.....	93
Figura 36: Gráfico dos dados da liberação de AA em pH 7,4 ajustados ao modelo Korsmeyer-Peppas para descrever a cinética de liberação do AA a partir das NPs.....	93
Figura 37: Representação esquemática das principais reações para conjugação do PLX-FcA.....	98
Figura 38: Estrutura química do FcA-PLX.....	98
Figura 39: Representação gráfica do espectro vibracional do PLX, FcA e do PLX-FcA.....	100
Figura 40: Representação gráfica da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H do polímero PLX. Adaptada de (Dou et al., 2016).....	101
Figura 41: Representação gráfica da Representação gráfica da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H do polímero PLX-FcA.....	101
Figura 42: Espectros eletrônicos (Ultravioleta-Visível) do PLX ($1,27 \times 10^{-5} \text{ mol.L}$), PLX-FcA ($1,27 \times 10^{-5} \text{ mol.L}$) e ácido ferúlico ($2,54 \times 10^{-5} \text{ mol.L}$).....	102
Figura 43: Representação gráfica do resultado da análise termogavimétrica do PLX e do PLX-FcA.	103
Figura 44: Termogramas DSC de PLX e PLX-FcA. Taxa de aquecimento $10.00^\circ\text{C}/\text{min}$ (Perkin – Elmer Pyris Diamond DSC).....	104
Figura 45: Representação gráfica dos espectros vibracionais do PLX e do PLX-FcA submetidos a teste de degradação acelerada.....	105
Figura 46: Representação gráfica dos padrões de atividade antioxidante (teste com DPPH) do polímero Pluronic puro e do pluronic modificado (PLX-FcA).....	106
Figura 47: Distribuição do Tamanho médio das partículas (triplicata) formadas a partir de soluções aquosas de PLX e de PLX-FcA	107

Índice de tabelas

Tabela 1: Compostos de zinco e suas funções na pele.....	36
Tabela 2: Mecanismos de liberação a partir de estruturas poliméricas.....	42
Tabela 3: Algumas propriedades e dados de reagentes e solventes utilizados.....	44
Tabela 4: Alguns dados de equipamentos utilizados.....	47
Tabela 5: Planejamento para obtenção das nanopartículas.....	49
Tabela 6: Volumes (mL) das soluções para obtenção das nanopartículas.....	49
Tabela 7: Tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta das nanopartículas do teste para determinação da melhor proporção de alginato e pluronic.....	51
Tabela 8: Planejamento para obtenção das nanopartículas.....	52
Tabela 9: Volumes (mL) das soluções para obtenção das nanopartículas.....	52
Tabela 10: Caracterização das suspensões das nanopartículas.....	55
Tabela 11: Concentração de Zinco no sobrenadante, calculado a partir dos dados da absorção atômica.....	60
Tabela 12: Parâmetros da curva de calibração construída a partir dos dados da espectroscopia UV-Vis dos ativos ácido ascórbico, niacinamida e do complexo.....	60
Tabela 13: Eficiência de encapsulamento de ácido ascórbico nas NPs (leitura em 264nm).....	61
Tabela 14: Eficiência de encapsulamento de niacinamida nas NPs (leitura a 212nm).....	61
Tabela 15: Eficiência de encapsulamento do complexo nas NPs (leitura em 262 nm).....	62
Tabela 16: Dados para construção da curva de liberação de AA a partir das NPs no tampão de fosfato pH 5,5.....	62
Tabela 17: Dados para construção da curva de liberação de NA a partir das NPs no tampão de fosfato pH 5,5.....	63
Tabela 18: Valores de coeficientes de determinação para modelos de cinética de liberação.....	64
Tabela 19: Absorbância de AA em pH 5,5 e em comprimento específico em função do tempo medida por espectrofotômetro UV-Vis.....	65
Tabela 20: Etapa de preparo das soluções para construção da curva de calibração.....	69
Tabela 21: Parâmetros da curva de calibração construída a partir dos dados da espectroscopia UV-Vis do complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$	70
Tabela 22: Estudo de degradação do AA exposto a luz e da degradação com o tempo.....	72

Tabela 23: Planejamento experimental de preparo das soluções para construção da curva de calibração em tampão.....	79
Tabela 24: Dados de tamanho médio de partícula, PDI e Potencial Zeta (ZP) com os respectivos desvios-padrão para as NPs obtidas.....	87
Tabela 25: Valores de eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carga (LC) para cada sistema de NPs.....	88
Tabela 26: Parâmetros da curva de calibração construída a partir dos dados da espectroscopia UV-Vis do complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ em pH 5,5 e em pH 7,4.....	91
Tabela 27: Valores do coeficiente de determinação (R^2), constantes de velocidade (k) e expoente difusional (n) para quatro modelos cinéticos de liberação de fármacos.....	92

Lista de abreviaturas e siglas

AA = Ácido Ascórbico

ABS = Absorbância

CS = Quitosana

NA = Niacinamida

NC = Número de coordenação

NPs = Nanopartículas

PdI = Índice de polidispersividade

PEC= Complexo Polieletrólítico

PLX = Poloxamer 407 (Pluronic® F127)

RDC = Resolução da Diretoria Colegiada

SA = Alginato de sódio

UV= Ultravioleta

ZP = Potencial Zeta

Sumário

1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Cosméticos.....	18
2.2 Nanotecnologia.....	19
2.3 Nanoestruturas poliméricas.....	21
2.4 Uso de nanotecnologia em produtos cosméticos.....	22
2.5 Nanocosméticos <i>versus</i> nanocosmecêuticos.....	23
2.6 Penetração/permeação de nanopartículas na pele.....	25
2.7 Polímeros.....	27
2.7.1 Pluronic®.....	28
2.7.2 Alginato de sódio.....	29
2.7.3 Interação entre os polímeros alginato e pluronic.....	31
2.7.4 Quitosana.....	32
2.7.5 Formação de complexo polieletrólítico entre quitosana e alginato.....	33
2.7.6 Modificações estruturais em polímeros.....	35
2.8 Princípios ativos.....	35
2.8.1 Zinco.....	35
2.8.2 Niacinamida(vitamina B3).....	36
2.8.3 Ácido ascórbico (vitamina C).....	38
2.8.4 Ácido ferúlico.....	39
3 OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo geral.....	43
3.2 Objetivos Específicos.....	43
4 MATERIAIS.....	44
4.1 Reagentes e solventes.....	44
4.2 Métodos de análise.....	45
4.2.1 Análise Elementar- CHN.....	45
4.2.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.....	45
4.2.3 Espectroscopia Eletrônica na Região do Ultravioleta-visível.....	45
4.2.4 Termogravimetria.....	45
4.2.5 Espectroscopia de Absorção Atômica.....	46
4.2.6 Análise Condutimétrica.....	46
4.2.7 Análise de temperatura de fusão.....	46
4.2.8 Análise de tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta.....	46
4.3 Instrumentos e Equipamentos.....	46
CAPÍTULO 5 - PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ALGINATO DE SÓDIO E POLOXAMER 407 PELO MÉTODO DE GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA CARREGADAS COM OS ATIVOS NIACINAMIDA E ÁCIDO ASCÓRBICO LIVRES E COMPLEXADOS AO ZINCO.....	48
5.1 Parte experimental.....	49
5.1.1 Determinação da melhor proporção SA-PLX.....	49
5.1.2 Preparo das nanopartículas com incorporação dos ativos.....	51
5.2 Resultados e Discussão.....	54
5.2.1 Caracterização dos sistemas obtidos.....	54

5.2.2 Caracterização das nanopartículas obtidas.....	54
5. 3 Conclusões.....	66
CAPÍTULO 6 - DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO DIRETAMENTE EM NANOPARTÍCULAS.....	68
6.1 Parte experimental.....	69
6.1.1 Construção da curva de calibração.....	69
6.1.2 Estudo de degradação do ácido ascórbico em soluções aquosas e o potencial do método colorimétrico para dosar o AA nas NPs.....	69
6.1.3 Método de quantificação de AA em NPs.....	70
6.2 Resultados e discussão.....	70
6.2.1 Construção da curva de calibração para quantificação de AA diretamente nas nanopartículas.....	70
.....	71
6.2.2 Análise da degradação do AA em soluções aquosas e o potencial do método orto- fenantrolina e ferro para dosar o AA.....	71
6.2.3 Etapa de quantificação de AA em NPs.....	74
6.3 Conclusão.....	74
CAPÍTULO 7 – PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLOXAMER 407 COM ÁCIDO ASCÓRBICO REVESTIDAS POR COMPLEXO POLIELETROLÍTICO DE QUITOSANA (CS)-ALGINATO DE SÓDIO (SA).....	75
7.1 Parte experimental.....	76
7.1.1 Preparo das nanopartículas e estudo da quantidade otimizada de AA.....	76
7.1.2 Preparo das amostras para caracterização das nanopartículas.....	77
7.2 Resultados e Discussão.....	80
7.2.1 Caracterização das nanopartículas.....	80
7.3 Conclusões.....	94
CAPÍTULO 8 - POLOXAMER-407 QUIMICAMENTE CONJUGADO AO ÁCIDO FERÚLICO PARA ENCAPSULAMENTO E ESTABILIZAÇÃO DE ATIVOS SENSÍVEIS À OXIDAÇÃO...	96
8.1 Parte experimental.....	97
8.1.1 Síntese.....	97
8.1.2 Preparo das amostras para caracterização das nanopartículas.....	98
8.1.3 Teste de estabilidade.....	98
8.2 Resultados e discussão.....	99
8.2.1 Caracterização do Pluronic conjugado ao ácido ferúlico (PLX-FcA).....	99
8.3 Conclusão.....	107
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	109
APÊNDICES.....	110
Apêndice 1: Síntese do Complexo de zinco com ácido ascórbico e niacinamida (Complexo 1)	111
Apêndice 2: Complexo de zinco com ácido ferúlico (complexo 2).....	118
REFERÊNCIAS.....	125
ANEXOS.....	140

1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

As indústrias de cosméticos têm investido e expandido suas pesquisas na área de nanotecnologia visando desenvolver produtos com maior valor agregado. Os nanocosméticos, além de driblarem problemas como baixas solubilidade e estabilidade de ingredientes ativos, se comparado aos cosméticos convencionais, resultam em produtos com melhor eficiência e maior tempo de prateleira, além de apresentarem maior apelo mercadológico. Além das vantagens já mencionadas, o uso de nanotecnologia em cosméticos pode abrir horizontes para novas possibilidades, como a junção de ativos em uma mesma nanoformulação, para atuarem de forma sinérgica.

Sabendo-se que o íon zinco(II), bem como alguns outros ativos orgânicos, tais como ácido ascórbico (vitamina c), niacinamida (vitamina B3) e ácido ferúlico têm potencial para uso em cosméticos, a presente pesquisa foi planejada e realizada a fim de criar um nanossistema que englobasse esses ativos. Estudos apontam que a presença de íons zinco(II) em cosméticos pode desempenhar papel importante na prevenção do envelhecimento da pele, enquanto que o uso tópico da niacinamida pode melhorar o aspecto da pele, suavizando rugas, além de atuar como sebo-supressor e antiinflamatório, contribuindo para o combate a acne. O ácido ascórbico, por sua vez, é um potente antioxidante que protege a pele de radicais livres, evitando a degradação e envelhecimento precoce da pele. Além do ácido ascórbico, tem-se o ácido ferúlico, que também possui grande potencial antioxidante e tem sido amplamente incorporado em formulações cosméticas devido à funções biológicas como fotoproteção, antienvelhecimento e clareador. Somando a isso, o ácido ferúlico pode atuar como estabilizante da vitamina C.

Tendo em vista o crescente aumento das pesquisas científicas na área de nanocosméticos, bem como as interessantes propriedades dos íons zinco(II), ácido ascórbico, niacinamida e ácido ferúlico no cuidado da pele, propusemos estudar o tema e desenvolvermos nanossistemas a partir desses ativos. Também foi proposta uma modificação estrutural do polímero Poloxamer 407. Assim, como objetivo deste trabalho tem-se avaliar esses nanossistemas poliméricos e polímero modificado quanto à capacidade de carrear ativos e aumentar a estabilidade dos mesmos, promovendo uma entrega mais eficaz em formulações dermocosméticas. A importância que a área de cosméticos tem atualmente ocupado na pesquisa científica e o potencial de crescimento desse segmento, nos aponta para a relevância desse estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cosméticos

Cosméticos podem ser definidos como os produtos que melhoram a aparência da pele, intensificam a limpeza e promovem a beleza (Kaul et al., 2018). Segundo a RDC Nº 07, DE 10 DE FEVEREIRO DE 2015

Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (ANVISA, 2015).

A FDA (*Food and Drug Administration*), agência reguladora de medicamentos dos EUA, define cosméticos como uma formulação destinada a ser aplicada no corpo humano para limpar, embelezar, promover atratividade ou alterar a aparência sem afetar a estrutura ou funções do corpo (U.S. Food & Drug Administration, 2018). Essas definições não citam, por exemplo, alguns avanços da ciência na área de cosmético, como o uso de materiais do tamanho nano em cosméticos (nanocosméticos) ou o termo “cosmecêutico” (Santos *et al.*, 2019).

Hoje, o uso de cosméticos é muito comum e formulações cosméticas repletas de inovação vem ganhando o mercado (Saha, 2012). Dentre esses produtos, aqueles classificados como cosmecêuticos, vem ganhando espaço no mercado. Estes, são produtos cosméticos que incorporam ingredientes biologicamente ativos, com benefícios terapêuticos na superfície aplicada e melhoram a aparência. Os produtos cosmecêuticos têm eficácia terapêutica mensurável e são usados para o tratamento de danos ao cabelo, rugas e fotoenvelhecimento da pele (Ajazzuddin *et al.*, 2015); podendo ser classificado como medicamento e produtos de beleza que prometem uma melhora na aparência (Gupta *et al.*, 2022).

A agência *Federal Food, Drug, and Cosmetic* (FD&C) não reconhece nenhuma categoria como "cosmecêuticos". O documento de 2018 cita que um produto pode ser um medicamento, um cosmético ou uma combinação de ambos, mas o termo "cosmecêutico" não tem significado legal (U.S. Food & Drug Administration, 2018). Mesmo assim, o termo é usado e os cosmecêuticos são considerados um dos segmentos da indústria de cosméticos que mais cresce (Kaul *et al.*, 2018).

No segmento de nanocosméticos tem se observado uma expansão em pesquisa, exploração e aplicações. No ano de 2019, o tamanho do mercado internacional de nanomateriais foi estimado

em 8,5 bilhões USD (dólar americano) e deverá aumentar com uma taxa de crescimento anual composta de até 13,1% dos anos de 2020 a 2027 (Gupta *et al.*, 2022).

2.2 Nanotecnologia

O pesquisador Richard Feynman, em 1959, foi quem formalmente introduziu o conceito de nanotecnologia com a famosa frase “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, na reunião anual da Sociedade Americana de Física, no Instituto de Tecnologia da Califórnia (Caltech) (Martins & Trindade, 2012). Desde então, houve considerável pesquisa e desenvolvimento tecnológico na área de nanotecnologia.

A nanotecnologia trabalha com materiais de tamanho nanométrico, que podem ser obtidos de forma natural, acidental ou sintetizado, conter partículas isoladas ou agregadas, devendo 50% ou mais das partículas encontrarem-se na distribuição numérica de tamanho nano, sendo que uma ou mais dimensões externas estão na faixa de 1–100 nm (União Europeia, 2009). Além disso, um material também pode ser colocado na classificação ‘nano’ se sua área de superfície específica por volume for maior que $60\text{m}^2/\text{cm}^3$ (Papakostas *et al.*, 2011).

As nanopartículas farmacêuticas possuem classificação diferenciada, apresentando faixa de tamanhos maiores. Elas são definidas como partículas coloidais carregadas de ingrediente ativo com dimensões nanométricas abaixo de 1000 nm, feitas na sua maior parte de substância biocompatível e podendo melhorar as propriedades do material em comparação com seu material isolado (Karim *et al.*, 2016; Khezri *et al.*, 2018; S. Kumar *et al.*, 2022; Raszewska-famielec, 2022).

Na nanociência moderna o uso de nanotecnologia pode ser relativamente novo. Porém, materiais em nanoescala vêm sendo usados há muito tempo, havendo registro do uso de nanopartículas de cobre durante o final da Idade do Bronze (1200-1000 a.C) para colorir o vidro de vermelho (Colomban *et al.*, 2009). Em cosméticos, pode-se citar nanopartículas de prata e ouro para pintarem as unhas das mulheres, e um pó de ouro usado como anti-envelhecimento (Ajazzuddin *et al.*, 2015).

A nanotecnologia e os sistemas de nanoentrega, também conhecidos como nanocarreadores, procuram desenvolver e aplicar materiais, dispositivos e sistemas no nível de nanoescala. Essas inovações vêm sendo estudadas na área de cosméticos e cosmeceúticos. Apesar do conceito de nanomateriais (em sua maioria nanopartículas de ouro e prata) já ser abordado em cosméticos há vários anos, as aplicações se intensificaram nos últimos anos (Gupta *et al.*, 2022). A nanotecnologia possibilita que ativos hidrofílicos e hidrofóbicos sejam dispersos na mesma matriz,

nas formas de nanoesferas ou nanocápsulas, geralmente de tamanho em torno de 200-300nm (Abu Hajleh *et al.*, 2021).

Sistemas de entrega inovadores vêm sendo usados e incorporados em formulações cosméticas. As estruturas que tem sido usadas mais comumente em cosméticos são lipossomos (LP), nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs), niossomos, nanopartículas de ouro, nanoemulsão (NE) e nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas) (Abu Hajleh *et al.*, 2021; Kaul *et al.*, 2018). Esses nanomateriais usados em cosméticos podem ser também agrupados em quatro grandes grupos: nanossistemas de base lipídica, nanossistemas de base polimérica, nanossistemas de base metálica e outros nanossistemas adicionais (**Figura 1**) (Nafisi & Maibach, 2017).

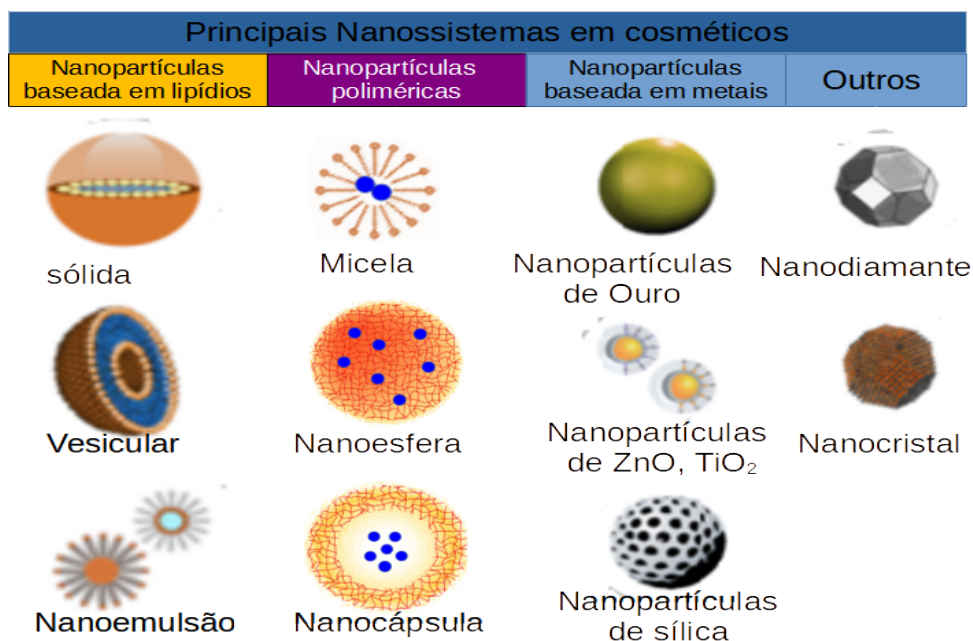


Figura 1: Principais nanossistemas em cosméticos.

Adaptada de Dantas, K.C.F.; Rosário, J.d.S.; Silva-Caldeira, P. P. 2022; Santos *et al.*, 2019.

Para sistemas de uso tópico, as nanoestruturas são capazes de regular a cinética de liberação e os perfis de permeação cutânea, permitindo um direcionamento do ativo para camadas específicas da pele e podendo melhorar a estabilidade dos ativos incorporados (Cardoso *et al.*, 2019). As nanoestruturas também são de grande interesse para formulações farmacêuticas de uso oral, pois permitem a modulação de características físico-químicas que influenciam diretamente na sua estabilidade no trato gastrointestinal, nas propriedades de liberação de fármacos e no comportamento biológico (bioadesão, absorção celular) (Wang *et al.*, 2019). Além disso, os materiais na escala nanométrica possuem propriedades físico-químicas únicas, como o tamanho pequeno, que os aproxima de entidades biológicas tornando possível a interação com biomoléculas na superfície celular e dentro da célula. Ao mesmo tempo, deve-se ter um cuidado especial no uso

de nanomateriais, pois devido a essas propriedades podem apresentar efeitos tóxicos (Elsabahy & Wooley, 2012).

Nanoestruturas encapsuladas com íons metálicos bioativos constituem uma estratégia interessante para incorporação de ativos de forma mais segura em fármacos ou dermocosméticos. A nanotecnologia tem sido vista como uma grande aliada da indústria cosmética no desenvolvimento de produtos inovadores (Kaul *et al.*, 2018). O uso de nanopartículas tem sido relatado como um benefício em diversas aplicações dermatológicas. Elas têm promovido ao produto cosmético maior penetração na pele, liberação sustentada de ingrediente ativo e possibilidade de funcionalização da superfície (Khezri *et al.*, 2018).

2.3 Nanoestruturas poliméricas

O uso de nanoestruturas poliméricas para encapsulamento de fármacos ou ingredientes ativos tem sido considerado como um grande avanço no preparo de formulações farmacêuticas e dermocosméticas (Beck *et al.*, 2011). Atualmente, os sistemas que possuem como base polímeros têm sido usados em liberação controlada de fármacos a fim de melhorar o tratamento de várias doenças, concentrando-se no direcionamento de drogas para um grupo alvo de células ou tecidos. Com essa estratégia pode-se reduzir a dose sistêmica e aumentar a quantidade de agente ativo que atinge o local de ação pretendido, minimizando os efeitos colaterais indesejados das drogas (Napier & Desimone, 2007). Um número de formulações poliméricas na forma de micelas, hidrogéis, nanoesferas e nanocápsulas foram estudadas como sistemas adequados para a entrega de agentes terapêuticos (Adhikari *et al.*, 2022; Demirci *et al.*, 2017; Gorshkov *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2018; Nave *et al.*, 2016; Pinho *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2018; Sumi *et al.*, 2008).

Os sistemas de administração de fármacos auxiliados por nanocarreadores poliméricos têm atraído interesse de pesquisa significativo. Isso se deve principalmente às suas propriedades notáveis como capacidade de funcionalização da superfície, propriedades biodegradáveis e biocompatíveis, liberação gradual do ativo e proteção, evitando assim, a degradação da substância de interesse (Dantas, K.C.F.; Rosário, J.d.S.; Silva-Caldeira, 2022).

As nanopartículas poliméricas podem ser nanocápsulas ou nanoesferas, nas quais os ingredientes ativos hidrofílicos ou lipofílicos estão aprisionados em um núcleo ou dispersos na matriz polimérica, respectivamente (Li *et al.*, 2017). Esses sistemas são comumente produzidos como uma suspensão coloidal que pode ser incorporada a pós ou géis para promover estabilidade

física aos ativos (Santos *et al.*, 2019), o que os torna muito interessante para uso em formulações cosméticas.

2.4 Uso de nanotecnologia em produtos cosméticos

O uso de nanotecnologia em produtos cosméticos gerou o termo nanocosmético, que é definido como qualquer formulação cosmética contendo nanopartículas (Commission *et al.*, 2010; União Europeia, 2009).

A indústria cosmética tem como base o uso de ingredientes ativos em suas formulações a fim de oferecer aos clientes benefícios com o uso de seus produtos. Tendo em vista a concorrência e a preocupação estética crescente, não somente os ativos são foco de interesse, mas também como entregá-los ao alvo, pele, por exemplo, de maneira mais eficaz (Oliveira *et al.*, 2022).

O uso de ativos em formulações cosméticas encontra algumas barreiras como baixas solubilidade, penetração e estabilidade dos ativos. Sendo assim, os carreadores oriundos da nanotecnologia (nanocarreadores) têm sido um caminho promissor para transpor essas dificuldades (Oliveira *et al.*, 2022), e algumas das vantagens são apresentadas na **Figura 2**.



Figura 2: Algumas vantagens do uso de nanocarreadores em cosméticos. Fonte: Autoria própria.

As pesquisas têm apontado para o fato que o tamanho de partículas do nanocarreador de 10 a 1000nm leva a formulações com propriedades físicas, químicas (solubilidade, cristalização, hidrofobicidade, estabilidade) e biológicas (afinidade, biodegradabilidade) distintas

das formulações comuns ou ditas tradicionais; propiciando uma maior biodisponibilidade e efeito terapêutico (S. Kumar et al., 2022; Raszewska-famielec, 2022). As reações adversas podem ser diminuídas com o uso, por exemplo, de menores doses que produzam os mesmos ou melhores resultados (Zhou *et al.*, 2021).

A eficiência das nanopartículas geradas pode ser avaliada através de alguns parâmetros (**Figura 3**), como a forma, tamanho, índice de polidispersão, potencial Zeta, eficiência de aprisionamento, comportamento de permeação, tempo de retenção na pele, conteúdo do ativo retido na nanopartícula, propriedades reológicas do veículo e pH do sistema (Santos *et al.*, 2019).

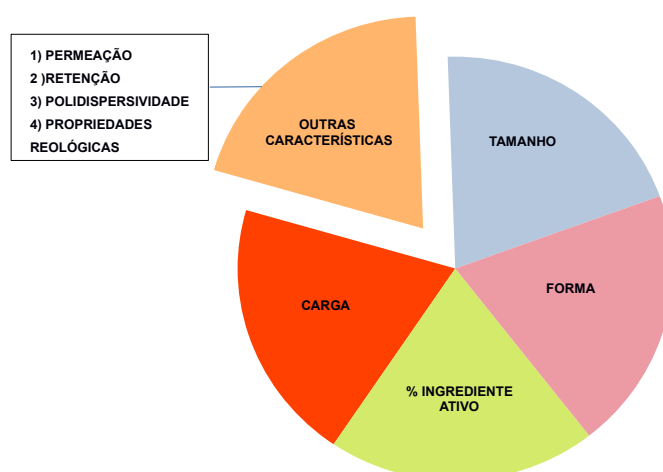


Figura 3: Características importantes das formulações cosméticas baseadas em nanotecnologia. Adaptada de Santos et al., 2019

Cada vez mais a indústria de cosmético tem se apoiado na nanotecnologia para obter melhor entrega e estabilidade dos ingredientes ativos (Fytianos *et al.*, 2020). Empresas como a L'Oréal S.A e Shiseido Company têm desenvolvido produtos com base na nanotecnologia e obtido patentes relacionadas (Fytianos *et al.*, 2020; Singh & Nanda, 2012).

2.5 Nanocosméticos *versus* nanocosmecêuticos

O significado legal de cosméticos em muitas nações é mais extenso do que as definições formais já citadas. Muitas vezes podem ser classificados apenas como produtos para embelezar, maquiar, iluminar, dentre outros (Gupta *et al.*, 2022). Mas outras definições que se referem a produtos cosméticos que contêm substâncias terapeuticamente ativas com resultados quantificáveis na pele e cabelos também é encontrada (Gupta *et al.*, 2022).

Nanocosmético pode ser definido como qualquer cosmético contendo nanopartículas e o termo surgiu com a nanotecnologia ganhando espaço na formulação de produtos de cuidados pessoais (Ajazzuddin *et al.*, 2015). As indústrias de cosméticos são o setor mais avançado na incorporação de nanopartículas em seus produtos.

Os nanocosméticos cresceram após a inserção da Linha Capture da Christian Dior, em 1986 e, posteriormente, através do Revitalift da L'Oréal, em 2005. Desde então a produção e uso de cosméticos que incorporam nanomateriais vem só crescendo. Entretanto, há preocupação com o fato de que o uso de nanocosméticos possa causar mais danos do que benefícios (Ajazzuddin *et al.*, 2015). Os termos nanocosméticos e nanocosmecêutico têm sido usado principalmente para se referir a produtos como protetores solares, hidratantes, produtos capilares, antimicrobianos, cremes antienvelhecimento e antirrugas (Dhapte-Pawar *et al.*, 2020). Pode-se observar que o uso dos termos muitas vezes é feito de forma indiscriminada, sem observância dos critérios anteriormente citados e por questões meramente comerciais.

Embora apresentem vários benefícios (**Figura 4**), nanocosméticos e nanocosmecêuticos possuem limitações relacionadas à estabilidade, escalabilidade, toxicidade e custo. Além disso, os perfis de segurança e toxicidade dos nanomateriais ainda estão em discussão. A biodisponibilidade de um ingrediente ativo é mais influenciada pela dosagem do que pelas propriedades físico-químicas da porção ativa, mas mesmo assim os produtos cosméticos com classificação nano levantam a preocupação de que possam aumentar a concentração de ingredientes ativos que chegam ao sangue e impactar a toxicidade, bem como a contaminação do meio ambiente (Souto *et al.*, 2020). Daí a importância de agências reguladoras como a FDA dos EUA, a Comissão Europeia e a ANVISA no Brasil, bem como a comunidade científica, estarem discutindo aspectos relativos à segurança, saúde e riscos ambientais associados aos nanocosmecêuticos (Dhapte-Pawar *et al.*, 2020).



Figura 4: Algumas vantagens e desvantagens do uso de nanocosmeceutícos. Adaptada de Gupta et al., 2022

Neste trabalho, o termo nanocosmeceutíco poderia ser utilizado, pois as nanopartículas deste trabalho carregam ativos que possuem a finalidade de promover melhora/tratamento de acnes, manchas, flacidez, dentre outros. Porém, como não pretendemos inicialmente mensurar e quantificar esses efeitos, e o termo ainda não ser aceito pela agência *Federal Food Drug and Cosmetic Act* (FD&C Act), o termo nanocosmético será mais apropriado. Além disso, não se tem como objetivo a permeação/penetração cutânea profunda e estudos biológicos não foram realizados. Outra razão é que as nanopartículas desenvolvidas neste trabalho possuem tamanho maiores que a faixa 1-100nm, associada geralmente ao termo nanocosmeceutíco (Dhapte-Pawar et al., 2020; Gupta et al., 2022).

2.6 Penetração/permeação de nanopartículas na pele

A pele possui diferentes camadas, sendo classificadas em estrato córneo, epiderme e derme. Além disso, a complexidade é maior quando se considera que a pele possui glândulas

sudoríparas, folículos capilares e vasos sanguíneos (Wertz, 2000). O estrato córneo é também chamado camada córnea, e é a principal barreira cutânea. Composta por células queratinizadas compactadas e com espaços entre as células que são ocupados por bicamadas heterogêneas de lipídios apolares (Wertz, 2000)

São três as rotas normalmente classificadas como principais formas de penetração de nanopartículas na pele: (a) intracelular ou transcelular, (b) intercelular e (c) apendicular, como ilustradas na **Figura 5**. A mais favorável para compostos lipofílicos é através de corneócitos, de forma intracelular (também denominado transcelular). A principal via para a maioria dos ingredientes ativos é através de espaços hidrofílicos em bicamadas lipídicas, ou seja, intercelular. Por fim, não menos importante, é a rota para o transporte iontoforético de moléculas carregadas e penetração de sistemas particulados via transporte apendicular da pele, pêlos e glândulas sudoríparas (transapêndice) (Cevc & Vierl, 2010; Pratibha & Barbara, 2014).

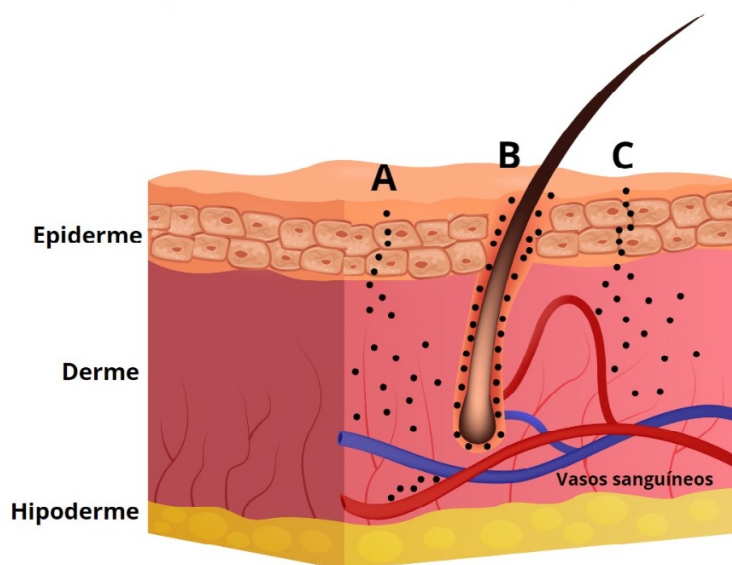


Figura 5: Representação das principais rotas de penetração de nanopartículas na pele: (A) intracelular, (B) transporte apendicular e (C) intercelular. Figura de própria autoria feita com o auxílio do programa online canva.com

A forma e a intensidade de penetração/permeação de nanopartículas na pele requer atenção redobrada, pois a pele é o maior órgão do corpo e tem diversas funções, como barreira contra o meio externo. Diferentes propriedades das nanopartículas, como tamanho, forma, revestimento e pureza, podem permitir que essa barreira seja permeada, e/ou penetrada, sendo então levantada a questão da toxicidade das nanopartículas. Estudos referentes ao grau de penetração, o caminho da permeação e a toxicidade não devem ser desconsiderados para cada nanopartícula desenvolvida (Alvarez-Román *et al.*, 2004; Khezri *et al.*, 2018).

Estudos têm apontado para o consenso de que nanopartículas menores que 20 nm podem penetrar ou permear a pele intacta (pele em condições saudáveis), entre 20 e 45 nm podem penetrar na pele danificada (com alguma alteração em sua fisiologia, equilíbrio) (Larese Filon *et al.*, 2015), e partículas maiores podem ser transportadas pela pele ou armazenadas nos apêndices da pele (Palmer & DeLouise, 2016). As nanopartículas têm se mostrado mais adequadas em penetrar eficientemente os folículos capilares, atingindo estruturas mais profundas e permanecendo armazenadas por mais tempo (uma diferença considerável comparada a substâncias não particuladas). O estrato córneo em geral não é um reservatório tópico tão eficaz pensando a longo prazo (para esse fim os folículos pilosos são muito melhores), já que as substâncias aplicadas topicamente se localizam principalmente na superfície da pele ou na camadas de células superiores, que sofrem descamação contínua (J. Lademann *et al.*, 2008; Juergen Lademann *et al.*, 2007; Weigmann *et al.*, 2001). O grau de penetração e permeação na pele depende não somente da natureza do ativo, mas também da formulação como um todo (veículo que transporta o ativo, interação da formulação com a pele (FÖRSTER *et al.*, 2009).

2.7 Polímeros

Polímero é um tipo de macromolécula formada pela união de moléculas simples (monômero) ligadas por ligação covalente. Essa macromolécula é composta por milhares de unidades de repetição denominadas meros. O polímero possui alta massa molar (acima de dez mil, podendo chegar a dez milhões), devido ao seu grau de polimerização, número de unidades de repetição da cadeia polimérica, que é normalmente acima de 750 (Canevarolo Jr., 2002)

Os polímeros constituem-se a classe mais versátil de biomateriais, pois podem ser sintetizados em diferentes composições com uma variedade de estruturas e propriedades que permitem aplicações específicas, tais como engenharia de tecidos, próteses, veículos farmacêuticos, dentre outros (Oréfice, R.; Pereira, M.; Mansur, 2012).

As estruturas poliméricas podem ser aliadas na administração oral ou tópica de princípios ativos e íons metálicos bioativos, melhorando a biodisponibilidade e aprimorando as dosagens, de modo a alcançar melhores resultados. De forma geral, os íons metálicos apresentam uma estreita relação entre faixa ótima de uso e toxicidade, e alguns apresentam baixa biodisponibilidade. Somado a isso, alguns princípios ativos interessantes para uso cosmético são aqueles que sofrem facilmente degradação. Dessa forma, aliar as estruturas poliméricas para carrear princípios ativos pode ser uma interessante estratégia para melhorar a biodisponibilidade e aprimorar as dosagens administradas de modo a alcançar maior eficiência. Neste trabalho três polímeros foram utilizados: pluronic® F-127 ou poloxamer (PLX), o alginato de sódio (SA) e a quitosana (CS).

2.7.1 Pluronic®

O pluronic®, também conhecido como poloxamer (PLX), é formado por copolímeros não iônicos e anfifílicos. Possui cadeia heterogênea (Canevarolo Jr., 2002), sendo constituídos por unidades repetitivas de poli(óxido de etileno) (PEO) e poli(óxido de propileno) (PPO), com forma geral $(\text{PEO})_x-(\text{PPO})_y-(\text{PEO})_x$ (Kabanov et al., 2002) (**Figura 6**).

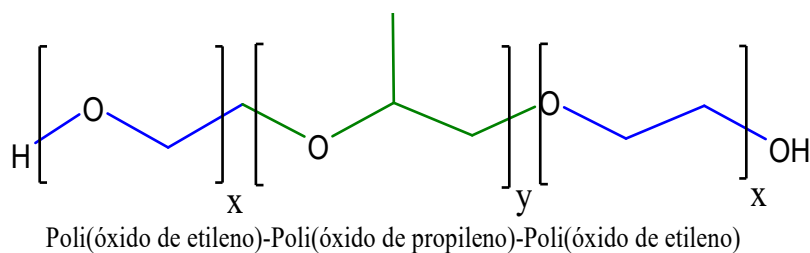


Figura 6: Representação da estrutura geral de um Pluronic®

As características físico-químicas desses copolímeros são favoráveis à solubilização de compostos lipofílicos e hidrofílicos, além de serem altamente estáveis, atóxicos e biocompatíveis (Kabanov et al., 2002). Em meio aquoso, os Pluronicos se auto associam em micelas, onde a corona é formada pelos grupos PEO hidrofílicos interagindo com moléculas de água, enquanto os grupos PPO hidrofóbicos permanecem no núcleo interno das micelas, sendo protegidos das moléculas de água (**Figura 7**). O core hidrofóbico é o principal responsável pela solubilização de compostos ativos lipossolúveis. Os plurônicos mais comumente usados e estudados são pluronic F68 (PF68) e F127 (PF127) (M. H. Lee et al., 2018).



Figura 7: Representação da interação das micelas formadas a partir de pluronicos com moléculas de água.

Fonte: Autoria própria.

O F127 $[(\text{PEO})_{100} - (\text{PPO})_{70} - (\text{PEO})_{100}]$ faz parte da classe dos Pluronicos e vem sendo muito utilizado para preparar formulações de diversos princípios ativos, como óleos essenciais

(Alexandridis et al., 1994; Wanka et al., 1994), com o objetivo de aumentar a eficiência de encapsulamento de ativos hidrossolúveis em NPs (Alam et al., 2024; Zhu et al., 2013), auxiliar na estabilização dos ativos em solução e melhorar a penetração desses através de barreiras biológicas (Kabanov et al., 2003). Embora pequenos fármacos hidrofílicos tenham partição fraca a moderada no PLX, automontagens de micelas plurônicas podem auxiliar esses fármacos a atingir alvos biológicos (Prasanthan & Kishore, 2021). Apesar de suas muitas vantagens, o PLX sozinho apresenta rápida desintegração em fluidos corporais e características mecânicas e bioadesivas que não favorecem uma liberação prolongada de fármacos (Khaliq et al., 2023). Revestimentos com PECs, como o de Quitosana-Alginato de sódio, pode ser uma alternativa para contornar essas limitações. Os PECs normalmente têm uma rede reticulada robusta, que garante a estabilidade mecânica das NPs (George & Abraham, 2006; X. Li et al., 2009), melhora a proteção dos fármacos encapsulados contra a degradação e permite a liberação controlada do fármaco (Hamed et al., 2019).

2.7.2 Alginato de sódio

O alginato é um polímero aniônico, produzido por algas e bactérias, e consiste em resíduos de ácido α -L gulurônico (G) e ácido β -D-manurônico (M), ligados por ligações 1,4-glicosídicas (Paques et al., 2014) (**Figura 8**).

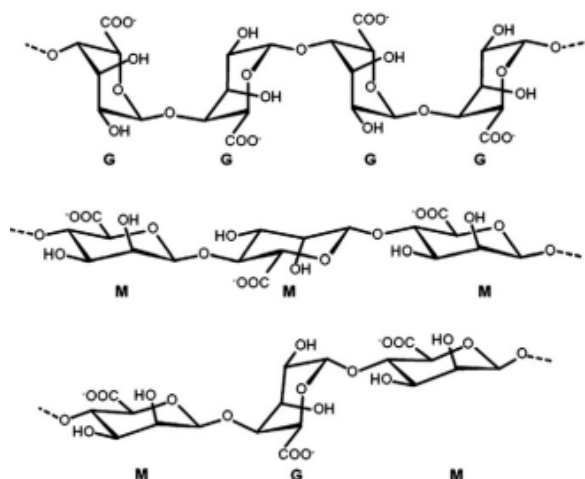


Figura 8: Estruturas químicas do bloco G, bloco M e do bloco alternado.

Fonte: Pawar & Edgar, 2012.

A sequência desses resíduos dependem da origem das algas utilizadas na extração do alginato e influencia as propriedades polímero. O alginato é atóxico, biodegradável, de baixo custo, facilmente disponível, mucoadesivo, biocompatível e não imunogênico. Além disso, o alginato pode

ser quimicamente modificado para alterar suas propriedades (Pawar & Edgar, 2012; Yang et al., 2011). O termo alginatos inclui o ácido e seus sais. De forma geal, os alginatos de metais alcalinos são solúveis em água, enquanto os dos metais pesados são insolúveis (Lesser, 1980).

As primeiras partículas de alginato para fins de encapsulamento foram desenvolvidas em 1980 (SUN, 1980) e desde então várias pesquisas, desenvolvimentos e aplicações têm sido feitas. O alginato pode ser gelificado com cátions multivalentes em condições suaves, tornando-o aplicável para o aprisionamento de materiais sensíveis (Paques et al., 2014). Neste trabalho o cátion testado para esse fim foi o Zn^{2+} .

O alginato de sódio (SA) pode ser caracterizado como um polissacarídeo coloidal hidrofílico, sendo um pó branco a branco amarelado(creme), amorfo, inodoro e sem gosto. O SA vem sendo amplamente utilizado como agente espessante, estabilizador de emulsão e meio gelificante na fabricação de medicamentos e cosméticos. É solúvel em água quente e fria, mas sua solubilidade em água é limitada pela viscosidade da solução resultante. Essa viscosidade depende de fatores característicos do alginato (grau de polimerização, composição) e da solução (concentração, temperatura, presença de substâncias como eletrólitos e materiais orgânicos) (Lesser, 1980).

Os hidrogéis de alginato podem ser preparados por processos químicos e/ou físicos de reticulação das cadeias poliméricas. As propriedades físico-químicas dos géis de alginato dependem do tipo de reticulação, densidade de reticulação, peso molecular e composição do alginato (Kuen Yong Lee, 2012). O método mais comum para a formação de géis de alginato é por reticulação iônica com cátions multivalentes. Este método pode ocorrer em condições suaves, tornando-o ideal para o aprisionamento de materiais sensíveis. A gelificação do alginato ocorre por uma troca de íons de sódio dos blocos de ácido gulurônico (G) com cátions multivalentes, e o empilhamento desses blocos G para formar uma estrutura característica de “caixa de ovo”. Uma proposta é que o íon zinco comporte-se como o cálcio, conforme **Figura 9** (Kuen Yong Lee, 2012; Poojari & Srivastava, 2013).

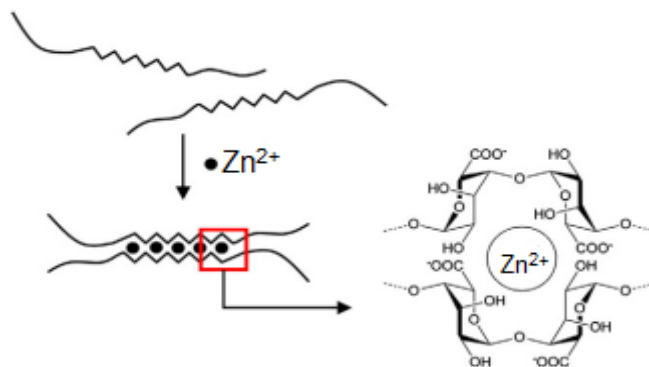


Figura 9: Formação de um gel de alginato por cátions de zinco, resultando em junções ligadas ao zinco do tipo “caixa de ovo”. Fonte: Adaptada de Paques et al., 2014.

2.7.3 Interação entre os polímeros alginato e pluronic

O alginato com grupos carboxila e hidroxila podem interagir com os grupos hidroxila de PLX via ligação de hidrogênio.(Rapee Khlibsuwan , Watcharee Khunkitti, 2020). Uma baixa taxa de encapsulamento usando apenas alginato e uma liberação rápida de ativos altamente solúveis em água foi citado em Lee et al. (1999). Concentrações crescentes de alginato (Ostberg et al., 1993) e agentes de reticulação (Ostberg & Graffner, 1994; Segale et al., 2015) pode melhorar essa taxa e retardar a liberação do ativo. Também vem sendo utilizado como alternativa a adição de substâncias que podem interagir com o alginato antes da reticulação. Polímeros solúveis em água, como amido de sódio glicolato, goma xantana, goma arábica e álcool polivinílico, bem como polímeros insolúveis em água, como a quitina e a celulose microcristalina, têm sido aplicados para esse fim.(Rapee Khlibsuwan, Watcharee Khunkitti, 2020). Além disso, surfactantes sintéticos, que possuem estruturas micelares, têm sido aplicadas para aumentar a propriedades mecânicas dos grânulos (Kaygusuz, 2016). Neste trabalho utilizamos o PLX 407, que além de atuar como agente de reticulação pode formar estruturas micelares. A partir de estudos físico-químicos das dispersões e filmes formados por SA-PLX, o modelo de interação de ambas as substâncias está ilustrado na **Figura 10**.

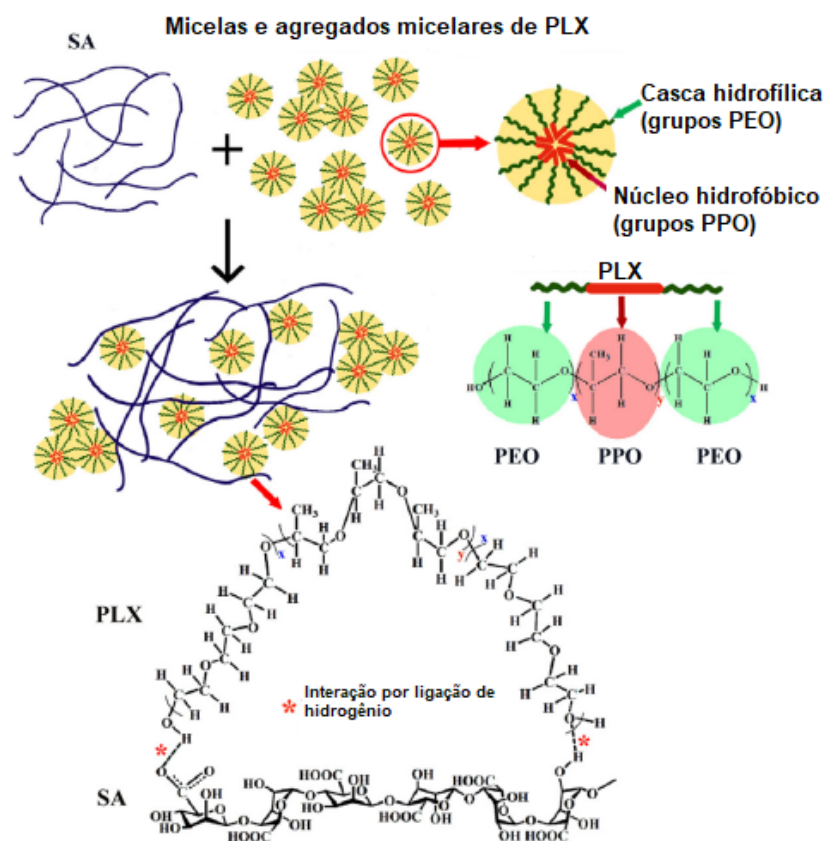


Figura 10: Representação da interação SA-PLX. Adaptada de Rapee Khlibsuwan , Watcharee Khunkitti, 2020

Rapee Khlibsuwan & Watcharee Khunkitti (2020) mostraram que a interação SA com PLX407 (pluronic F-127) foi mais forte quando comparada com a interação entre SA e PLX188(Pluronic F68). Além disso foi observado também que os grânulos de PLX com alginato de cálcio (CA) deram uma maior eficiência de aprisionamento do princípio ativo Clotrimazol(CZ) do que os grânulos de alginato de cálcio (CA) puro. Sendo então este sistema (alginato e PLX) um promissor para entrega de ativos.

Na literatura é citado também um preparo de grânulos PLX-CA carregados com um fármaco solúvel em água. Esse sistema foi preparado por reticulação com íons de cálcio, e as características e liberação da droga foram investigadas (Rabinarayan PARHI; Podilam SURESH, 2015).

O estudo do presente trabalho envolve o desenvolvimento de nanopartículas obtidas a partir do alginato de sódio (SA) e PLX 407 (Pluronic F127) como carreadores dos princípios ativos niacinamida (NA), ácido ascórbico (AA) e da solução de sulfato de zinco como reticulador e como fornecedor do íon bioativo Zn^{2+} .

2.7.4 Quitosana

A quitosana (CS) é um polímero natural derivado da quitina e tem inúmeras características, tais como, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, atividade antimicrobiana e baixo custo (Dash et al., 2011; Al-Khateeb, 2003). Pode-se observar a diferenças entre essas duas substâncias na **Figura 11**.

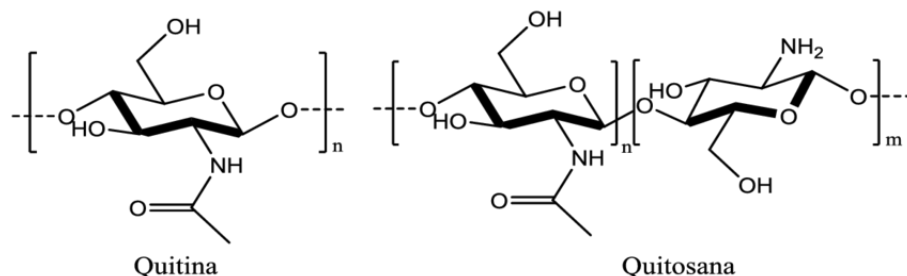


Figura 11: Representação da estrutura química da Quitina e da Quitosana (CS).

Fonte: Regattieri et al. (2016).

A quitosana tem grande potencial para aplicações na agricultura, em medicina, odontologia e formulações farmacêuticas (Al-Khateeb, 2003). As possibilidades de aplicações são ainda enriquecidas pelo fato que a quitosana pode ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas, microesferas e nanopartículas (Campana-Filho et al., 2007).

2.7.5 Formação de complexo polieletrólítico entre quitosana e alginato

Para construir um hidrogel estável, pode-se utilizar de estratégias não covalentes que aproveitam a eletro-forças estáticas hidrofóbicas e de ligação de hidrogênio entre cadeias poliméricas do polímero quitosana. Os hidrogéis podem ser separados em hidrogéis químicos e físicos, sendo que os hidrogéis químicos são formados por ligações covalentes irreversíveis e hidrogéis físicos são formados por várias ligações reversíveis como interações iônicas em complexos de polieletrólitos (PEC) (Berger et al., 2004). Os complexos polieletrólíticos (PECs) são obtidos pela mistura de soluções aquosas de dois polímeros com cargas opostas (Mi et al., 2002). Quando outro polímero é incluído, interações secundárias adicionais entre este polímero e a quitosana surgem e participam da formação do hidrogel como as fortes ligações de hidrogênio intermoleculares com o grupo PEO (Berger et al., 2004). A formação de PECs é principalmente devida à neutralização de carga por interações eletrostáticas entre sistemas poliânions-policátions, mas também devido possíveis interações induzidas pela atração de contra-íons multivalentes entre segmentos de polieletrólitos, ou seja, forças de Coulomb, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (Berger et al., 2004).

PEC à base de quitosana são produzidos com DNA, polissacarídeos aniônicos como alginato, glucosaminaglicanos, sulfato de condroitina, ácido hialurônico, heparina, carboximetilcelulose, pectina, sulfato de dextrana, xantana, proteínas como gelatina, albumina, fibroína, queratina e colágeno, e polímeros aniônicos sintéticos, como (ácido poliacrílico) (Dash et al., 2011). A estabilidade destes complexos depende da densidade de carga, solvente, força iônica, pH e temperatura (Tsuchida & Abe, 1982).

Uma solução aquosa de quitosana (polications) podem interagir pelo grupo amino com o grupo carboxila de uma solução aquosa de alginato de sódio (poliânions), como pode-se observar na ilustração da **Figura 12**. As interações iônicas são as principais interações dentro da rede de PECs, não sendo então necessários os agentes de reticulação (Becherán-marón et al., 2004; Dominika Kulig, Anna Zimoch-Korzycka, 2016).

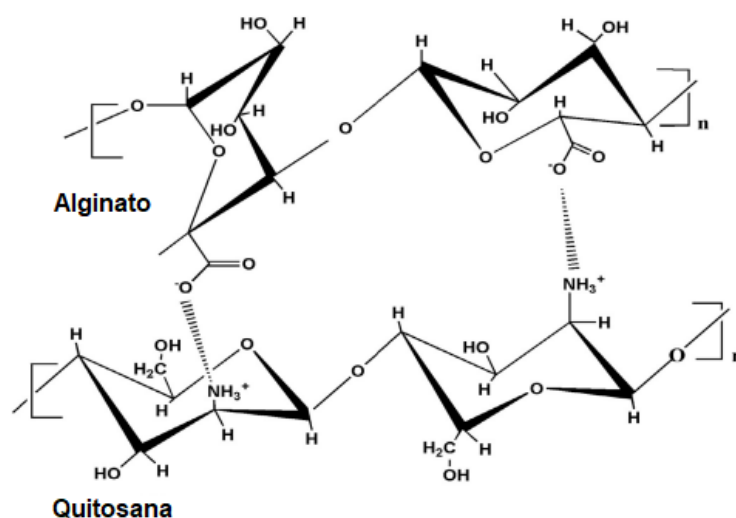


Figura 12: Ilustração esquemática das interações iônicas entre quitosana e alginato. Adaptada de (Wasupalli & Verma, 2018)

Há na literatura estudos e citações do uso combinados de quitosana e pluronic e relatos de uso conjunto dos três polímeros (alginato, pluronic e quitosana) apresentando vantagens para fins cosméticos (Fletcher & Krebs, 2018; M.A. Saleem, 2011).

O PEC quitosana-alginato tem capacidade de melhorar a resistência estrutural e a estabilidade mecânica, sendo usado na engenharia de tecidos na forma de andaimes, como suporte ao crescimento celular, membranas, fibras e microcápsulas (X. Li et al., 2009). Em baixas concentrações (~0,1% p/v), os PECs geralmente existem como nanopartículas (Wasupalli & Verma,

2018). Sua capacidade de ser um carreador de fármaco também tem sido estudada. A complexação de polieletrólitos sintetizadas por meio de gelificação ionotrópica tem sido relatada para produção de nanopartículas de quitosana-alginato para carrear fármacos/ativos de interesse (P. K. Gupta et al., 2015; Loquercio et al., 2015).

2.7.6 Modificações estruturais em polímeros

Modificações estruturais em polímeros a fim de aprimorar o direcionamento de nanopartículas às células tumorais tem sido relatadas na literatura. Há muitos estudos que empregam o pluronic modificado com o ácido fólico (FA) para direcionar as nanopartículas às células tumorais, tendo em vista que essas possuem mais receptores folato para manter a proliferação acelerada (El-Megharbel et al., 2021; Hao et al., 2017; Managa et al., 2018). Além disso, há patentes que descrevem a funcionalização de polímeros para serem empregados como carreadores de princípios ativos (WO2013075186A1, ES2726850T3, CN101862454B, BR 10 2023 018696 3, BR 10 2022 018405 4,). As modificações realizadas nos polímeros visam melhorar algumas propriedades mecânicas, tais como resistência à tração; ou propriedades físico-químicas, tais como solubilidade em água ou permitir que os polímeros modificados sejam responsivos à estímulos externos, tais como temperatura, pH e radiação. Entretanto, ressalta-se que são incomuns modificações químicas que visem conferir ao polímero propriedade antioxidante, permitindo-o proteger por mais tempo encapsulados da oxidação, como a apresentada neste trabalho.

2.8 Princípios ativos

2.8.1 Zinco

Cosméticos que contenham em sua formulação íons de zinco têm ganhado mercado pelo fato dos estudos apontarem para a multifunção do Zn^{2+} . Propriedades biológicas benéficas desse elemento têm sido apresentadas como vantagens para uso em produtos de cuidado com a pele. Cerca de 6% de todo zinco corporal está na pele, mas a concentração de zinco difere entre as camadas da mesma. A quantidade de zinco na derme (camada inferior) é estimada em um sexto da concentração na camada superior (epiderme) (Frydrych et al., 2004; Nitzan & Cohen, 2006).

O uso de cosméticos com zinco tem sido sustentado pelo fato interessante de que embora a concentração plasmática de zinco não altere significativamente com a idade, a concentração na pele diminui com o passar dos anos. O baixo teor de zinco na epiderme pode ser consequência de uma

redução da atividade enzimática local e, portanto, produtos cosméticos contendo esse ativo podem desempenhar um papel importante na prevenção do envelhecimento da pele (Abendrot & Kalinowska-Lis, 2018).

Os alimentos continuam sendo a principal fonte de zinco e a melhor forma de prevenir a deficiência é seguir uma dieta equilibrada. Entretanto, o Zn^{2+} vem sendo também administrado em vários tipos de suplementos alimentares e até em medicamentos. Sulfato, gluconato, acetato e asparagina de zinco podem ser administrados oralmente. Em cosméticos, uma maior variedade de compostos de zinco vem sendo usada e reflete as propriedades multifuncionais desse elemento, que dependem da natureza dos ânions ou agentes quelantes (Abendrot & Kalinowska-Lis, 2018).

Muita pesquisa ainda está sendo realizada para compreender os reais benefícios de se usar o zinco em produtos cosméticos. A maioria das características benéficas no cuidados com a pele depende de cada tipo de molécula (sal, complexo). Esse perfil de funcionalidade vem sendo estudado. A **Tabela 1** sumariza as principais funções que os compostos de zinco podem desempenhar (Abendrot & Kalinowska-Lis, 2018).

Tabela 1: Compostos de zinco e suas funções na pele.

Funcionalidades	Referências
Antioxidante	(M. Gupta et al., 2014; Prasad, 2014; Rostan et al., 2002)
Anti-inflamatório	(M. Gupta et al., 2014; Nitzan & Cohen, 2006; Prasad, 2014; Rostan et al., 2002)
Proteção solar	(M. Gupta et al., 2014; Kim et al., 2017; Smijs & Pavel, 2011)
Limpeza	(Frydrych et al., 2004)
Antimicrobiano	(Pasquet et al., 2014; Raghupathi et al., 2011)
Antiacne	(Bae & Park, 2016; Chan et al., 2017; Frydrych et al., 2004; M. Gupta et al., 2014)
Antienvelhecimento	(M. Gupta et al., 2014; Mahoney et al., 2009)
Antipigmentação	(Frydrych et al., 2004; M. Gupta et al., 2014)
Combate o odor	(Ballarin et al., 2015; Sharquie et al., 2013)

2.8.2 Niacinamida(vitamina B3)

A niacinamida (também conhecida como nicotinamida) e o ácido nicotínico (também conhecido como niacina) podem ser convertidos um no outro dentro do nosso organismo,

classificados como uma vitamina do complexo B, B3 (**Figura 13**). A niacinamida é comumente usada em cosméticos e foi observado em um estudo que tem boa taxa de penetração na pele, enquanto o ácido nicotínico apresenta maior dificuldade de atravessar a barreira epidérmica(Gehring, 2004).

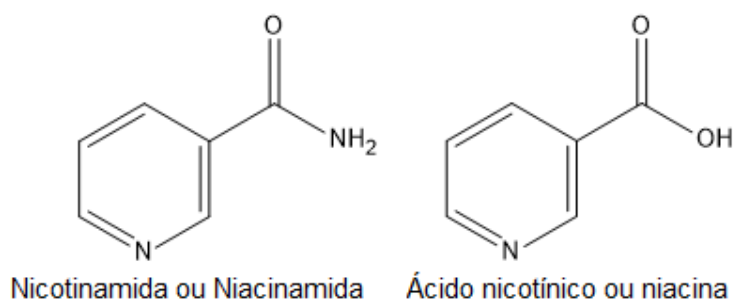


Figura 13: Representação da estrutura química da Niacinamida/Nicotinamida e do Ácido nicotínico/Niacina.

Vários ensaios clínicos vêm sendo conduzidos desde a década de 70, destacando a capacidade de penetração da niacinamida (NA) na pele, aumentando o interesse em conhecer mais os efeitos dessa substância (Nilforoushzadeh et al., 2018). A NA tem várias aplicações medicinais para a pele, como: ação antiinflamatória (Gehring, 2004), prevenção de fotoimunossupressão (Gensler, 1997), aumento da síntese lipídica intercelular (Shah et al., 2013) e propriedades clareadoras, inibindo a transferência de melanossoma de melanócitos para queratinócitos (Hakozaki et al., 2002).

As propriedades da niacinamida e seus efeitos tem sido verificados em importantes estudos (Gehring, 2004). Na pele com sinais de envelhecimento, a aplicação tópica de niacinamida melhora a estrutura da superfície, suaviza as rugas e inibe a fotocarcinogênese, sendo também preventivo desses desordens. Outros importantes efeitos da niacinamida e que vem sendo estudados é de sebo-supressor e antiinflamatório, que contribuem para o combate a acne. O efeito antiinflamatório tem feito a niacinamida ser indicada para combater a rosácea (uma irritação e vermelhidão comumente encontrada em pele sensíveis e secas) (Gehring, 2004).

A aplicação tópica de niacinamida é indicada para combater xerose de inverno, que se trata do que popularmente chamamos de pele seca, ressecada. A pele pode se tornar áspera e apresentar coceira, descamação e rachaduras. A niacinamida melhora a barreira epidérmica, reduzindo a perda

de água transepidérmica e um aumento na umidade da camada córnea (Gehring, 2004; O. Tanno et al., 2000; Osamu Tanno et al., 1998; Zackheim, 1975).

Um possível aumento da proliferação celular com o uso tópico da niacinamida contra psoríase foi observado. A psoríase é uma doença onde ocorre o acúmulo de células da pele formando escamas e manchas (Zackheim, 1975). Alguns estudos confirmaram uma suavização da estrutura da superfície da pele e uma redução na profundidade das rugas na pele facial de mulheres após 12 semanas de tratamento tópico com niacinamida (Gehring, 2004).

Em estudos de Hakoziaki *et al.* (2002) foi observada uma redução nos distúrbios de pigmentação e um clareamento significativo da hiperpigmentação. Além disso comparações entre um creme com fator de proteção solar 15 (com e sem 2% de NA), observou-se o clareamento da pele após 4 e 6 semanas para o grupo que recebeu a formulação com NA. Assim, os estudos têm embasado o uso da NA tópica como algo benéfico, propiciando o aumento da síntese de proteínas, queratina e ceramida; além de acelerar a diferenciação de queratinócitos, melhorando a estabilidade da barreira epidérmica e contribuindo para melhoria no teor de umidade da camada córnea (Gehring, 2004).

2.8.3 Ácido ascórbico (vitamina C)

O ácido L-ascórbico, também conhecido como vitamina C (AA), é uma substância de caráter hidrossolúvel que se encontra presente em frutas, vegetais e na pele. Trata-se do antioxidante de maior teor na pele (DALCIN *et al.*, 2003; Keller & Fenske, 1998). AA é amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Como aditivo alimentar, o AA protege as características sensoriais e nutricionais dos alimentos (Varvara et al., 2016; Yin et al., 2022). Como fármaco, o AA é usado no tratamento de metemoglobinemia, como um adjuvante para absorção gastrointestinal de ferro, cálcio e ácido fólico, melhorando a imunidade em pacientes imunossuprimidos e outras funções (Amanda C. Caritá et al., 2019; Bos, 2019). Em cosméticos a presença de AA em produtos para aplicação tópica demonstrou efeitos benéficos na cicatrização de feridas, fotoproteção UV, combate ao fotoenvelhecimento, inibição da melanogênese e ação antioxidante (Jing-yi Lin et al., 2003; Nusgens et al., 2003; Pullar et al., 2017). O AA também estabiliza a vitamina E, que protege as membranas celulares de radicais livres, evitando a formação de outros radicais. Quando a vitamina E começa a se oxidar e a perder sua atividade, a vitamina C atua estabilizando-a. Embora o AA seja amplamente utilizado em produtos comerciais, sua instabilidade química em uma solução é um fator limitante ao uso (Yin et al., 2022).

Um dos maiores problemas quanto ao uso de ácido ascórbico em cosméticos tem sido a baixa estabilidade da vitamina C em soluções aquosas. Muitas vezes, derivados do AA têm sido usados por apresentarem maior estabilidade (DALCIN *et al.*, 2003). O AA apresenta instabilidade físico-química quando exposto a luz, a altas temperaturas, ao oxigênio e à altos valores de pH (Gallarate *et al.*, 1999; Semenzato & Bettero, 1997).

O AA em solução aquosa e na forma não ionizada, penetra facilmente na pele e se acumula. Para não se ionizar é necessária que a solução tenha pH abaixo do primeiro pKa de ionização que é 4,2. Nessa condição (não ionizada, solução aquosa e pH abaixo de 4,2) até 15% do ácido ascórbico penetra na pele (Fitzpatrick & Rostan, 2002). A **Figura 14** ilustra as estruturas químicas da vitamina C a depender o pH da solução. Em solução aquosa neutra, o ácido ascórbico sofre uma desprotonação, estando presente como ascorbato (HAA^-).

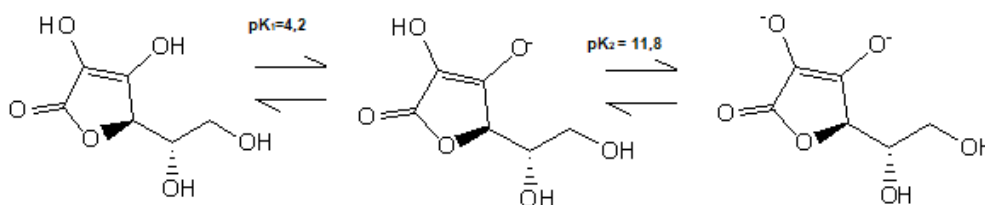


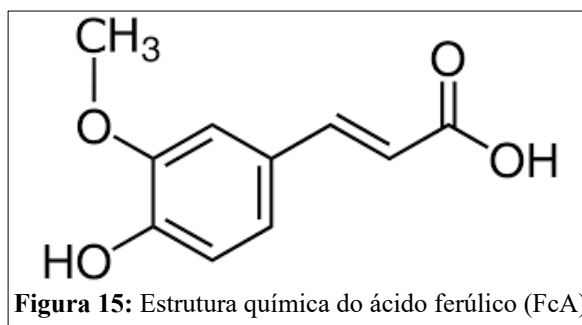
Figura 14: Estruturas químicas presentes na ionização do ácido ascórbico em água.
Fonte Fitzpatrick & Rostan, 2002

Os micro e nanossistemas poliméricos são interessantes para encapsular AA, porque suas matrizes apresentam farmacocinética favorável, propriedades biocompatíveis e biodegradáveis desejáveis, adaptabilidade composicional e outras características vantajosas (Dantas,K.C.F.;Rosário, J.d.S.; Silva-Caldeira, 2022). Além disso, os sistemas poliméricos apresentam estabilidade, baixo custo e propriedades responsivas a estímulos (S. Kumar et al., 2022). Entretanto, encapsular AA em nano e micropartículas poliméricas é complexo devido principalmente à sua rápida degradação em solução e sua alta solubilidade em água. A baixa estabilidade química do AA em solução requer condições especiais para seu encapsulamento. Assim, o processo precisa ser rápido e protegido contra luz (Cheow & Hadinoto, 2010). O encapsulamento de AA em dispositivos poliméricos é complexo devido às fortes interações intermoleculares do composto com a água, tornando desafiador precipitá-lo com as cadeias poliméricas para formar nano e micropartícula (Cheow & Hadinoto, 2010).

Determinar a eficiência de encapsulamento (EE) de AA também apresenta desafios significativos, visto que o AA é instável em solução e métodos precisos para determiná-lo em dispositivos poliméricos requerem condições que garantam sua estabilidade máxima.

2.8.4 Ácido ferúlico

O ácido ferúlico (FcA) é um ácido orgânico (**Figura 15**) presente em plantas, na maior parte reticulado com lignina e polissacarídeo, formando parte da parede celular vegetal (D. Li et al., 2021). Possui grande potencial antioxidante, anti-inflamatório e anti-fibrose, atuando como protetor endotelial vascular. Assim, tem sido amplamente incorporado em formulações cosméticas devido suas funções biológicas como agente fotoprotetor, antienvelhecimento e clareador (Oliveira, *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022). Além disso, o ácido ferúlico pode atuar como estabilizante da vitamina C (F. Lin et al., 2005).



As propriedades antioxidantes do FcA tem sido amplamente exploradas (Ghatak & Panchal, 2010; Itagaki et al., 2009; Staniforth et al., 2012), e seu poder fotoprotetor tem sido promissor (Bai et al., 2019). Porém, o FcA apresenta baixa biodisponibilidade, baixa solubilidade e permeabilidade, o que limita sua aplicação em cosméticos e na área biomédica (N. Kumar & Goel, 2019; Saija et al., 2000). Vários esforços foram feitos para aumentar a estabilidade e a biodisponibilidade do FcA e promover sua entrega através da barreira da pele (G. Li et al., 2022; Telange et al., 2021). Sendo assim, é necessário desenvolver métodos e carreadores para melhorar a penetração do FcA na pele.

O FcA na forma não ionizada tem mais probabilidade de penetrar na pele do que a forma ionizada, dessa forma, uma formulação com pH abaixo de 6 é importante para garantir que o FcA exista na forma não ionizada (Bai et al., 2019). A literatura apresenta alguns estudos em que o FcA foi encapsulado em nanopartículas poliméricas (G. Li et al., 2022; Panwar et al., 2016), mas não foram encontrados relatos descrevendo a conjugação covalente do FcA à polímeros.

2.9 Cinética de liberação de ativos *in vitro*

Os testes *in vitro* de liberação acumulada de ativos é uma ferramenta importante no desenvolvimento de nanopartículas e nanoformulações e está presente na farmacopeia americana desde 1969, sendo amplamente utilizado para a determinação da cinética de liberação de ativos a partir de formulações que possuem a capacidade de controlar a liberação e distribuição de ativos

(Bezerra et al., 2016; Jain et al., 2015; Lobo & Costa, 2001). O método de liberação por meio de uma membrana de diálise é uma técnica bem estabelecida e útil para estudar liberação *in vitro* de sistemas de administração de ativos em nanopartículas; por rompimento de NPs seguida de análise do ativo liberado (Ozgur Esim, Sevinc Kurbanoglu, Sibel A. Ozkan, 2018).

Existem diferentes modelos matemáticos utilizados para a determinação da cinética de liberação controlada, dentre os mais conhecidos pode-se citar: Modelo de ordem zero, modelo de primeira ordem, modelo de Higushi e o modelo de Krosmeier-Peppas. O modelo de ordem zero (Eq. 1) representa uma dissolução gradual a partir de uma matriz que não desagrega. O modelo de primeira ordem (Eq. 2 e Eq. 3) representa a difusão da solução para o interior da matriz, a dissolução e a saída do fármaco para o meio. O modelo de Higushi (Eq. 4) foi criado para determinar a liberação de fármacos dispersos em sólidos e semissólidos, a liberação é calculada por unidade de área e descreve a liberação como difusão com base na lei de Fick. Por último, o modelo de Krosmeier-Peppas (Eq. 5 e Eq. 6), também conhecido como Lei das Potências, considera as características estruturais e geométricas do sistema polimérico. O modelo de Krosmeier-Peppas é utilizado quando a formulação ainda não é documentada ou quando se quer saber uma característica específica associada à cinética de liberação. Entretanto, este modelo é usualmente aplicado para valores de liberação acumulada de até 60% (Jain et al., 2015; Lobo & Costa, 2001).

(Eq. 1)

$$Q=Q_0+Kt$$

$$\log Q_t=\log Q_o-\frac{kt}{2,303} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\ln Q_t=\ln Q_o-kt \quad (\text{Eq. 3})$$

$$Q=K_H t^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$f_t=at^n \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\log f_t=\log a+n\log t \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde: Q_t é a quantidade liberada no tempo t ; Q_0 é a quantidade liberada no tempo 0, K é a constante de proporcionalidade; k é a constante de 1º ordem; K_H é a constante de dissolução de Higushi; e a é a constante de Krosmeier-Peppas que incorpora as características estruturais e geométricas da amostra; f_t é a fração liberada de ativo na solução; n corresponde ao expoente que indica o

mecanismo de liberação, conforme **Tabela 2** (Costa e Souza lobo, 2001; Jayanudin et al., 2016; Siepmann e Peppas, 2012; Ahmed et al., 2019).

Tabela 2: Mecanismos de liberação a partir de estruturas poliméricas

Expoente de difusão (n)			Mecanismos de liberação	Tipo de transporte
Filmes Finos	Cilindro	Esfera		
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana	Caso I
$0,5 < n < 1$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Difusão Não-Fickiana	Transporte anômalo
1	0,89	0,85	Ordem Zero	Caso II
>1	$> 0,89$	$> 0,85$	-----	Super caso II

Fonte: Adaptada de Ahmed et al., 2019; Lobo & Costa, 2001 and Siepmann & Peppas, 2012).

Apesar da liberação de fármacos/ativos a partir de sistemas poliméricos ser complexa, alguns modelos são usados para a análise da liberação das substâncias a partir destes sistemas (Bezerra et al., 2016; Jain et al., 2015; Lobo & Costa, 2001). Os modelos matemáticos servem para compreensão do processo de liberação e contribuem para o desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada, pois elucidam os aspectos da cinética envolvendo os sistemas de liberação de ativos (Siepmann & Peppas, 2012). Com esses modelos pode-se entender melhor os sistemas poliméricos desenvolvidos e descritos nessa tese.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver sistemas poliméricos biocompatíveis e biodegradáveis que atuem como nanocarreadores de princípios ativos para serem incorporados em produtos de cuidado com a pele.

3.2 Objetivos Específicos

- ▶ Desenvolver e caracterizar nanopartículas constituídas pelos polímeros alginato e PLX para carrear os princípios ativos zinco, niacinamida e ácido ascórbico.
- ▶ Desenvolver e caracterizar nanopartículas constituídas pelos polímeros PLX e recobertos por complexo polieletrólítico formado pelos polímeros quitosana e SA para carrear o princípio ativo AA.
- ▶ Desenvolver método de quantificação de AA nas nanopartículas, levando em consideração sua rápida degradação em solução.
- ▶ Estudar a cinética de liberação de ativos a partir dos sistemas poliméricos desenvolvidos
- ▶ Realizar modificação estrutural no PLX agregando à sua estrutura do FcA, um agente antioxidante.

4 MATERIAIS

Os reagentes utilizados no presente trabalho não passaram por processo de purificação prévia. A **Tabela 3** apresenta informações sobre reagentes e solventes utilizados nesse trabalho.

4.1 Reagentes e solventes

Tabela 3: Algumas propriedades e dados de reagentes e solventes utilizados

Nome do reagente ou solvente	Fórmula química	MM (g mol ⁻¹)	Marca
Acetato de zinco diidratado	C ₄ H ₁₀ O ₆ Zn	219,50	Ecibra
Acetona	C ₃ H ₆ O	58,08	Quimex
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	60,05	Cinética
Ácido Ascórbico (AA)	C ₆ H ₈ O ₆	176,12	Beckman
Ácido ferúlico (FcA)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	Sigma Aldrich
Alginato de sódio (SA)	(C ₁₄ H ₂₁ O ₁₃ Na) _n	120000-190000	Êxodo Científica
Cloreto férrico	FeCl ₃	162,20	Êxodo Científica
Cloreto de sódio	NaCl	58,44	F.Maia
Cloreto de zinco	ZnCl ₂	136,29	F.Maia
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,07	MH ₃ Industrial
Fosfato de potássio monobásico anidro	KH ₂ PO ₄	136,09	Êxodo
Fosfato de sódio bibásico dodecaidratado	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	358,14	Synth
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	238,30	Êxodo científica
Niacinamida (NA)	C ₆ H ₆ N ₂ O	122,12	Sigma
Orto-fenantrolina	C ₁₂ H ₈ N ₂	180,21	Êxodo científica

Pluronic F127 /Poloxamer 407 (PLX)	$[(C_2H_4O)_{100}(C_3H_6O)_{65}(C_2H_4O)_{100}]$	~12600	Sigma-Aldrich
Quitosana	$(C_6H_{11}NO_4)_n$	~8.303-31.550	Sigma-Aldrich
Sulfato de zinco heptaidratado	$H_{14}O_{11}SZn$	287,55	Labsynth

4.2 Métodos de análise

4.2.1 Análise Elementar- CHN

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas no Departamento de Química da UFMG. A dosagem dos compostos preparados foi realizada no equipamento Perkin Elmer - modelo 2400.

4.2.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na região de 4000 a 400 cm^{-1} em um Espectrômetro IR Prestige 21 Shimadzu com ATR no CEFET Campus VI. Os espectros foram obtidos em temperatura ambiente.

4.2.3 Espectroscopia Eletrônica na Região do Ultravioleta-visível

As absorvidades e os espectros de absorção na região do Ultravioleta-visível foram obtidos na região de 200 a 800 cm^{-1} em um Espectrômetro de marca KASVI, modelo K37-UVVis no CEFET Campus VI. Os espectros foram obtidos em temperatura ambiente.

4.2.4 Termogravimetria

As medidas de variação massa em função da temperatura foram realizadas utilizando uma termobalança Shimadzu DTG-60H presente no CEFET Campus VI. As análises foram realizadas utilizando-se um fluxo de 50 mL/min de ar sintético, numa razão de aquecimento de 10° C min^{-1} na faixa de temperatura de 29° C a 900° C.

4.2.5 Espectroscopia de Absorção Atômica

Os teores de zinco foram obtidos medindo uma massa de 5 mg de amostra, dissolvendo-a em 10 mL de HNO₃ 70% e enviando as soluções para serem analisadas com o auxílio do espectrofotômetro de absorção atômica Hitachi - modelo Z8200 no Departamento de Química da UFMG.

4.2.6 Análise Condutimétrica

A condutividade molar do complexo foi obtida com o auxílio de um condutivímetro da marca Digimed DM-32 usando uma constante de célula de 0,80 cm⁻¹. Foi preparada uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ do complexo em DMSO ($\Lambda_M = 3,06 \mu\text{S}/\text{cm}$). As análises foram realizadas após a calibração do equipamento com solução de padrão condutimétrico a temperatura ambiente.

4.2.7 Análise de temperatura de fusão

A temperatura de fusão do complexo foi obtida com o auxílio de um medidor de ponto de fusão da marca Marte modelo PFIII. A análise foi realizada com o complexo no estado sólido, inserido em um capilar de vidro, à temperatura ambiente.

4.2.8 Análise de tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta

O tamanho de partícula médio (Dm), o índice de polidispersividade (PdI) e o potencial Zeta (ZP) da suspensão de NPs foram determinados utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Advanced Pro. Análise direta de 1 mL de amostras de suspensão em solução foi realizada para medição de tamanho e PdI, diluição de 100x para potencial Zeta. As amostras foram adicionadas em cubetas descartáveis de poliestireno e irradiadas com laser de luz vermelha ($\lambda = 633$ nm), sendo todas as medições realizadas a 25°C, com detecção de retroespalhamento em um ângulo de espalhamento de 173°. O índice de refração e a viscosidade da água pura a 25°C foram utilizados nos cálculos como parâmetros constantes. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

4.3 Instrumentos e Equipamentos

Tabela 4: Alguns dados de equipamentos utilizados

Equipamento/instrumento	Marca e modelo
Analizador de tamanho de partícula e potencial Zeta	Malvern, ZTS1240Malvernssizer
Balança analítica	Shimadzu, ATX 224
Centrífuga	Novatecnica, NT810
Conduvímetero	Digimed DM-32 e Satra
Espectrofotômetro	Shimadzu UV-2600i
Estufa	Limatec, LT 502/200
Fotômetro	Mapada, V-11000
Lavadora ultrassônica	Shuster, L-100
Liofilizador	Labconco, Freezone 2.5
pHmetro	Marte científica - OneSense
Ponto de fusão	Marte PFIII e Fisatom 433
Titulador automático	Schott titronic
Ultracentrífuga	Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R
Ultrahomogeneizador	IKA T25 digital Ultra Turrax

**CAPÍTULO 5 - PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
ALGINATO DE SÓDIO E POLOXAMER 407 PELO MÉTODO DE GELIFICAÇÃO
IONOTRÓPICA CARREGADAS COM OS ATIVOS NIACINAMIDA E ÁCIDO
ASCÓRBICO LIVRES E COMPLEXADOS AO ZINCO**

5.1 Parte experimental

5.1.1 Determinação da melhor proporção SA-PLX

A fim de encontrar a melhor proporção SA-PLX, nanopartículas desses polímeros em diferentes proporções (**Tabela 5**) foram preparadas por gelificação ionotrópica à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$), usando íons de zinco como agente reticulador. O método de preparo de nanopartículas empregado neste trabalho foi modificado da literatura (Duarah et al., 2017; Pistone et al., 2015). As soluções SA (1 mg mL^{-1}) e PLX (1 mg mL^{-1}) foram preparadas separadamente usando como solvente solução de NaCl $0,05 \text{ M}$ em água ultrapura. Estes sistemas foram agitados durante toda a noite (~ 12 horas) à temperatura ambiente para dissolução completa dos polímeros. No dia seguinte a solução de sulfato de zinco heptaidratado ($0,76 \text{ mg mL}^{-1}$ de Zn^{2+}) foi preparada. Usamos a letra A para indicar os sistemas oriundos desse procedimento. Cinco diferentes formulações foram preparadas conforme descrito nas **Tabelas 5 e 6**.

Tabela 5: Planejamento para obtenção das nanopartículas.

NPs	SA (mg)	PLX (mg)	SA:PLX	Zn:SA
1A	40	0	1:0	0,38
2A	40	10	1:0,25	0,38
3A	40	20	1:0,5	0,38
4A	40	30	1:0,75	0,38
5A	40	40	1:1	0,38

Tabela 6: Volumes (mL) das soluções para obtenção das nanopartículas

NPs	Solução de SA 1 mg mL^{-1} (mL)	Solução de PLX 1 mg mL^{-1} (mL)	Solução de NaCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (mL)	Solução de Zn $0,76 \text{ mg mL}^{-1}$ (mL)
1A	40	0	40	20
2A	40	10	30	20
3A	40	20	20	20
4A	40	30	10	20
5A	40	40	0	20

Conforme esquematizado na **Figura 16**, 40 mL de solução de SA foram adicionados ao volume correspondente de PLX (**Tabela 5**). A mistura resultante permaneceu em agitação magnética por 15 min. O volume final dos sistemas 1 a 5 foi completado para 80 mL com adição de solução de NaCl 0,05 M. Em seguida, com o auxílio de um titulador automático foram adicionados 20 mL de solução de zinco (fluxo 5 mL min⁻¹) a uma altura de 8cm em cada sistema sob agitação magnética constante (barra de agitação cilíndrica 7mmx30mm, 700 rpm) dentro de um becker de 250 mL (7 cm de diâmetro). Após o processo de reticulação, as amostras foram agitadas por mais dez minutos. Com auxílio de um pHmetro, os valores de pH dos sistemas preparados foram mensurados antes e após o processo de reticulação com íon zinco. As soluções foram armazenadas em geladeira até o dia seguinte.

No dia seguinte cerca de 30 mL das amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm para remoção de possíveis aglomerados e o sobrenadante ultracentrifugado (13.000 rpm, 20 min) para recuperação das nanopartículas. Não houve formação de *pellet* visível após a ultracentrifugação. Sendo assim, com auxílio de pipetas, o sobrenadante foi retirado até que um volume de 3 mL de cada amostra ficasse ao fundo e esse volume foi levado para liofilização.



Figura 16: Esquema do procedimento para obtenção de nanopartículas de alginato e pluronic pelo método de gelificação ionotrópica com íons zinco.

As amostras centrifugadas e as amostras liofilizadas foram armazenadas em geladeira e foram caracterizadas por tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta.

O pH após reticulação foi levemente menor, o que se explica pelo fato de ter sido adicionada solução de sulfato de zinco, que possui caráter levemente ácido. Os produtos liofilizados obtidos apresentaram aspecto de algodão e coloração branca.

Soluções contendo as nanopartículas produzidas foram submetidas à avaliação do tamanho de partícula, índice de polidispersividade (PDI) e potencial Zeta (ZP). As leituras de cada parâmetro para cada amostra foram conduzidas em triplicatas. A média dos valores juntamente, com os respectivos desvios padrões seguem descritos na **Tabela 7**.

Tabela 7: Tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta das nanopartículas do teste para determinação da melhor proporção de alginato e pluronic

Amostra	Dm(nm)*	PdI	ZP(mV)
1A	309± 3	0,38± 0,02	-18±1
2A	306± 14	0,35± 0,02	-17±3
3A	317± 10	0,38±0,05	-16±1
4A	319±5	0,44±0,01	-16±2
5A	325±8	0,36±0,01	-17±1

Observação: * todas as amostras apresentaram como maior população de nanopartículas o valor >92% do total.

A partir dos dados apresentados na **Tabela 7**, conclui-se que não houve diferenças significativas em relação as diferentes proporções de SA:PLX. Sendo assim a proporção mediana, representada pela amostra 3A(SA:PLX 2:1), foi escolhida para o preparo das NPs.

5.1.2 Preparo das nanopartículas com incorporação dos ativos

Procedimento de preparo similar ao descrito na seção 5.1.1 foi realizado. Porém, além das soluções de polímero e zinco, foram preparadas soluções dos ativos NA (2mg mL^{-1}), AA (2 mg mL^{-1}) e complexo $[\text{Zn}(\text{NA})_2(\text{HAA})_2]$ (2mg mL^{-1}) usando solução de NaCl 0,05 M como solvente. A síntese e caracterização do complexo inédito encontram-se no **Apêndice 1**. As soluções de SA, PLX, NaCl e sulfato de zinco foram filtradas com papel de filtro quantitativo faixa azul $2\text{ }\mu\text{m}$ para remoção de quaisquer impurezas ou partículas grandes ($> 2\mu\text{m}$). Nove diferentes formulações com volume total de 100 mL foram preparadas segundo a proporção escolhida de SA:PLX=2:1 (**Tabelas 8 e 9**).

Tabela 8: Planejamento para obtenção das nanopartículas.

NPs	SA (mg)	PLX (mg)	NA (mg)	AA (mg)	Complexo	Zn (mg)	Zn:S A
					[Zn(NA) ₂ (HAA) ₂] (mg)		
1B	40	20	0	0	0	15,2	0,38
2B	40	20	10	0	0	15,2	0,38
3B	40	20	20	0	0	15,2	0,38
4B	40	20	0	10	0	15,2	0,38
5B	40	20	0	20	0	15,2	0,38
6B	40	20	10	10	0	15,2	0,38
7B	40	20	20	20	0	15,2	0,38
8B	40	20	0	0	10	15,2	0,38
9B	40	20	0	0	20	15,2	0,38

Tabela 9: Volumes (mL) das soluções para obtenção das nanopartículas.

NPs	Solução SA(mL)	Solução de PLX(mL)	Solução de NaCl(mL)	Solução de NA(mL)	Solução AA (mL)	Solução do complexo (mL)	Solução de Zn na reticulação(mL)
1B	40	20	20	0	0	0	20
2B	40	20	15	5	0	0	20
3B	40	20	10	10	0	0	20
4B	40	20	15	0	5	0	20
5B	40	20	10	0	10	0	20
6B	40	20	10	5	5	0	20
7B	40	20	0	10	10	0	20
8B	40	20	15	0	0	5	20
9B	40	20	10	0	0	10	20

5.1.2.1 Preparo das amostras para caracterização das nanopartículas

Parte das amostras liofilizadas foram encaminhadas para análise de infravermelho. Outra parte foi ressuspensa em água ultrapura (cerca de 2mL) e encaminhadas para análise do tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta (ZP).

5.1.2.2 Determinação da eficiência de encapsulamento (EE) dos ativos nas nanopartículas

A EE de cada ativo nas NPs foi determinada pela dosagem dos ativos livres no sobrenadante, após o processo de ultracentrifugação, por espectroscopia eletrônica. Para isso, curvas padrão do AA, NA e do complexo foram construídas.

Soluções de AA, NA e do complexo com concentrações conhecidas foram preparadas em solução de NaCl 0,05mol/L. Varreduras na faixa de 200-800nm no espectrofotômetro UV-Vis foram realizadas a fim de determinar qual ou quais comprimentos de ondas seriam considerados para construção das curvas de calibração. As equações de regressão foram construídas utilizando os softwares Origin e Excel.

As quantidades dos ativos nos sobrenadantes foram calculadas segundo as equações de regressão de cada curva de calibração obtidas. As quantidades dos ativos nas NPs foram calculadas pela diferença entre a quantidade total adicionada e a quantidade encontrada no sobrenadante.

Para determinação do teor de zinco, também foi empregada uma determinação indireta. Os sobrenadantes do processo de ultracentrifugação foram encaminhados para análise do teor de zinco por absorção atômica.

5.1.2.3 Estudo de liberação cumulativa *in vitro* dos ativos a partir das nanopartículas

A liberação cumulativa *in vitro* dos ativos a partir das nanopartículas foi avaliada utilizando saco de diálise. Quantidades das NPs da formulação 7B (carregadas com AA e NA) foram pesadas com precisão (6 mg) e colocadas em um saco de diálise de celulose (7 cm de comprimento, 5,5 cm de largura, peso molecular de corte de 1 kDa), hermeticamente fechado e colocado no frasco receptor contendo 50mL do meio de liberação (tampão fosfato de potássio e fosfato de sódio, pH 5,5). Os frascos foram colocados na incubadora agitadora orbital termostática (Limatec, Brasil) a 37 ± 2 °C e velocidade de 75 rpm. Em intervalos periódicos, alíquotas de 2 mL do meio de liberação foram retiradas e o volume extraído do meio foi substituído pela solução tampão fosfato pH 5,5 para manter o volume de 50 mL de tampão durante todo experimento. As quantidades de AA e NA liberadas em cada intervalo de tempo foram estimadas medindo-se a absorvância da amostra a 212

nm para o ativo NA e 264 nm para o ativo AA. Anteriormente, foram construídas curvas de calibração para AA e NA em tampão fosfato pH 5,5. A percentagem cumulativa média de liberação de AA e NA foi traçada em função do tempo para estudar a cinética de liberação.

5.1.2.4 Cinética de liberação *in vitro* de AA

Para avaliar os mecanismos de cinética de liberação de AA e NA das NPs e os dados da liberação cumulativa *in vitro* dos ativos a partir das nanopartículas foram ajustados a quatro modelos cinéticos distintos: ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Modelos Korsmeyer-Peppas.

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Caracterização dos sistemas obtidos

O pH após reticulação foi levemente menor ou igual ao pH antes do processo de reticulação. A presença do AA nos sistemas 4B, 5B, 6B e 7B conferiu aos sistemas meio mais ácido, com valores de pH entre 4 e 6. Os valores de pH encontrados para todos os sistemas encontram-se entre 4 e 7, valores adequados para uso na pele (Lukic, M.; Pantelic & Savic, 2021). Os produtos liofilizados obtidos apresentaram aspecto de algodão e coloração branca.

5.2.2 Caracterização das nanopartículas obtidas

5.2.2.1 Tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta

As suspensões das NPs foram analisadas quanto a tamanho de partícula, PDI e PZ. As leituras de cada parâmetro para cada amostra foram feitas em triplicatas. A média dos valores, juntamente com os respectivos desvios padrões, seguem descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10: Caracterização das suspensões das nanopartículas.

Amostra sem liofilizar	Dmédio(nm)	PdI	ζ (mV)
1B	295±5	0,41±0,01	-14±2
2B	325±8	0,46±0,05	-14±1
3B	261±8	0,36±0,04	-11±2
4B	463±31	0,61±0,12	-11±2
5B	333±13	0,57±0,02	-12±2
6B	334±13	0,43±0,05	-10±3
7B	476±13	0,57±0,03	-11±2
8B	346±13	0,48±0,04	-12±1
9B	377±4	0,44±0,03	-13±2

As amostras ressuspensas após liofilização também foram analisadas quanto à tamanho de partículas, PdI e ZP. Os resultados obtidos indicaram a presença de agregados, mostrando que tivemos dificuldade na ressuspensão das NPs depois de liofilizadas.

Como pode ser observado na **Tabela 10**, os tamanhos médios das NPs estão na faixa de 261±8 a 476±13 nm e, portanto, adequados para uso tópico (Chellappan et al., 2019; Raszewska-famielec, 2022). Entretanto, esses sistemas estão com valores de PdI $\geq 0,4$. O PdI indica a uniformidade do diâmetro das partículas em uma solução. Valores de PdI de 0,3 e abaixo sugerem uma distribuição mais homogênea do tamanho das partículas no sistema (Danaei et al., 2018; Shah et al., 2014). Pelos valores de PdI encontrados, as nanoformulações preparadas apresentaram algum grau de heterogeneidade em relação ao tamanho médio das NPs.

O ZP é um parâmetro físico-químico que fornece a carga superficial das NPs e é um indicativo de estabilidade das nanoformulações. Um ZP mínimo em módulo de 30 mV é desejável para evitar a agregação de NPs devido às forças eletrostáticas atrativas (C.Lunardi et. al, 2021). Em nossos estudos, os valores de ZP das NPs são negativos, o que era esperado devido à presença do alginato (polímero aniônico) e menores que 30 mV em módulo, o que pode indicar baixa estabilidade coloidal das suspensões. Portanto, as análises realizadas sugerem a necessidade de otimização do método de preparo das nanoformulações.

5.2.2.2 Espectrometria vibracional na região do infravermelho

Os grupos carboxila e hidroxila do SA podem interagir com os grupos hidroxila do PLX por meio de ligações de hidrogênio (Duarah et al., 2017; Pistone et al., 2015). Adicionalmente, SA podem interagir com cátions divalentes, como Zn^{2+} , por exemplo. Esse processo é definido como reticulação física (V. Pillay, C.M. Dangor, T. Govender, K.R. Moopanar, 1998). As interações entre os polímeros SA e PLX, e entre os princípios ativos e os polímeros, foram estudadas para NPs liofilizadas por espectroscopia vibracional. Os espectros vibracionais isolados do SA, PLX, NA, AA e complexo foram registrados e comparados com as formulações de NPs.

Comparando-se os espectros vibracionais dos polímeros livres, SA e PLX, com da amostra 1B (Formulação sem ativos) (**Figura 17**), observa-se um deslocamento da banda do SA (referente ao estiramento do grupo OH), centrada em 3268 cm^{-1} para 3434 cm^{-1} na amostra 1B, o que indica a formação de ligações de hidrogênio entre o PLX e SA (Campus & Pradesh, 2015). Além disso, pôde-se observar que comprimentos de onda característicos do SA, 1595 cm^{-1} (COO^- estiramento assimétrico) e 1406 cm^{-1} (COO^- estiramento simétrico) (V. Pillay, 1998) sofreram mudança de intensidade e deslocaram-se para regiões de mais alta energia no espectro da amostra 1B para 1623 e 1417 cm^{-1} , respectivamente, indicando interações entre o PLX e os grupos carboxilatos do SA. Esses resultados indicam a interação dos grupos hidroxila e carbonila do SA com as hidroxilas do PLX. As bandas de alta intensidade do PLX livre em 2887 cm^{-1} , referente aos estiramentos dos grupos CH e CH_2 , em 1089 cm^{-1} , atribuída à vibração do grupamento éter, estão presentes no espectro da amostra 1B praticamente no mesmo comprimento de onda (2908 e 1095 cm^{-1}) indicando que elas não participaram da interação com o SA.

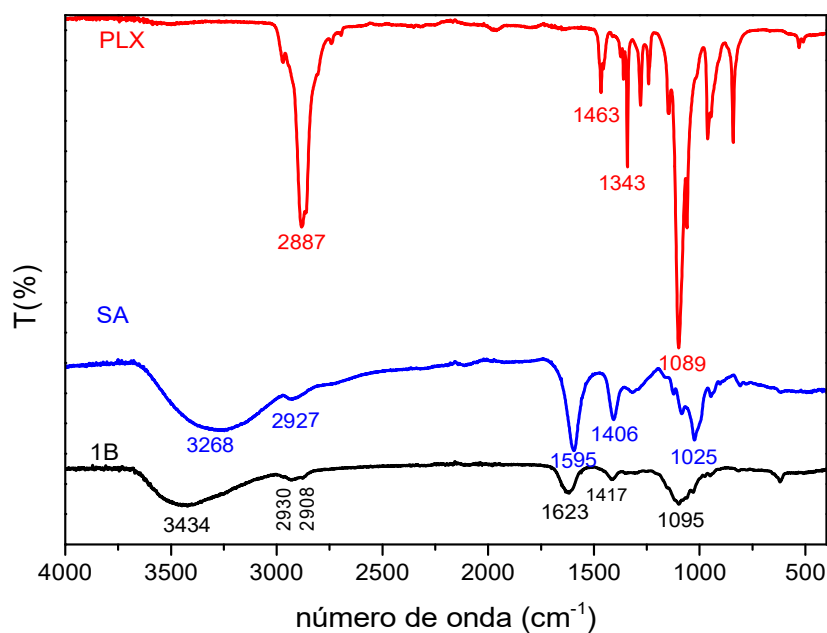


Figura 17: Espectros vibracionais do PLX, SA, da nanopartícula 1B (sistema com PLX, SA e reticulação com Zn^{2+})

Comparando-se os espectros vibracionais dos ativos AA e NA livres com os espectros das amostras de NPs 7B (que carregam esses ativos) e 1B (que não carrega ativos) (**Figura 18**), podemos observar mudanças importantes da amostra 7B em relação à amostra sem os ativos (1B). Tanto o AA quanto a NA possuem bandas características na região 3500 a 3000cm^{-1} referentes à estiramentos O-H e N-H e na região de 1700 a 1550cm^{-1} referentes aos estiramentos C-C, C=N, C=O_{amida}. A presença dessas bandas oriundas dos ativos livres pode ser observada na amostra 7B, o que é um indicativo que os ativos estejam dispersos na matriz polimérica, que constitui as NPs, interagindo com os polímeros por meio de ligações de hidrogênio.

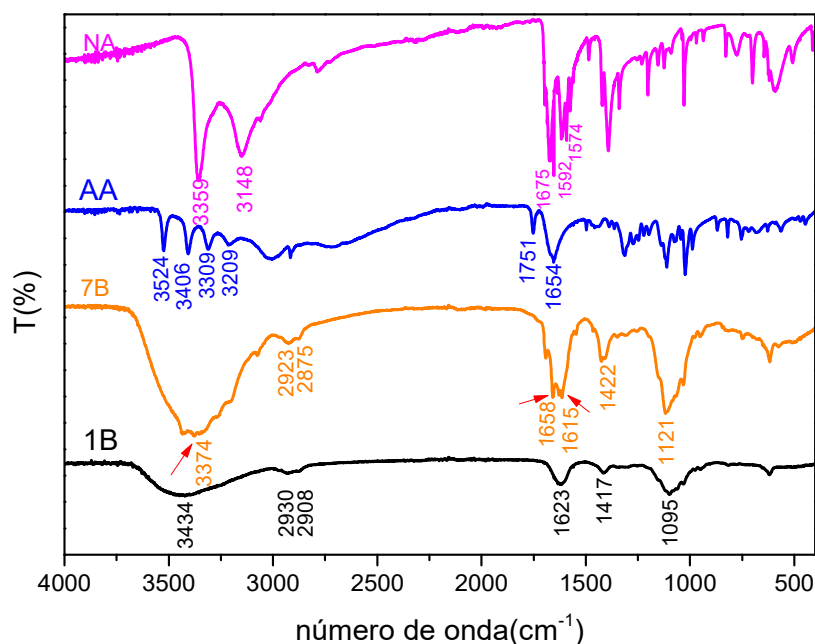


Figura 18: Espectros vibracionais do NA, AA, da nanopartícula 1B e 7B(sistema com PLX, NA, AA, SA e reticulação com Zn^{2+})

O espectro vibracional da amostra com complexo incorporado (9B) apresentou aspecto diferente da amostra sem ativos (1B), **Figura 19**. Embora muitas bandas do complexo estejam nas mesmas regiões das bandas da matriz polimérica (SA-PLX), é possível notar no espectro vibracional da amostra 9B algumas bandas na região $1690-1100\text{ cm}^{-1}$ que são características do complexo. Isso é um indicativo da presença do complexo na nanopartícula e sugere que o complexo esteja disperso na nanopartícula.

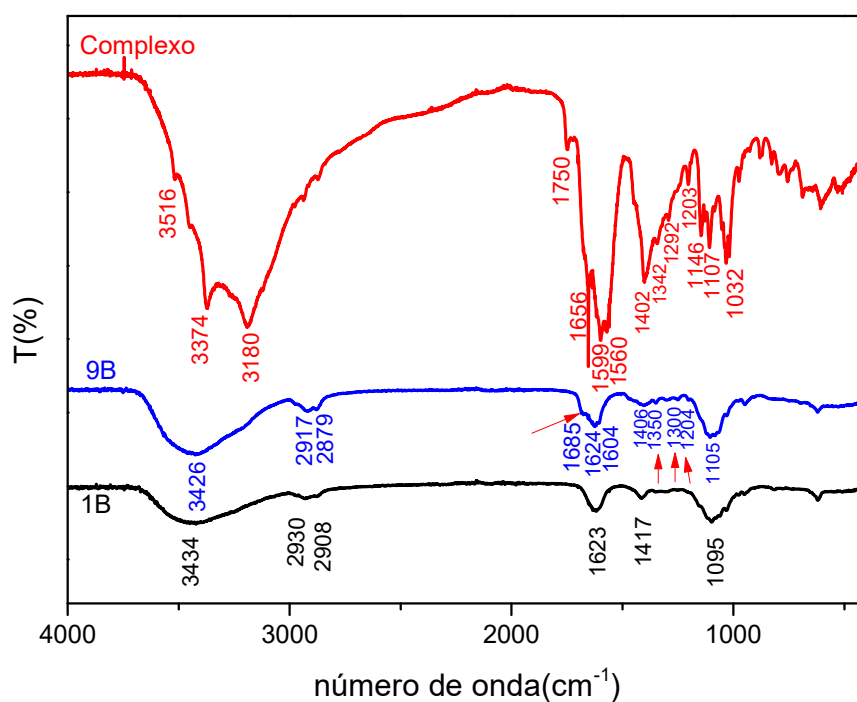


Figura 19: Espectros vibracionais do complexo, da nanopartícula 1B e da 9B (sistema com PLX , complexo, SA e reticulação com Zn^{2+})

5.2.2.3 Determinação do teor de zinco nas NPs

As amostras dos sobrenadantes também foram encaminhadas para análise por absorção atômica, a fim de dosar a concentração de zinco (Zn^{2+}) oriundo da solução de sulfato de zinco e/ou do complexo (**Tabela 11**).

Tabela 11:Concentração de Zinco no sobrenadante, calculado a partir dos dados da absorção atômica.

Amostra	Zn encontrado (mg/L)	Zn adicionado (mg/L)	% livre	%reticulado
1B	107,58	151,58	70,97	29,03
2B	110,86	151,58	73,14	26,86
3B	104,41	151,58	68,88	31,12
4B	99,88	151,58	65,89	34,11
5B	103,98	151,58	68,60	31,40
6B	97,40	151,58	64,26	35,74
7B	96,02	151,58	63,35	36,65
8B	94,00	171,39	54,84	45,16
9B	113,45	181,30	62,57	37,43

Os dados apontam que uma pequena porção do zinco adicionado foi usado no processo de reticulação das NPs (entre 29 e 45%). Era esperado que maior quantidade de zinco fosse incorporado ao sistema.

5.2.2.4 Determinação da eficiência de encapsulamento (EE) dos ativos pelo método de dosagem de AA no sobrenadante

Curvas de calibração para determinação da quantidade de cada ativo nas NPs foram construídas e os parâmetros estão apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12: Parâmetros da curva de calibração construída a partir dos dados da espectroscopia UV-Vis dos ativos ácido ascórbico, niacinamida e do complexo

Princípio ativo	λ_{max} (nm)	Faixa da curva de calibração (mg.L ⁻¹)	Equação de regressão	Coefficiente de determinação (R ²)
AA	264	1-8	A = 0,0814c + 0,2646	0,9973
NA	212	1-8	A = 0,0997c + 0,1691	0,9943
Complexo	262	10-50	A = 0,0177c + 0,0225	0,9962
	212	1-9	A = 0,0784c - 0,0126	0,9953

Onde A = absorbância e c = concentração do ativo.

A partir das curvas construídas, pôde-se calcular a concentração dos ativos nos sobrenadantes coletados após ultracentrifugação dos sistemas de nanopartículas. A partir das leituras pôde-se calcular a quantidade dos ativos nos sobrenadantes segundo os parâmetros descritos na **Tabela 12** e considerando o volume inicial do sistema igual a 100 mL. Os resultados se encontram nas **Tabelas 13 a 15**.

Tabela 13: Eficiência de encapsulamento de ácido ascórbico nas NPs (leitura em 264nm).

Amostra	Total de AA adicionado(mg)	Concentração de AA no sobrenadante($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Total AA livre em 100mL (mg)	%EE
4B	10	0,07	0,007	99,86
5B	20	0,14	0,014	99,93
6B	10	11,6	1,160	88,40
7B	20	41,6	4,160	79,20

As taxas de encapsulamento de AA foram maiores quando isolado da NA. Na presença de NA essa taxa se mostrou menor, embora ainda alta.

Tabela 14: Eficiência de encapsulamento de niacinamida nas NPs (leitura a 212nm).

Amostra	Total de NA adicionado(mg)	Concentração de NA no sobrenadante($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Total NA livre em 100 mL (mg)	%EE
2B	10	38,8	3,88	61,17
3B	20	56,2	5,62	71,87
6B	10	61,0	6,10	38,99
7B	20	131,4	13,14	34,29

A NA apresentou taxas de encapsulamento menores que do AA e são ainda mais baixas (em torno de 50% mais baixas) na presença de AA, como observado nos sistemas 6B e 7B. A presença do AA causa um efeito antagônico no encapsulamento da NA. O AA interage com a NA formando um complexo molecular resultante da interação intermolecular do N protonado do anel da NA com a carbonila do AA. Assim, a NA fica menos disponibilizada para ser encapsulada pela matriz polimérica. Portanto, ao analisar o sobrenadante foi detectada maior quantidade de NA não encapsulado (Iqbal Ahmad et al., 2018). É também citado na literatura que AA e NA podem formar cocristais (Stolar et al., 2019; Wang et al., 2016). Cocristais são formados por complexos de dois componentes de fármacos e/ou moléculas bioativas unidas por interações não covalentes na mesma rede cristalina e em uma estequiometria definida (Karagianni et al., 2018). Cocrystal de AA-NA na proporção de 1:1 foi mencionado na literatura (Balbinot-Filho et al., 2024). Além da instabilidade do AA quando dissolvido em água, dificultando sua quantificação (Selimović et al., 2011; Selimović & Salkić, 2011), há também a questão que ele se degrada mais rapidamente na presença de NA (I Ahmad et al., 2012; Iqbal Ahmad et al., 2018), exigindo métodos para estabilizar o AA contra a degradação para quantificação adequada.

Tabela 15: Eficiência de encapsulamento do complexo nas NPs (leitura em 262 nm)

Amostra	Total de complexo adicionado (mg)	Concentração de complexo no sobrenadante($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Total do complexo livre em 100 mL(mg)	%EE
8B	10	46,9	4,69	53,1
9B	20	81,7	8,17	59,2

Em relação ao complexo, foram obtidas taxas de encapsulamento em torno de 50% quando 10 mg do complexo foram adicionados, e em torno de 60% quando maior quantidade foi adicionada (20 mg). Para esse estudo foi utilizada a banda de absorção em 262nm, pois ela apresentou-se mais adequada para a faixa de concentração abordada (10-50mg), que está mais próximo do encontrado nos sobrenadantes lidos.

5.2.2.5 Cinética de liberação de ativo *in vitro*

Foram realizados testes para analisar o perfil de liberação de ativos nos intervalos de 0 a 240 minutos a partir das nanopartículas preparadas e armazenadas há 6 meses. Os resultados estão apresentados nas **Tabelas 16 e 17** e na **Figura 20**.

Tabela 16: Dados para construção da curva de liberação de AA a partir das NPs no tampão de fosfato pH 5,5

tempo (min)	[AA] (mg/L)	amostra instantânea (mg)	amostra descartada (mg)	Amostra cumulativa (mg)	Liberação cumulativa (%)
5	-0,0154	-0,0008	0,0000	-0,0008	-0,0236
10	0,1389	0,0069	0,0003	0,0072	0,2115
15	0,2006	0,0100	0,0004	0,0107	0,3141
30	0,3652	0,0183	0,0007	0,0196	0,5776
60	0,1903	0,0095	0,0004	0,0113	0,3316
90	0,1903	0,0095	0,0004	0,0117	0,3428
120	0,1286	0,0064	0,0003	0,0088	0,2596
150	0,0566	0,0028	0,0001	0,0053	0,1570
180	0,0360	0,0018	0,0001	0,0044	0,1289
210	0,0154	0,0008	0,0000	0,0034	0,0996
240	-0,0360	-0,0018	-0,0001	0,0007	0,0218

Tabela 17: Dados para construção da curva de liberação de NA a partir das NPs no tampão de fosfato pH 5,5

tempo (min)	[NA] (mg/L)	amostra instantânea (mg)	amostra descartada (mg)	Amostra cumulativa (mg)	Liberação cumulativa (%)
5	2,9429	0,1471	0,0059	0,1530	12,7524
10	3,4714	0,1736	0,0069	0,1864	15,5333
15	3,8000	0,1900	0,0076	0,2104	17,5357
30	4,3143	0,2157	0,0086	0,2448	20,3976
60	5,1000	0,2550	0,0102	0,2943	24,5214
90	5,4429	0,2721	0,0109	0,3223	26,8571
120	5,4143	0,2707	0,0108	0,3317	27,6405
150	5,5143	0,2757	0,0110	0,3477	28,9762
180	5,3571	0,2679	0,0107	0,3506	29,2143
210	5,2286	0,2614	0,0105	0,3546	29,5500
240	4,9714	0,2486	0,0099	0,3517	29,3071

Onde: [] (mg/L) é calculada segundo a curva de calibração construída a partir dos dados no tampão de pH desejado e para o ativo de interesse.

Amostra instantânea (mg) é a concentração [] (mg/L) multiplicada pelo volume total (0,05 L) de tampão utilizado no sistema de liberação.

Amostra descartada (mg) é a concentração [] (mg/L) multiplicada pelo volume retirado (0,002 L) de cada alíquota.

Amostra cumulativa (mg) é a amostra instantânea adicionado a soma das amostras retiradas até o dado momento.

% liberação cumulativa é a massa de ativo(mg) liberada dividida pela massa total esperada na liberação multiplicado por 100.

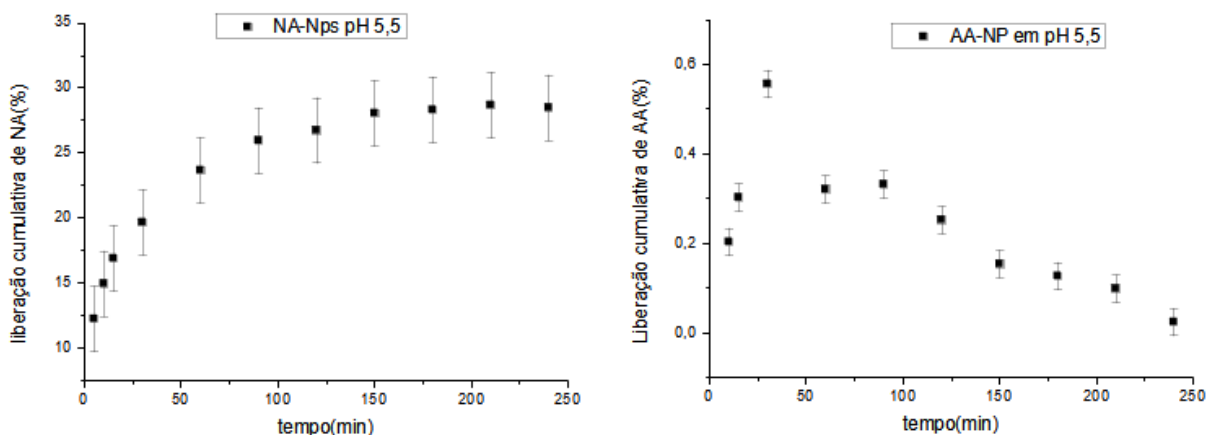


Figura 20: Representação gráfica do estudo de liberação dos ativos a partir das nanopartículas (6mg) em meio tamponado pH 5,5 e 37°C, simulando condições da pele humana.

Os dados de liberação do NA e AA foram avaliados segundo 4 modelos matemáticos e os coeficientes de determinação, cujos resultados estão apresentados na **Tabela 18**.

Tabela 18: Valores de coeficientes de determinação para modelos de cinética de liberação

Modelos	Coeficiente de determinação (R^2)	
	NA	AA
Ordem zero	0,789	0,595
Primeira ordem	0,758	0,684
Higuchi	0,919	0,486
Korsmeyer-Peppas	0,994	0,360

O resultado do sistema de liberação para o AA apresentou R^2 que mostram que o sistema não foi bem ajustado a nenhum dos modelos. Para o modelo de Peppas o valor de n (expoente de difusão) foi negativo. Há indícios da não detecção de AA de forma adequada. Assim, embora tenha havido liberação de AA, uma quantidade baixa foi quantificada. Além disso, um decréscimo é observado em torno de 50 minutos de teste de liberação, indicando uma degradação do ativo no meio. O teste, portanto, foi inconclusivo para o ativo AA.

Para NA considerou-se o modelo cinético de Krosmeier-Peppas para até 60% da quantidade de ativo liberado na solução de pH 5,5. Como o n (expoente de difusão) obtido foi menor que 0,45, há indicativo de comportamento anômalo ou indeterminado (**Figura 21**).

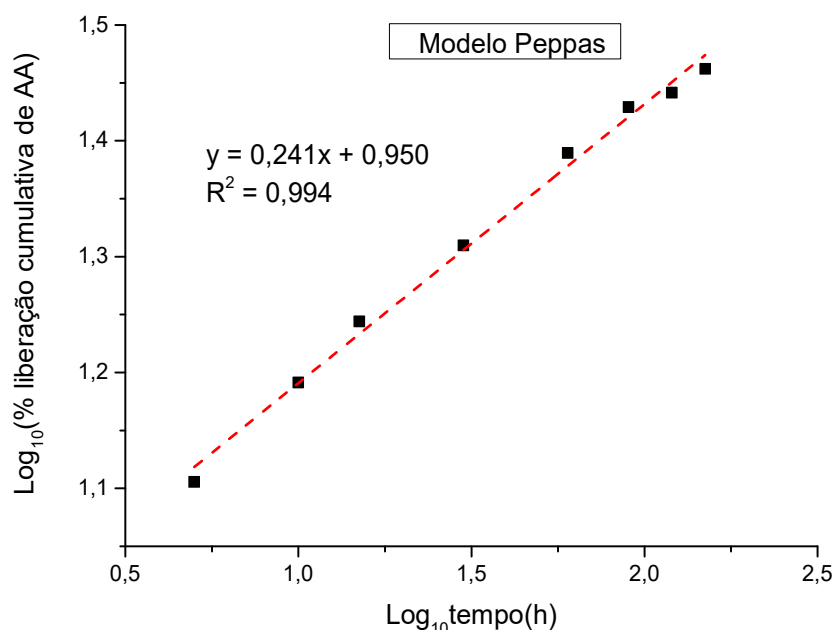


Figura 21: Gráfico dos dados da liberação de AA em pH 5,5 ajustados ao modelo Korsmeyer-Peppas para descrever a cinética de liberação do AA a partir das NPs.

Apesar do teste se apresentar inconclusivo para AA, os resultados mostram que as NPs se apresentaram capazes de estabilizar o AA mesmo após seis meses de armazenamento, sendo também observado uma liberação prolongada do ativo NA.

5.2.2.6 Degradabilidade de AA em tampão fosfato pH 5,5

Para observar a cinética de degradação do AA nas condições do estudo, um teste com a solução de AA em tampão pH 5,5 foi conduzido. A absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento específico e avaliada em função do tempo visando obter o perfil de degradação do AA livre no intervalo de 0 a 145 minutos (**Tabela 19** e **Figura 22**). Avaliando os resultados pode-se confirmar que o AA é facilmente degradado em soluções com pH superior a 5 e, portanto, estratégias para quantificá-lo precisam ser aplicadas.

Tabela 19: Absorbância de AA em pH 5,5 e em comprimento específico em função do tempo medida por espectrofotômetro UV-Vis

AA em solução tampão fosfato 5,5		
tempo (min)	ABS(264nm)	variação(%)
0	0,370	100,00
10	0,331	89,46
20	0,286	77,30
30	0,237	64,05
60	0,138	37,30
70	0,115	31,08
80	0,096	25,95
90	0,096	25,95
95	0,072	19,46
110	0,051	13,78
120	0,045	12,16
135	0,039	10,54
145	0,035	9,46

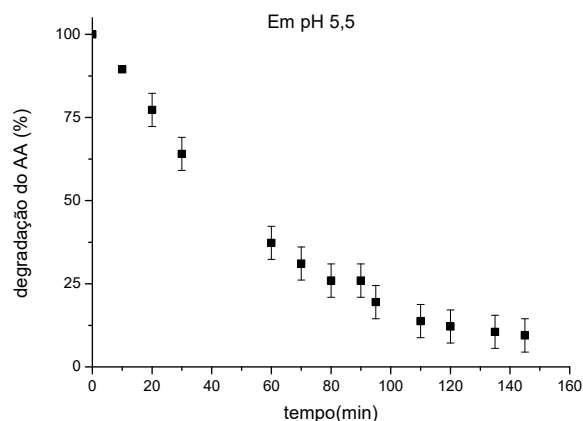


Figura 22: Degradação do ácido ascórbico em meio tamponado pH 5,5.

As determinações do AA no sobrenadante indicaram valores de encapsulamento de ácido ascórbico bastante elevados, inclusive alguns valores próximos a 100%. Contudo, ao analisar a degradação do AA em solução (**Figura 22**), podemos concluir que os valores de %EE para AA nas NPs não refletem a realidade. Ao longo do processo de preparo das NPs, centrifugação e ultracentrifugação o AA não incorporado, presente no sobrenadante, pode ter sofrido degradação, levando a um resultado de baixa concentração de AA no sobrenadante e, indiretamente, um valor errôneo de alta %EE de AA nas NPs. Dessa forma, o método de quantificação de AA no sobrenadante não é adequado, apesar de descrito na literatura (Duarah et al., 2017; Jang & Lee, 2008; Othman et al., 2018).

5.3 Conclusões

As nanoformulações preparadas apresentaram valores de pH entre 4 e 6, que são adequados para uso tópico. Partículas de tamanhos médios na faixa de 261 a 426 nm foram obtidas, porém, com índice de polidispersividade altos indicando falta de homogeneidade no tamanho de NPs. As formulações apresentaram ZP em torno de -17 mV, que pode indicar baixa estabilidade do sistema. As análises vibracionais na região do infravermelho indicaram que os ativos foram incorporados nas NPs, uma vez que é possível observar bandas características dos ativos livres e do complexo no espectro vibracional das NPs com esses ativos incorporados.

O AA apresentou taxas altas de %EE quando calculadas pelo método de quantificação de AA no sobrenadante. Porém, o método utilizado não foi adequado, pois não considerou a degradação do AA no sobrenadante. A NA apresentou %EE superior a 60% na ausência de AA e inferior a 40% na presença de AA, o que confirma a interação entre esses dois ativos. O complexo,

por sua vez, apresentou %EE superiores a 50%, o que pode ser boa alternativa para encapsular NA e AA simultaneamente.

As análises após 6 meses de armazenamento das NPs mostram que foi possível estabilizar o AA nas NPs preparadas e observar uma liberação prolongada do NA. Devido à rápida degradação do AA no tampão fosfato pH 5,5, não foi possível estudar a cinética de liberação, mas foi possível confirmar que as NPs preparadas conseguiram estabilizar parte do AA encapsulado.

CAPÍTULO 6 - DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO DIRETAMENTE EM NANOPARTÍCULAS

6.1 Parte experimental

Um método para quantificação do AA encapsulado nas NPs foi desenvolvido. Utilizou-se um procedimento colorimétrico que emprega cloreto férrico e excesso de o-fenantrolina (phen) em meio ácido (pH ~3). A presença do AA reduz o Fe^{3+} a Fe^{2+} , formando o complexo vermelho-alaranjado, $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($\text{Abs}_{\text{max}} = 510\text{nm}$). O meio fortemente ácido, além de favorecer a formação do complexo colorimétrico, permite a abertura das NPs e a quantificação instantânea do AA liberado antes que seja degradado.

6.1.1 Construção da curva de calibração

Uma solução colorimétrica contendo fenantrolina e ferro (III) foi preparada dissolvendo 0,062g de 1,10-fenantrolina monohidratada, 0,112g de cloreto férrico anidro e 20 μL de HCl 12M em 25mL de água deionizada. O pH final da solução colorimétrica foi próximo a 3. Uma solução estoque de ácido L-ascórbico (80mg/L) foi preparada em um frasco âmbar para evitar a fotodecomposição. Imediatamente após a preparação da solução estoque de AA, uma série de soluções padrão de AA (0–4,8 mg/L) contendo solução colorimétrica, na proporção de 1mL de solução colorimétrica para 10mL de solução final, foram preparadas para obter a curva de calibração (**Tabela 20**). As soluções padrão preparadas foram medidas no espectrofotômetro UV-Vis a 510 nm. As equações de regressão foram construídas utilizando os softwares Origin 8.5.1 e Excel.

Tabela 20: Etapa de preparo das soluções para construção da curva de calibração

Pontos	Volume da SE de AA(μL)	[AA] mg/L	Volume de solução colorimétrica(mL)	volume final (mL)	ABS(510nm)
Branco	0	0			0,181
1	63	0,5			0,290
2	125	1			0,374
3	188	1,5			0,441
4	200	1,6	1	10	0,488
5	400	3,2			0,689
6	600	4,8			1,005

6.1.2 Estudo de degradação do ácido ascórbico em soluções aquosas e o potencial do método colorimétrico para dosar o AA nas NPs

Soluções de AA foram preparadas em água ultrapura à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$), sendo uma solução com reagente orto-fenantrolina e ferro, uma segunda somente com AA, ambas exposta a luz; e uma terceira somente com AA e protegida da luz. A solução com reagente orto-fenantrolina e ferro foi preparada em um balão de 250 mL com adição de 1 mg de AA e 25 mL da solução colorimétrica (orto-fenatrolina e ferro). Foi adicionada água até completar 250 mL. As soluções somente com AA foram preparadas com a adição de 1mg de AA em 250 mL de água. Uma permaneceu exposta à luz enquanto a outra solução foi protegida da luz encobrindo o balão com papel alumínio. Estes sistemas tiveram suas leituras de absorbância lidas no comprimento de 264nm ou 510nm, no caso do sistema com solução colorimétrica, ao longo de um período de 24 horas.

6.1.3 Método de quantificação de AA em NPs

Massas das NPs liofilizadas foram pesadas com precisão e submetidas à abertura através da adição de 1,0 mL de solução ácida, contendo Fe^{3+} e phen, e ultrassonificação por 15 min. Posteriormente, 9,0 mL de água foram adicionados ao sistema e a absorbância medida no espectrofotômetro de absorção UV-Vis.

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 Construção da curva de calibração para quantificação de AA diretamente nas nanopartículas

A soluções de AA com solução colorimétrica tiveram suas absorbâncias lidas segundo dados da **Tabela 20**. A equação de regressão foi construída utilizando os *softwares* Origin 8.5.1 e Excel. Os parâmetros estão descritos na **Tabela 21** e o gráfico da regressão linear apresentado na **Figura 23**.

Tabela 21: Parâmetros da curva de calibração construída a partir dos dados da espectroscopia UV-Vis do complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$

Princípio ativo	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	Faixa da curva de calibração (mg.L^{-1}) de AA	Equação de regressão	Coefficiente de determinação (R^2)
$[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$	510	1-5	$A = 0,1649c + 0,1986$	0,9939

Onde A = Absorbância e c = concentração de AA

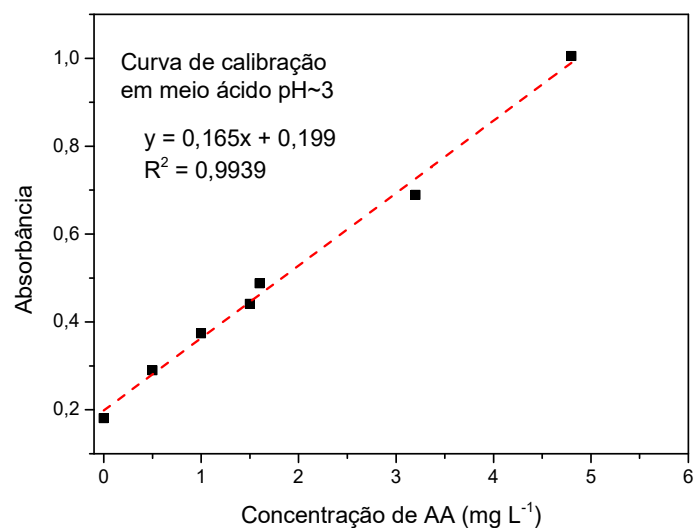


Figura 23: Gráfico da curva de calibração de AA utilizando regressão linear

6.2.2 Análise da degradação do AA em soluções aquosas e o potencial do método orto-fenantrolina e ferro para dosar o AA

As soluções foram lidas em UV-Vis nos comprimentos de onda 264 nm e 510 nm conforme espécie a ser lida (AA ou $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$) por um período de 24 horas. As leituras e variações estão descritas na **Tabela 22**.

Tabela 22: Estudo de degradação do AA exposto a luz e da degradação com o tempo

Soluções	AA+reagente		AA		AA protegida da luz	
Leitura	Abs. (510nm)	Variação (%)	Abs. (264nm)	Variação (%)	Abs. (264nm)	Variação (%)
0min	0,859	100,00	0,434	100,00	0,477	100,00
5min	0,866	100,83	0,421	97,00	0,476	99,79
10min	0,851	99,07	0,412	94,93	0,468	98,11
15min	0,868	101,04	0,402	92,63	0,462	96,86
30min	0,875	101,93	0,370	85,25	0,448	93,92
60min	0,900	104,87	0,331	76,27	0,409	85,74
120min	0,920	107,09	0,196	45,16	0,324	67,92
180min	0,963	112,10	0,122	28,11	0,279	58,49
210min	1,006	117,14	0,094	21,66	0,255	53,46
240min	1,030	120,08	0,077	17,74	0,219	45,91
24horas	2,889	336,52	0,007	1,61	0,007	1,47

O AA é degradado facilmente em soluções aquosas, como observado na **Tabela 22**, podendo chegar a uma taxa de degradação de mais de 50% em duas horas quando exposto a luz e a próximo de 33% mesmo protegido da luz. Na presença de solução colorimétrica observou-se maior estabilidade do AA (**Figura 24**). O AA liberado instantaneamente reduz o Fe^{3+} a Fe^{2+} , que reage com a phen formando o complexo. Pode se observar que para o mesmo período (2hrs) a taxa de variação da absorbância se encontra em 107% (dentro da variação e erros aceitáveis), não indicando problemas com degradação. A partir deste ponto um outro fator começa a ser relevante para esse sistema, que é o aumento da intensidade da cor da solução e o método passa a não ser confiável.

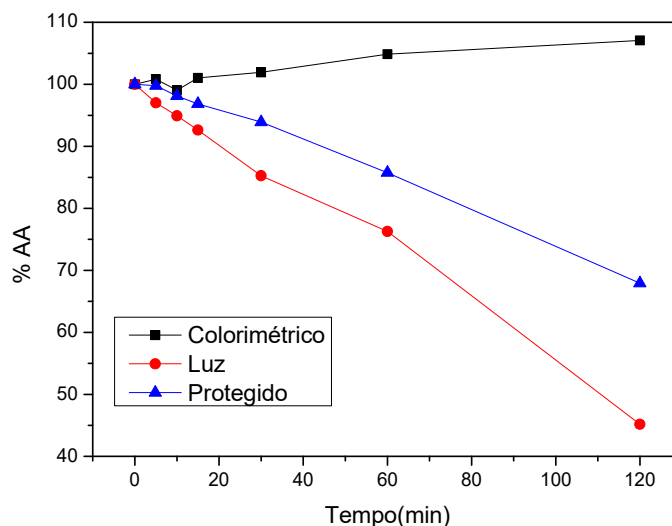


Figura 24: Representação gráfica do estudo de degradação do AA exposto a luz e da degradação com o tempo

A determinação do %EE pode ser feita indiretamente medindo AA no sobrenadante após preparar e separar as nano/micropartículas (Duarah et al., 2017; Jang & Lee, 2008; Othman et al., 2018). Por outro lado, a determinação direta da %EE nas NPs envolve a abertura das nano/micropartículas, preferencialmente usando um agente que capture AA durante o processo de abertura das partículas, prevenindo sua degradação (Uddin et al., 2001). A determinação indireta de %EE em nano/micropartículas é inadequada para ativos instáveis, como AA. Por meio da abordagem indireta, a quantidade de AA não encapsulada, que sofre degradação durante a preparação e separação das NPs, é erroneamente interpretada como se tivesse sido encapsulada, resultando em valores superestimados de %EE. Visando obter valores de %EE mais confiáveis para AA, usamos um método colorimétrico (espectrofotométrico) baseado nas propriedades redox de AA. Neste método, a quantidade de AA encapsulada em NPs é determinada indiretamente pela redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} com AA, então complexando com 1,10-fenantrolina (phen) para formar o complexo de ferroína ($[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$). O complexo de ferroína vermelho-alaranjado pode ser formado na faixa de pH de 2–9 e monitorado espectrofotometricamente a 510 nm (Tsfaldet et al., 2004), sendo os valores de absorbância diretamente relacionados à concentração de AA nas amostras (E. Luque-Pérez and A.Ríos.M.Valcárcel, 2000). A curva de calibração obtida neste trabalho apresentou boa linearidade (**Tabela 21**). Outros autores relataram o uso deste método colorimétrico para determinar AA em bebidas, alimentos e formulações de medicamentos (Pérez and Valcárcel, 2000; Memom, A.M et al. 1994).

6.2.3 Etapa de quantificação de AA em NPs

O método colorimétrico desenvolvido foi aplicado nas NPs preparadas e os resultados obtidos estão descritos no capítulo 7.

6.3 Conclusão

Considerando que o procedimento de preparo das nanopartículas é realizado em sistemas aquosos, e o tempo até análise é provavelmente superior a 2 horas, o método indireto para determinação do %EE não é adequado para AA. Sendo assim, a determinação mais confiável é dosar esse ativo diretamente nas nanopartículas. O método de orto-fenantrolina e ferro se apresenta então como uma boa alternativa para dosagem de AA nas NPs antes que seja degradado. Pode-se verificar pelos resultados do teste apresentado na **Tabela 22** que o tempo de estabilidade do complexo colorido formado atende ao período necessário para abertura e leitura das soluções das nanopartículas, sendo portanto, suficiente para quantificar o AA encapsulado nas NPs poliméricas de modo confiável.

**CAPÍTULO 7 – PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
POLOXAMER 407 COM ÁCIDO ASCÓRBICO REVESTIDAS POR COMPLEXO
POLIELETROLÍTICO DE QUITOSANA (CS)-ALGINATO DE SÓDIO (SA)**

7.1 Parte experimental

7.1.1 Preparo das nanopartículas e estudo da quantidade otimizada de AA

O método de preparo das nanopartículas empregado foi modificado em relação ao descrito na literatura (Sanches, 2020). A solução de CS 0,1%*m/V* foi preparada em solução aquosa de ácido acético 1%*v/v*, a de SA 0,1%*m/V* em água ultrapura e a de PLX 2,5%*m/m* em etanol. Estes sistemas foram agitados durante toda a noite (~12 horas) à temperatura ambiente para dissolução completa dos polímeros. As soluções foram filtradas com papel de filtro quantitativo faixa azul 2 μm para remoção de qualquer impureza ou partícula grande ($> 2\mu\text{m}$).

As nanopartículas foram preparadas com base na formação de complexo de polieletrólítico (PEC). Primeiramente, 3mL de emulsão Pluronic® F127 (2,5% *m/v*) contendo uma quantidade variável de AA (1, 2, 3, 5, 10 ou 20mg) foram preparadas em etanol. O sistema foi protegido da luz e mantido sob agitação magnética por 15 min. Em seguida, foi adicionada a esse sistema 76 mL de solução aquosa de quitosana (CS) (0,1% *m/v*, pH = 5,0), previamente preparada em ácido acético 1% (*v/v*). Finalmente, a formação de PEC ocorreu pela adição lenta de 14 mL de solução aquosa de alginato de sódio (SA) (0,1% *m/v*, pH = 6) à emulsão CS-PLX, sob homogeneização a 6.000 rpm por 30 min. Uma bomba peristáltica foi empregada para a adição da solução de SA, a fim de manter um fluxo constante e reprodutível (1 mL min⁻¹). A suspensão obtida foi ultracentrifugada a 13.000rpm por 20 min para recuperação das nanopartículas. O *pellet* foi liofilizado e armazenado no freezer para estudos de caracterização. Todo o procedimento está esquematizado na **Figura 25**.



Figura 25: Esquema do procedimento para obtenção das nanopartículas de PLX com o ativo AA e revestidas pelo complexo polieletrólítico SA-CS

7.1.2 Preparo das amostras para caracterização das nanopartículas

Um volume de 10 a 15 mL de cada suspensão foi reservada para análise de tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta. O volume restante (em torno de 75 mL) foi encaminhado para a ultracentrifugação e liofilização. Parte das amostras liofilizadas foram encaminhadas para análise de infravermelho e DSC. Outra parte foi analisada e teve a EE(%) e LC(%) determinados

7.1.2.1 Determinação da eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carga (LC) dos ativos nas nanopartículas

A metodologia engloba a etapa após a ultracentrifugação e liofilização das NPs. O teor de AA nas NPs produzidas foi determinado pelo método colorimétrico desenvolvido neste trabalho e o resultado expresso em porcentagem de eficiência de encapsulamento (%EE) e de capacidade de carga (%LC).

Para determinação do %EE e %LC, 1,0 mL de solução colorimétrica (pH~3), contendo Fe^{3+} e phen, foi adicionada a 4,0 mg de NPs e esse sistema submetido à ultrassonicação por 15 minutos. Posteriormente, essa dispersão foi transferida para balão de 10mL e completado o volume com água deionizada. A solução obtida foi analisada em espectrofotômetro UV-Vis a 510 nm e a quantidade de AA foi calculada usando equação linear obtida da curva de calibração do método colorimétrico desenvolvido no capítulo 6 (seção 6.2.1). Os %EE e %LC foram calculados aplicando as equações 7 e 8. A determinação da quantidade de AA nas NPs foi realizada em triplicata.

$$EE\% = \frac{\text{Quantidade de AA nas NPs}}{\text{Quantidade total de AA adicionada inicialmente}} \times 100 \quad \text{Eq.7}$$

$$LC\% = \frac{\text{Quantidade de AA na massa total de NPs}}{\text{Massa total de NPs}} \times 100 \quad \text{Eq.8}$$

7.1.2.2 Estudo de liberação cumulativa e cinética de liberação dos ativos pelas nanopartículas *in vitro*

Nesta etapa a solução salina tamponada com fosfato (PBS) não pôde ser usada devido à precipitação de fosfato férrico. Foi então escolhido o tampão HEPES para construção das curvas de calibração e uso nos testes de liberação cumulativa do AA *in vitro*.

O tampão HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanossulfônico) é amplamente utilizado em sistemas biológicos devido às suas propriedades favoráveis para manter a estabilidade do pH em ambientes que envolvem processos celulares, bioquímicos e biomoleculares. Possui baixa toxicidade, boa estabilidade térmica e química.

Curvas de calibração

Soluções de AA com concentrações conhecidas foram preparadas em solução de água deionizada a partir de uma solução estoque de AA (80mg.L) preparada no momento do uso. Foram adicionados volumes de solução tampão HEPES pH 5,5 ou pH 7,4, contendo solução colorimétrica conforme planejamento e sequência apresentada na **Tabela 23**. Posteriormente, foram lidas suas absorbâncias. Cada ponto era lido imediatamente após coleta da solução tampão contendo solução colorimétrica sem a presença de NPs, submetidas às mesmas condições do experimento, sendo aliquota em cada intervalo de tempo e lidas como branco. Os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem cumulativa média de liberação de AA foi plotada em relação ao tempo para estudar o modelo de liberação. As equações de regressão foram construídas utilizando os softwares Origin 8.5.1 e Excel.

Tabela 23: Planejamento experimental de preparo das soluções para construção da curva de calibração em tampão.

Soluções para construção da curva	Ordem de adição			
	1) Solução tampão (mL)	2) Solução colorimétrica (mL)	3) Solução estoque AA (μ L)	4) Solução tampão pH 5,5 ou pH 7,4
[AA] (mg.L)				
0,5			63	
1			125	
1,5	8	1	188	Volume para completar 10 mL
1,6			200	
3,2			400	
4,8			600	

Liberação cumulativa *in vitro* dos ativos das nanopartículas

A liberação cumulativa *in vitro* dos ativos das nanopartículas foi avaliada utilizando saco de diálise. Quantidades pesadas com precisão (4 mg) de NPs (nanoformulação com 20mg de AA), foram colocadas em um saco de diálise de celulose (7 cm de comprimento, 5,5 cm de largura, peso molecular de corte de 1 kDa). Os sacos foram hermeticamente fechados e colocados no frasco receptor contendo 45 mL de tampão HEPES pH 5,5 ou pH 7,4 e 5mL de solução colorimétrica o meio de liberação em tampão fosfato de potássio e fosfato de sódio (50mL) em pH 5,5. Os frascos foram colocados na incubadora agitadora orbitalar termostática a 37 ± 2 °C e velocidade de 75 rpm. Em intervalos periódicos, alíquotas de 2 mL do meio de liberação foram retiradas e o volume extraído do meio foi substituído pela solução tampão HEPES pH 5,5 ou pH 7,4. Essa etapa foi necessária para manter o volume de 50 mL de tampão durante todo experimento. As quantidades de AA liberadas em cada intervalo de tempo foram estimadas medindo-se a absorvância da amostra em 264 nm. Anteriormente, foram construídas curvas de calibração para AA em tampão HEPES pH 5,5 e em pH 7,4. A percentagem cumulativa média de liberação de AA foi traçada em função do tempo para estudar a cinética de liberação.

Cinética de liberação *in vitro* de AA

Para avaliar os modelos de cinética de liberação de AA das NPs preparadas, os dados da liberação cumulativa do ativo pelas nanopartículas *in vitro* foram ajustados a quatro modelos cinéticos distintos: ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Modelos Korsmeyer-Peppas.

7.1.2.3 Análise estatística dos dados

Todos os resultados quantitativos de tamanho de partícula, PDI e de potencial Zeta foram obtidos em triplicata a partir de pelo menos três amostras para análise. Os dados são apresentados como médias e desvios padrão (DPs). A análise de variância unidirecional (ANOVA) e o teste de Tukey foram empregados para examinar as diferenças entre os grupos. Em todos os casos, um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

7.2 Resultados e Discussão

7.2.1 Caracterização das nanopartículas

Com o objetivo de produzir NPs poliméricas para estabilizar e controlar a liberação de AA para aplicação tópica, preparamos NPs contendo micelas pluronic® F127 carregadas com AA revestidas por complexo de polieletrólito de quitosana-alginato (CS-ALG PEC). Embora pequenos fármacos hidrofílicos como AA não sejam englobados por micelas de PLX, esses fármacos podem interagir com a parte hidrofílica do PLX (**Figura 26**). Os produtos liofilizados obtidos apresentam aspecto de algodão e coloração branca a amarelada. A seguir estão as técnicas empregadas para caracterização das NPs obtidas.

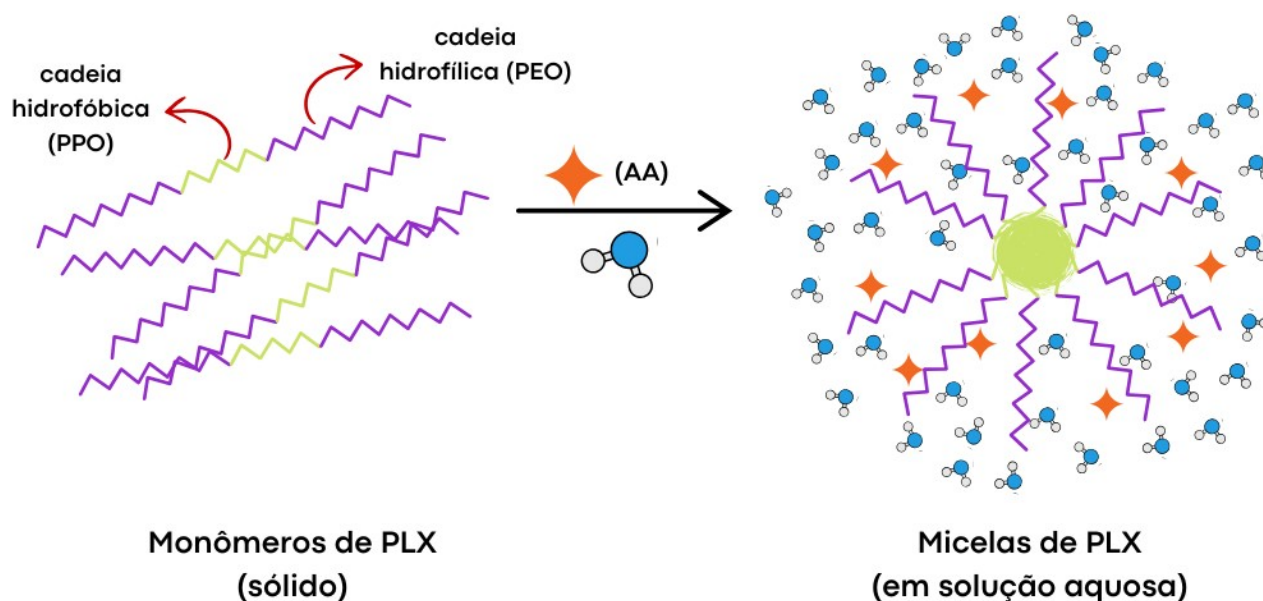


Figura 26: Representação da formação de micelas de PLX em solução aquosa/etanol e da interação de AA com parte hidrofílica

7.2.1.1 Espectrometria vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia vibracional foi utilizada para confirmar a formação do complexo polieletrólítico SA-CS e a presença de AA nas AA-NPs. Os espectros vibracionais do CS, SA, PLX, e AA foram registrados e comparados com as formulações de NPs liofilizadas preparadas (**Figura 27**).

As frequências típicas de alongamento de carboxilato assimétrico e simétrico de SA livre em 1654 e 1467 cm^{-1} (V. Pillay, C.M. Dangor, T. Govender, K.R Moopanar, 1998), aparecem nos espectros vibracionais de NPs não carregados (Branco) e AA-NPs em torno de 1564 e 1405 cm^{-1} , respectivamente. Estes deslocamentos de valores de estiramento carboxilato para menores frequências apontam para a interação eletrostática entre os poliânions (COO^-) do SA com grupos amino carregados positivamente (NH_3^+) do CS (Hamedi et al., 2019). Além disso, a banda larga entre 3524 e 3084 cm^{-1} nos espectros de NPs pode ser atribuída aos grupos hidroxila e amino de SA e CS e às ligações de hidrogênio (Hamedfar et al., 2023; Ho et al., 2009). Nesta região, nos espectros vibracionais dos AA-NPs, também é possível identificar bandas características em 3414, 3280 e 3165 cm^{-1} atribuídas às vibrações de estiramento O-H de AA, confirmando sua presença nas AA-NPs. No espectro de AA-NPs comparado ao espectro NPs (branco), também é possível observar que o pico em 1637 cm^{-1} para AA-NPs é atribuído à superposição do grupo carboxilato em alginato e dos grupos amina/amida em CS. Esses resultados provaram que os grupos carboxilato de ALG ($-\text{COO}^-$) reagem com os grupos amino protonados de CS ($-\text{NH}_3^+$) por interação eletrostática para formar o complexo polieletrólito (Hamedi et al., 2019). A banda de absorção em 1690 para AA-NPs pode ser atribuída a $\nu\text{C}=\text{O}$ e $\nu\text{C}=\text{C}$ do anel lactona de AA (Hamedi et al., 2019). Esta banda desviou-se do espectro vibracional do AA livre, possivelmente devido à interação dos grupos hidroxila e carbonila do AA com a matriz polimérica, sugerindo que as ligações de hidrogênio contribuíram para o aprisionamento físico do AA nas nanopartículas obtidas. No entanto, a ligação covalente do AA com o grupo amino do CS não pode ser completamente descartada (Kosaraju et al., 2006).

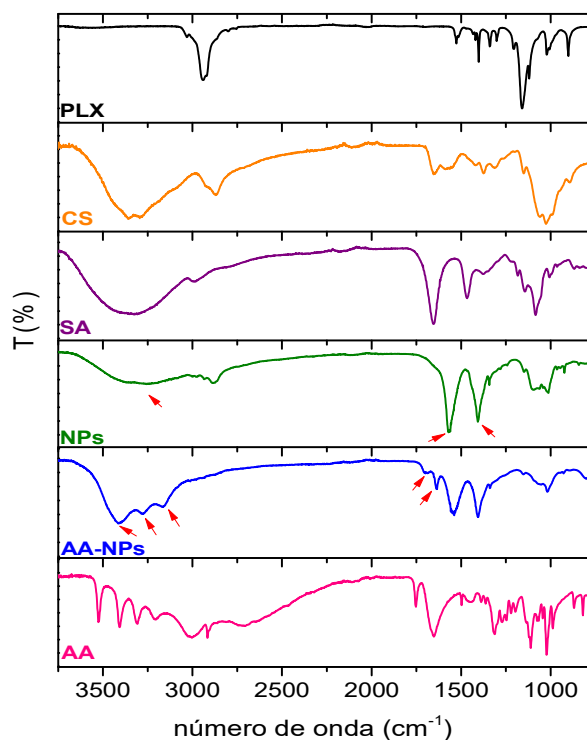


Figura 27: Espectros de PLX, CS, SA, NPs não carregados (NPs), NPs carregados com AA (AA-NPs) e AA. As setas vermelhas no espectro de NPs indicam as bandas $\nu(\text{O} - \text{H})$, $\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$ e $\nu_{\text{sim}}(\text{COO}^-)$, enquanto em AA-NPs, as setas vermelhas designam as bandas características de AA nesta nanoformulação.

7.2.1.2 Calorimetria Diferencial de Varredura

As nanopartículas liofilizadas do branco (sem ativo) e das AA-NPs (com ativo), bem como os polímeros precursores foram analisados por Calorimetria Diferencial de Varredura e os termogramas DSC das amostras e polímeros são mostrados na **Figura 28**.

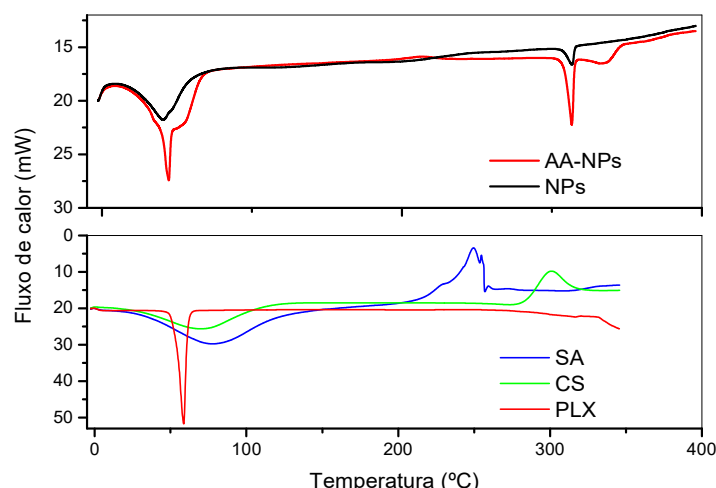


Figura 28: Termogramas DSC de NPs em branco (NPs), NPs carregados com AA (AA-NPs) e dos precursores (polímeros PLX, SA e CS). Taxa de aquecimento 10.00°C/min (Perkin – Elmer Pyris Diamond DSC).

As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) forneceram informações sobre a interação entre os polímeros e o ácido ascórbico nas NPs. As NPs não carregadas e NPs carregadas com AA exibiram picos endotérmicos iniciais a 40,5 e 44,7 °C, respectivamente, que podem ser atribuídos à evaporação da água absorvida (X. Li et al., 2009). Ao comparar os polímeros puros com as NPs, observou-se que a desidratação das NPs ocorreu em temperaturas mais baixas e dentro de uma faixa de temperatura mais estreita. Isto sugere que os NPs podem ter menor absorção de água devido a modificações estruturais durante o estabelecimento do complexo polieletrólítico (PEC). A formação de PEC leva a uma menor disponibilidade de grupos amino carboxilato de alginato e quitosana, que interagem fortemente com moléculas de água. O pico de desidratação mais estreito também pode indicar uma área superficial reduzida ou uma estrutura interna mais organizada das NPs do que os polímeros precursores. Os termogramas das NPs(branco) e das AA-NPs apresentaram ainda um segundo evento endotérmico em cerca de 313 °C que pode estar associado à degradação do PEC pela quebra das interações iônicas entre alginato e quitosana (X. Li et al., 2009). Esse evento ocorreu em temperatura maior do que o segundo evento térmico para os polímeros CS e SA, o que poderia indicar maior estabilidade das NPs quando comparado aos polímeros. Além disso, NPs carregadas com AA também apresentaram um terceiro evento endotérmico centrado em 336,2 °C, que pode corresponder à decomposição do AA encapsulado após ruptura da matriz polieletrólítica.

7.2.1.3 Tamanho de partícula, Pdl e potencial Zeta

Os diâmetros hidrodinâmicos médios e os valores de polidispersividade, os ZP das NPs do branco e das NPs carregadas com AA (0 a 20 mg) foram medidos pelos métodos DLS e mobilidade eletroforética, respectivamente. As leituras de cada parâmetro e de cada amostra foram feitas em triplicatas. Os gráficos de distribuição de tamanho médio das partículas e os gráficos de distribuição de ZP de cada sistema são mostrados nas **Figuras 29 e Figura 30**. As médias dos valores juntamente com os respectivos desvios padrões seguem descritos na **Tabela 24**. Os dados estatísticos das análises de tamanho de partícula fornecidos pelo equipamento, encontram-se no **Anexo 1**.

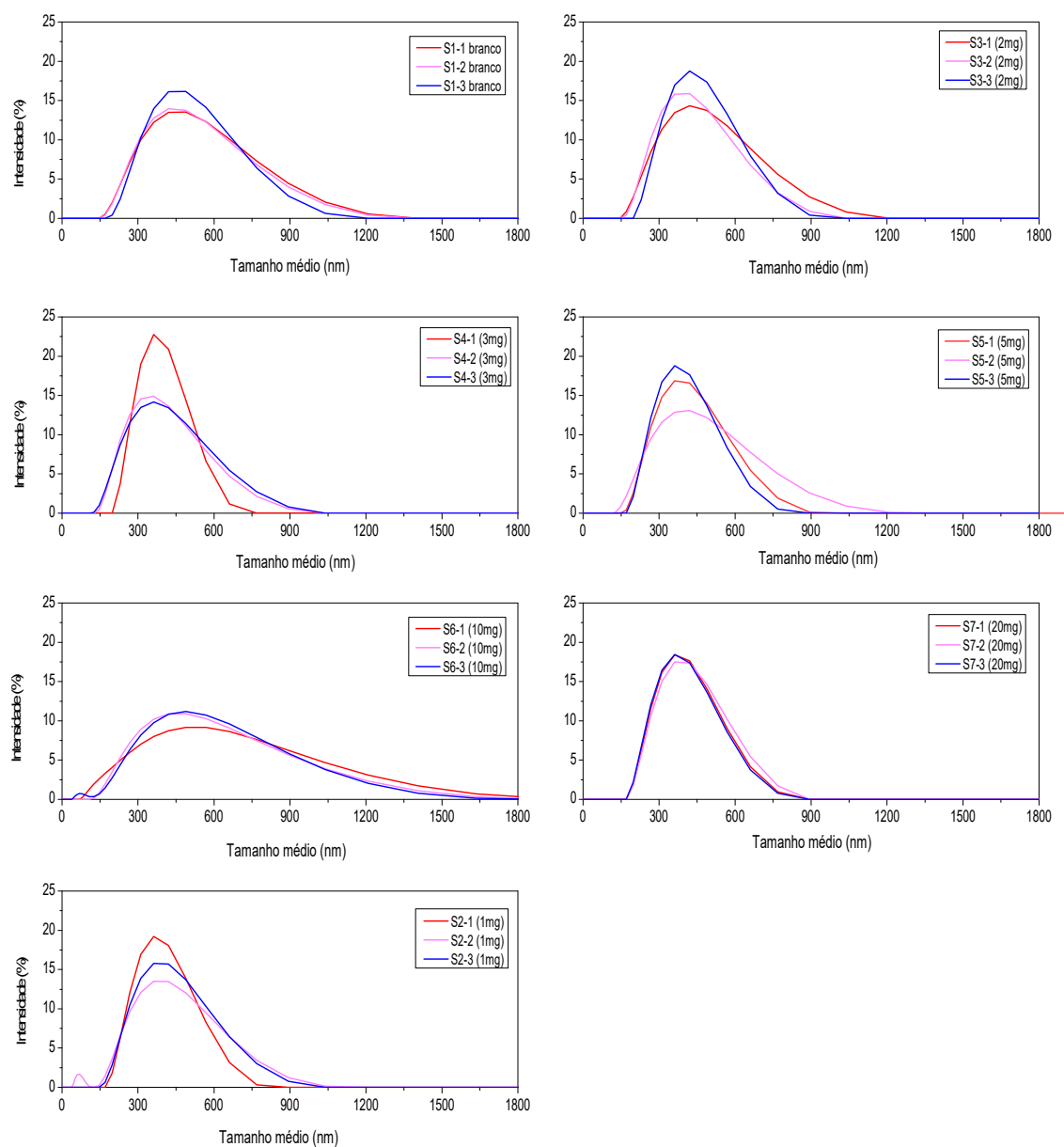


Figura 29: Distribuição do Tamanho médio das partículas dos sistemas S1 a S7.

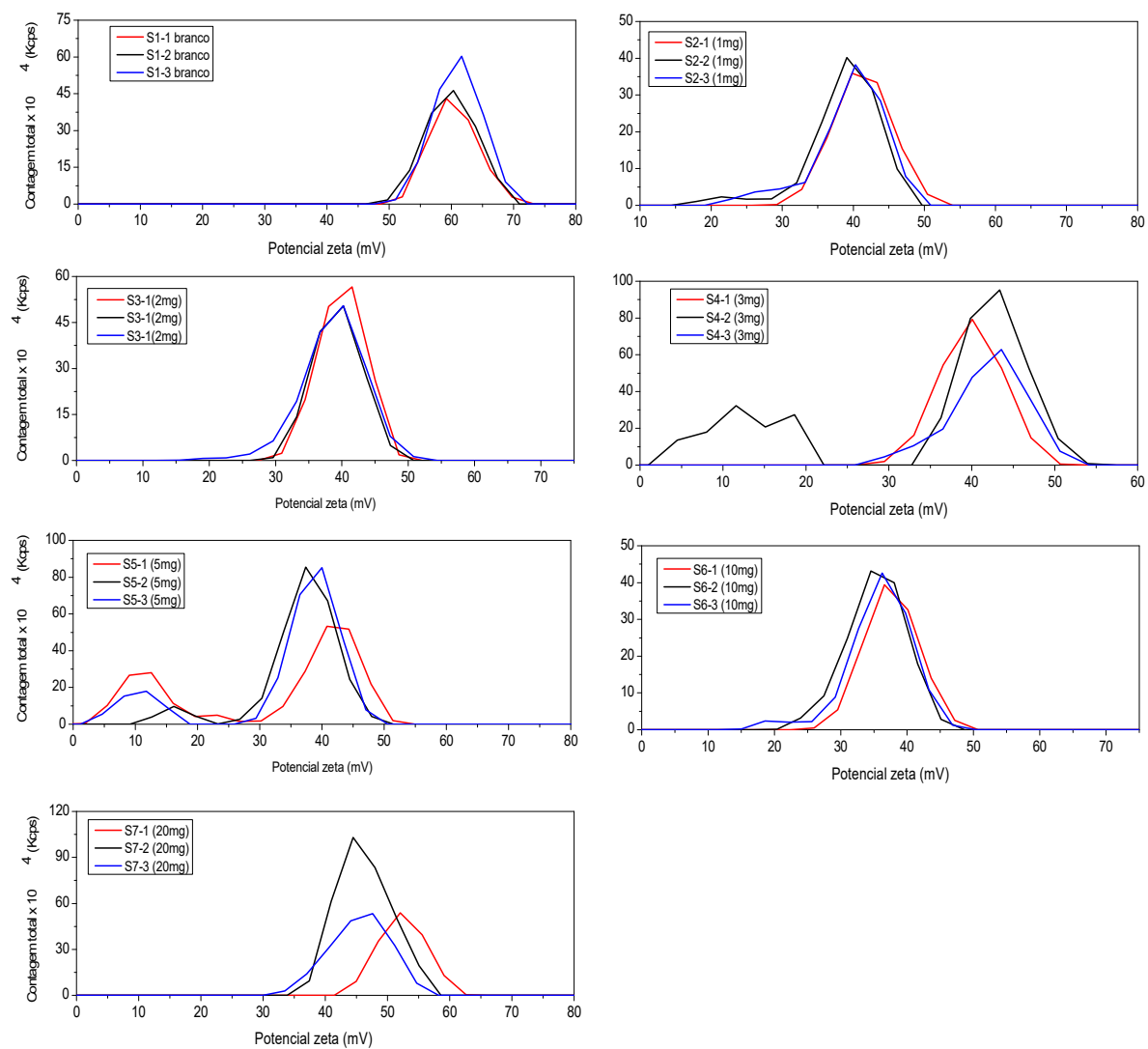


Figura 30: Distribuição do Potencial Zeta das partículas dos sistemas S1 a S7

Tabela 24: Dados de tamanho médio de partícula, Pdl e Potencial Zeta (ZP) com os respectivos desvios-padrão para as NPs obtidas.

Sistema	Massa de AA adicionada (mg)	Tamanho de partícula (nm) $\pm$ dp	Pdl $\pm$ dp	ZP (mV) $\pm$ dp
1	0	446 $\pm$ 5 ^a	0,38 $\pm$ 0,06 ^a	+47.3 $\pm$ 4.3 ^a
2	1	291 $\pm$ 8 ^b	0,32 $\pm$ 0,03 ^b	+39.8 $\pm$ 1.3 ^b
3	2	336 $\pm$ 8 ^c	0,27 $\pm$ 0,01 ^b	+39.4 $\pm$ 0.6 ^b
4	3	318 $\pm$ 18 ^c	0,18 $\pm$ 0,06 ^c	+39.3 $\pm$ 3.0 ^b
5	5	318 $\pm$ 1 ^c	0,24 $\pm$ 0,04 ^b	+34.1 $\pm$ 2.4 ^c
6	10	367 $\pm$ 7 ^d	0,28 $\pm$ 0,01 ^b	+36.2 $\pm$ 1.2 ^{bc}
7	20	399 $\pm$ 2 ^c	0,29 $\pm$ 0,01 ^b	+52.3 $\pm$ 1.0 ^d

Nota: Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os diferentes NPs. Os dados foram analisados por ANOVA unidirecional seguido pelo teste post hoc de Tukey, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As NPs do branco apresentaram um diâmetro hidrodinâmico médio de 446 nm, enquanto os diâmetros hidrodinâmicos médios das NPs carregadas com AA variaram de 291 a 399 nm. A diferença no tamanho das partículas entre as NPs do branco e as carregadas com AA pode ser devido aos grupos hidroxila do AA que podem interagir com os grupos amina da quitosana por meio de ligação iônica, conforme evidenciado pelas análises de FTIR. Esta interação leva a reticulações adicionais na matriz polieletrólítica, o que poderia reduzir um pouco a mobilidade da cadeia, resultando em NPs menores e mais compactas (Xiaolin et al., 2009). Os tamanhos médios obtidos para NPs carregados com AA são adequados para aplicação tópica, conforme demonstrado por alguns estudos na literatura (Chellappan et al., 2019; Raszewska-famielec, 2022).

O Pdl indica a uniformidade do diâmetro das partículas em uma solução. Valores de Pdl igual ou inferior a 0,3 indicam uma distribuição homogênea do tamanho das partículas no sistema (Danaei et al., 2018). Em nossos estudos, os valores de Pdl das NPs carregadas com AA variaram de 0,18 a 0,32, indicando uma distribuição uniforme do tamanho das partículas. No entanto, as NPs do branco apresentaram um valor de Pdl de 0,38; indicando uma pequena heterogeneidade neste sistema, mas ainda aceitável de acordo com alguns pesquisadores (Shah et al., 2014).

O ZP é um parâmetro físico-químico que fornece a carga superficial dos NPs e auxilia na estabilidade das nanoformulações. Um potencial Zeta mínimo em módulo de 30 mV é desejável para evitar a agregação de NPs devido às forças eletrostáticas repulsivas entre eles (C. Lunardi et al., 2021). Em nossos estudos, os valores de potencial Zeta de NPs do branco e das NPs carregadas com AA são positivos e maiores que 30 mV (**Tabela 24**), o que indica boa estabilidade coloidal dos sistemas preparados. Os valores de potencial Zeta positivo medidos para NPs preparados são

coerentes com o uso de quitosana em excesso durante a preparação de NPs. As análises indicam uma boa uniformidade nos sistemas preparados, especialmente no que se refere a otimização do método e parte experimental.

7.2.1.4 Determinação da eficiência de encapsulamento dos fármacos e da capacidade de carga das nanopartículas

As quantidades de AA encapsulado foram medidas diretamente em NPs para determinar os valores de %EE e %LC usando um método colorimétrico espectrofotométrico, conforme descrito na seção 7.2.1.2. Um método para medir AA diretamente em NPs foi escolhido porque AA é instável em solução (Golubitskii et al., 2007) e abordagens que garantam sua estabilidade máxima devem ser empregadas.

Para determinação do %EE nas NPs foi utilizada curva de calibração com os parâmetros anteriormente descritos (seção 6.2.1). Os resultados obtidos sobre a eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carga (LC) das NPs com diferentes quantidades de AA (1 a 20 mg) adicionadas no processo de preparação são apresentados na **Tabela 25**.

Tabela 25: Valores de eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carga (LC) para cada sistema de NPs

Sistema	Massa(mg)de AA adicionada	EE (%)	LC (%)
1	0	—	—
2	1	26,4±0,7 ^a	0,16±0,01 ^a
3	2	16,8±1,0 ^b	0,20±0,01 ^a
4	3	15,7±1,1 ^c	0,28±0,01 ^b
5	5	13,0±0,8 ^c ^d	0,39±0,02 ^c
6	10	10,2±0,9 ^e	0,62±0,05 ^d
7	20	12,1±0,2 ^d	1,45±0,02 ^e

Nota: Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os diferentes NPs. Os dados foram analisados por ANOVA unidirecional seguido pelo teste post hoc de Tukey, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Os valores %EE para as NPs carregadas de AA foram avaliados como baixos a moderados (10–27%). De fato, altas taxas de encapsulamento para AA não são esperadas devido à sua alta solubilidade em água e elevada reatividade em solução, dificultando seu encapsulamento (Comunian et al., 2020; Memom et al., 2000). O maior valor de %EE (27%) foi encontrado para o sistema com a menor quantidade de AA adicionada (S2, 1 mg). Foi observado que os valores de

%EE para AA diminuíram com o aumento das quantidades adicionadas de AA e se estabilizaram em cerca de 12% para S5–S7 (Figura 31).

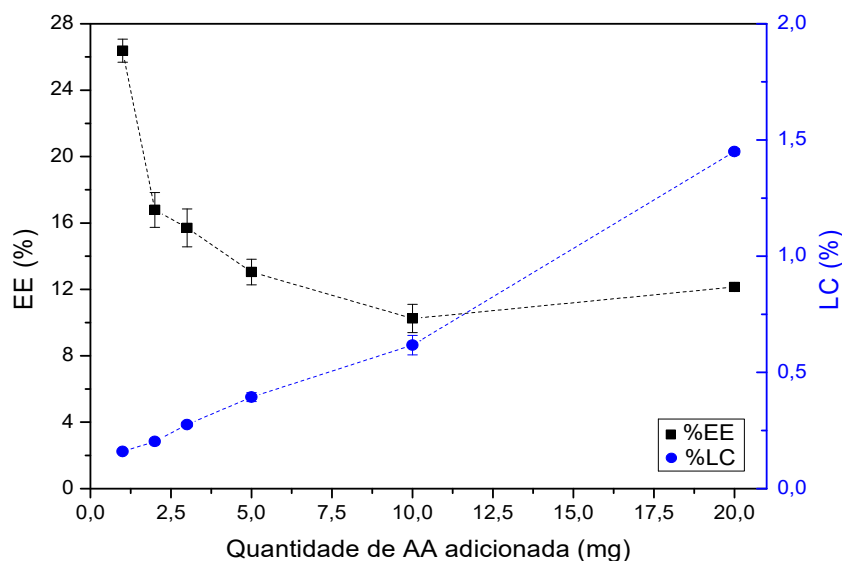


Figura 31: %EE (quadrados pretos) e %LC (círculos azuis) em função da quantidade de AA adicionada durante o processo de preparação de NPs. Os resultados são expressos como médias $\pm$ sd, $n = 3$

A **Figura 31** mostra que o aumento da quantidade de AA leva a um aumento proporcional na carga geral do fármaco, seguindo uma relação linear com um coeficiente de regressão próximo de 1 ($R^2 = 0,9965$). O experimento realizado neste trabalho não nos permitiu encontrar um ponto de saturação para o encapsulamento de AA nos NPs de PEC CS-ALG preparados. Há também uma relação crescente entre o tamanho das partículas e o carregamento de AA que parece seguir um padrão exponencial (ver **Figura 32**). Isto sugere que quanto maior a quantidade de moléculas de AA encapsuladas na matriz polimérica, mais moléculas de água estão associadas à matriz. Isto é ainda apoiado pela análise DSC, que revela um ombro centrado a 55°C, que pode estar associado a moléculas de água interagindo com o AA encapsulado dentro da matriz.

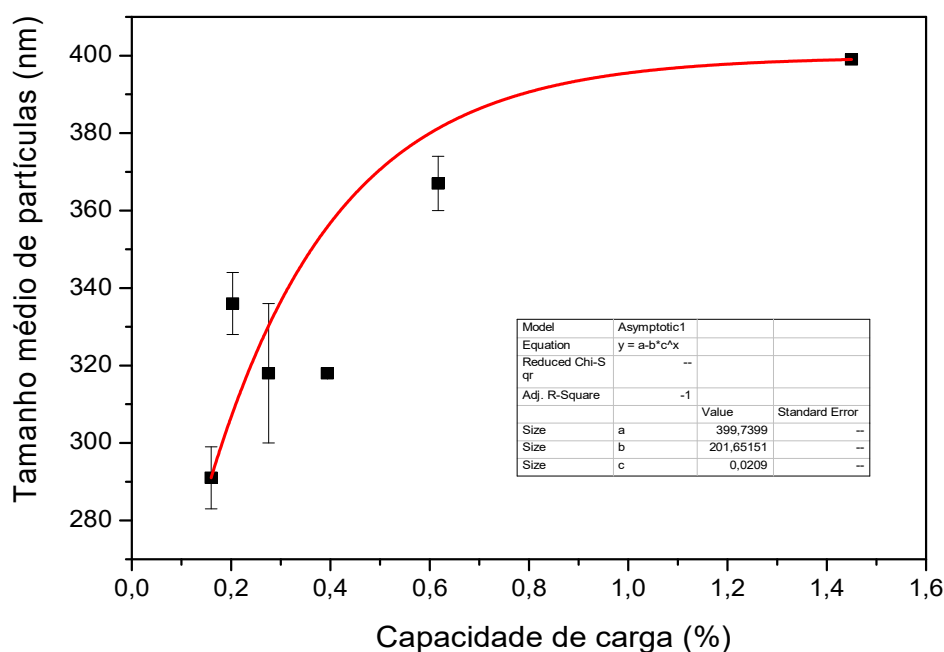


Figura 32: Relação entre tamanho médio de partículas e % de capacidade de carga (%LC).

7.2.1.5 Determinação da liberação controlada de AA e estudo da cinética de liberação

Para estudos de liberação de AA, usamos as NPs do sistema 7 devido à carga mais significativa de AA. Conforme empregado para a determinação do encapsulamento, o método colorimétrico usando íons ferro (III) e fenantrolina também foi aplicado para o estudo de entrega de AA para garantir que todo o AA liberado pudesse ser medido adequadamente. Com o objetivo de avaliar como os NPs carregados se comportam ao entregar AA sob condições relevantes para o corpo, conduzimos estudos de entrega em sistemas de tampão com pH 5,5 (de acordo com o pH da pele) e 7,4 (de acordo com o pH do sangue) (Nawaz et al., 2022; Salamanca et al., 2018). Escolhemos pH 5,5 para avaliar a liberação do ativo para aplicação tópica, pois a superfície da pele tem um pH ligeiramente ácido variando de 4,5 a 6,5 (Schmid-Wendtner & Korting, 2006). O tampão com pH 7,4 é comumente usado em sistemas de entrega de fármacos para simular o pH fisiológico do sangue humano e da maioria dos fluidos corporais (Alishahi et al., 2011; Íspir et al., 2024; Postolovic et al., 2022). Para esses estudos, construímos duas curvas de calibração no tampão HEPES em pH 5,5 e 7,4, representadas nos gráficos da Figura e os parâmetros das curvas de calibração estão na **Figura 33** e **Tabela 26** respectivamente.

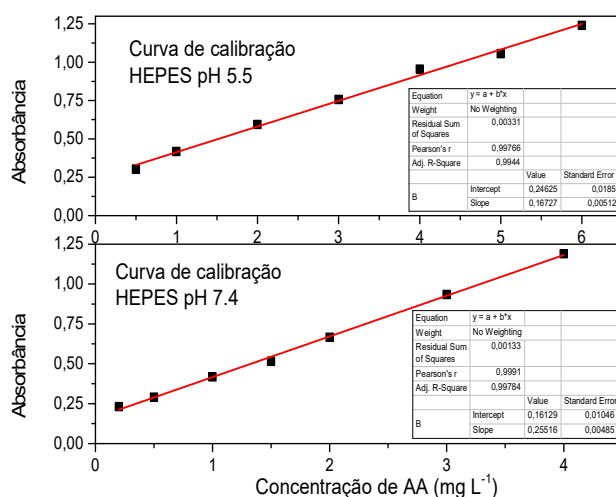


Figura 33: Gráfico da regressão linear da curva de calibração de AA (método colorimétrico em pH 5,5 e em pH 7,4)

Tabela 26: Parâmetros da curva de calibração construída a partir dos dados da espectroscopia UV-Vis do complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ em pH 5,5 e em pH 7,4

Princípio ativo	Substância detectada pelo UV-Vis	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	Faixa da curva de calibração ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Equação de regressão	Coefficiente de determinação (R^2)
AA em pH 5,5	$[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$	510	0,5-6	$y = 0,167x + 0,246$	0.995
AA em pH 7,4	$[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$	510	0,5-6	$y = 0,255x + 0,161$	0,998

*A is the absorbance at 510nm; c is the concentration of AA in $\mu\text{g mL}^{-1}$

Os comportamentos de liberação cumulativa de AA *in vitro* a partir das NPs carregadas com AA (S7) em HEPES pH 5,5 e 7,4 a 37°C sob condições sink são mostrados na **Figura 34**. As NPs carregadas com AA exibiram uma liberação mais lenta de AA em condições neutras (pH 7,4) em comparação com as ácidas (pH 5,5), provavelmente devido à estabilidade variável do CS-SA PEC em diferentes níveis de pH. Em condições ácidas, a quitosana tem seus grupos amina protonados, aumentando sua solubilidade. Além disso, os grupos carboxila do alginato são menos ionizados em um meio ácido, enfraquecendo a interação do alginato com a quitosana. Portanto, em ambientes ácidos, o CS-SA PEC tende a ter um grau de inchaço maior, dissolvendo-se parcialmente e levando a uma liberação mais rápida do AA encapsulado.

A meia-vida de liberação do fármaco ($t_{50\%}$) é o tempo necessário para que 50% de um fármaco seja liberado da forma farmacêutica, e é a melhor variável *in vitro* em correlação com a atividade *in vivo* (Gohary & Gamal, 1991). Para liberação de AA de NPs preparados (S7), $t_{50\%} =$

2,5h no meio ácido, e $t_{50\%}$ é aproximadamente 8h no tampão neutro, indicando que esta nanoformulação é adequada para aplicação de curto prazo.

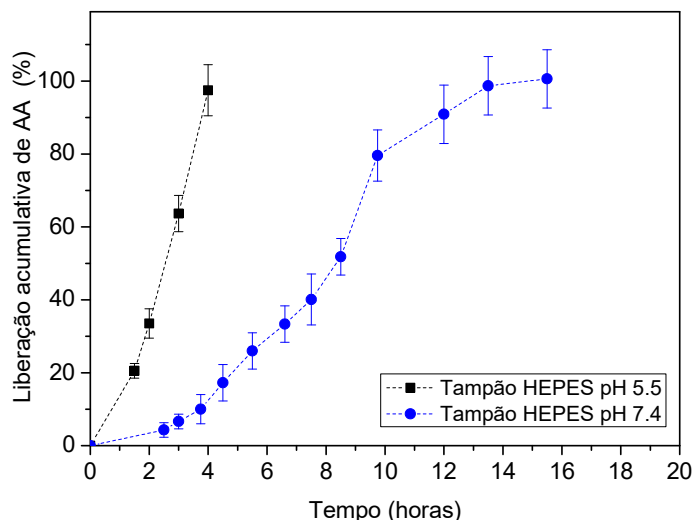


Figura 34: Perfil de liberação *in vitro* de AA de NPs (S7) em tampão HEPES 5.5 (quadrados pretos) e 7.4 (círculos azuis) sob condições sink a 37°C. Os resultados são expressos como médias $\pm$ dp, n = 3.

Para estudar o mecanismo de liberação de AA das NPs preparadas (S7) em pH (5,5 e 7,4), quatro modelos cinéticos (ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas) foram aplicados aos dados de dissolução do AA e os gráficos de ajustes aos modelos estão no anexo 2. A **Tabela 27** mostra os coeficientes de determinação (R^2), constantes de taxa (k) e valor do expoente difusional (n) obtidos dos modelos cinéticos mencionados acima. Com base na análise do coeficiente de regressão (**Tabela 27**), a liberação de AA dos NPs preparados em meios ácidos e neutros pode ser melhor descrita usando o modelo Korsmeyer-Peppas e os gráficos que mostram ajustes a esse modelo estão representados nas **Figuras 35 e 36**.

Tabela 27: Valores do coeficiente de determinação (R^2), constantes de velocidade (k) e expoente difusional (n) para quatro modelos cinéticos de liberação de fármacos.

Valor do pH	Ordem Zero		Primeira ordem		Modelo de Higuchi		Modelo de Korsmeyer-Peppas		
	$k_0(h^{-1})$	R^2	$k_1(h^{-1})$	R^2	$k_H(h^{-1/2})$	R^2	$k_{KP}(h^{-n})$	n	R^2
5,5	30,88	0,9936	0,613	0,9274	99,343	0,9633	10,694	1,623	0,9984
7,4	9,287	0,9482	0,277	0,7721	48,290	0,8987	0,718	2,031	0,9801

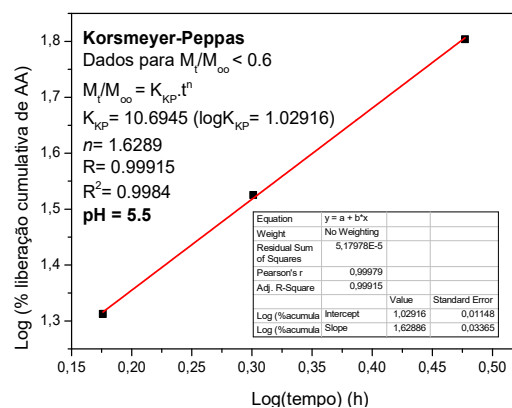


Figura 35: Gráfico dos dados da liberação de AA em pH 5,5 ajustados ao modelo Korsmeyer-Peppas para descrever a cinética de liberação do AA a partir das NPs

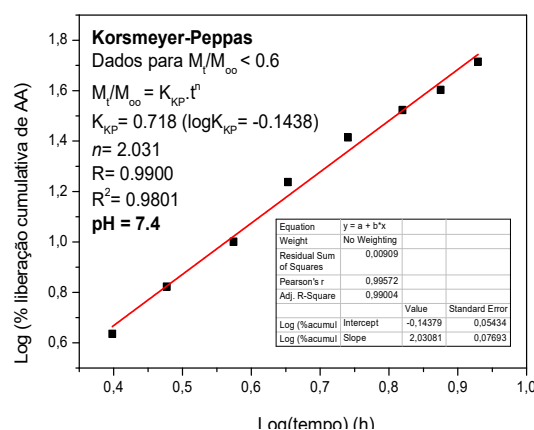


Figura 36: Gráfico dos dados da liberação de AA em pH 7,4 ajustados ao modelo Korsmeyer-Peppas para descrever a cinética de liberação do AA a partir das NPs

O modelo Korsmeyer-Peppas descreve a liberação de fármacos de sistemas poliméricos e estabelece uma relação exponencial entre a liberação de fármacos e tempo (Mathematical Models of Drug Release, 2015). Este modelo é aplicado para liberação fracionada menor que 0,6 (60% da liberação do fármaco) porque descreve os estágios iniciais da liberação do fármaco de uma matriz polimérica antes que fenômenos complexos como relaxamento ou inchaço do polímero dominem o processo.

Neste estudo, este modelo foi aplicado para determinar o parâmetro mais significativo que impacta a taxa de liberação de AA (inchaço do polímero, difusão da substância incorporada ou degradação do polímero (Lobo & Costa, 2001). Para $n > 0,85$ (para sistemas com geometria esférica), a liberação segue um mecanismo de transporte super caso-II, ou seja, a liberação do fármaco é mais rápida do que o mecanismo de relaxamento simples, possivelmente devido ao

inchaço do polímero. Os valores de n obtidos durante a liberação de AA nos tampões ácidos ($n = 1,623$) e neutros ($n = 2,031$) indicam que a liberação foi condicionada principalmente pelo inchaço e relaxamento macromolecular das cadeias poliméricas. Além disso, o padrão de liberação de AA de NPs preparados no tampão ácido (pH 5,5) também se ajusta à cinética de ordem zero ($R^2=0,9936$), uma vez que ocorre a uma taxa de liberação constante ao longo do tempo. O padrão de liberação para liberação de AA de NPs no tampão neutro (pH 7,4) também se ajusta à cinética de ordem zero, especialmente quando % da liberação cumulativa de AA é menor que 60% ($R^2=0,9791$).

O mecanismo de transporte super caso-II é frequentemente associado à cinética de liberação de ordem zero, na qual o relaxamento e o inchaço do polímero resultam em uma taxa de liberação de fármaco constante ao longo do tempo (Laracuate et al., 2020; Maria et al., 2021). O transporte super caso-II é altamente desejável em muitas aplicações terapêuticas, pois mantém uma concentração de liberação de fármaco consistente no local alvo ao longo do tempo, evitando liberação repentina de fármaco. Para aplicação tópica de AA, os NPs obtidos podem garantir a estabilidade do AA durante tratamentos de curto prazo, uma vez que o AA é gradualmente administrado a uma taxa constante e a liberação completa do AA é obtida em 4 horas (pH 5,5).

7.2.1.6 Utilização do complexo polieletrólítico SA-CS para encapsular ácido ferúlico.

Metodologia similar a descrita na seção 7.1.1 foi utilizada para encapsulamento de ácido ferúlico (FcA), usando 20 mg de FcA. As NPs apresentaram ZP de aproximadamente 58mV, tamanho de partículas médio de 400nm e Pdl inferiores a 0,4. Contudo, os valores de %EE foram muito baixos (em média 3,6%). Sendo assim, considerando que o zinco é um metal de grande importância na indústria cosmética, sintetizamos um complexo de zinco com FcA, $[Zn(FcA)_2]$. Nosso objetivo foi de alterar as propriedades físico-químicas do ativo a fim de promover maior encapsulamento, além de agregá-lo ao zinco, proporcionando uma ação complementar de cuidado com a pele. O complexo preparado foi caracterizado usando FTIR, análise elementar e ESI-MS. A síntese e a caracterização desse complexo se encontram descritas no **apêndice 2**.

7.3 Conclusões

As nanopartículas de pluronic® F127 revestidas por complexo polieletrólítico de quitosana-alginato carregadas com AA foram preparadas com seis quantidades distintas de AA. As NPs preparadas apresentam tamanho de partícula variando de 291 a 399 nm com Pdl menor que 0,32 e

ZP maior em módulo que 34 mV, indicando estabilidade física, uniformidade e potencial para entrega eficaz de AA. O tamanho de partícula mostrou uma relação crescente com a carga de AA com um padrão exponencial aparente. A eficiência de encapsulamento das NPs preparadas foi determinada diretamente nas NPs, encontrando-se valores baixo a moderado (10–27%), conforme esperado para moléculas altamente hidrofílicas e instáveis como o AA. A capacidade de carga do AA dentro da matriz das NPs aumenta proporcionalmente com a quantidade de AA adicionada durante a preparação. Além disso, os estudos de liberação do medicamento em pH 5,5 ($t_{50\%}=2,5h$) e 7,4 ($t_{50\%}\sim 8h$) demonstraram cinética de liberação de ordem zero com um mecanismo de transporte super caso II, o que sugere que os NPs preparados podem ser incorporados em um sistema de administração tópica de curto prazo para a liberação sustentada de AA.

**CAPÍTULO 8 - POLOXAMER-407 QUIMICAMENTE CONJUGADO AO ÁCIDO
FERÚLICO PARA ENCAPSULAMENTO E ESTABILIZAÇÃO DE ATIVOS SENSÍVEIS À
OXIDAÇÃO**

8.1 Parte experimental

Neste capítulo vamos abordar o processo de modificação química do polímero biodegradável Pluronic-F127 para conjugá-lo ao ácido ferúlico visando obter um polímero com propriedades antioxidantes para ser aplicado em produtos cosméticos como carreador de outros ativos.

8.1.1 Síntese

A modificação estrutural do PLX para incorporação de ácido ferúlico (FcA) à estrutura do polímero foi realizada adaptando-se procedimento descrito na literatura para conjugação do ácido fólico ao PLX (Hongguang Lu, Xiaowei Zhao, Wenjing Tian, 2014; Jia-jyun Lin et al., 2009). Em um balão de fundo redondo foram dissolvidos 2,0 mmol de ácido ferúlico (FcA) em 30 mL de DMSO previamente seco com uso de peneira molecular e foram adicionados 2,2 mmol CDI (1,1'-Carbonildiimidazol). O sistema foi mantido em agitação magnética, protegido da luz, em temperatura ambiente por 24 horas. À solução resultante foram adicionados 0,5 mmol de PLX. O sistema obtido foi então mantido, protegido da luz, em agitação magnética à temperatura ambiente por mais 24h. Posteriormente, a solução foi transferida para um tubo de diálise (MWCO 1000), onde foi mantida em processo de diálise por 3 dias em água deionizada, trocando a água 1 vez por dia, para remoção de moléculas pequenas que não reagiram com o pluronic (dmsO, ácido ferúlico, CDI etc). O produto resultante (PLX-FcA) foi recuperado por evaporação em banho-Maria a 40°C, estocado em dessecador e protegido da água. Amostras do PLX-FcA foram encaminhadas para análises RMN de ^1H , IV, TG, DSC para caracterização do produto PLX-FcA. O esquema das principais reações da conjugação do FcA ao PLX está apresentado na **Figuras 37**. A partir da síntese e das proporções de reagentes utilizadas a estrutura sugerida é a apresentada na **Figura 38** onde parte com destaque azul refere-se ao ácido ferúlico enquanto em preto refere-se ao polímero PLX.

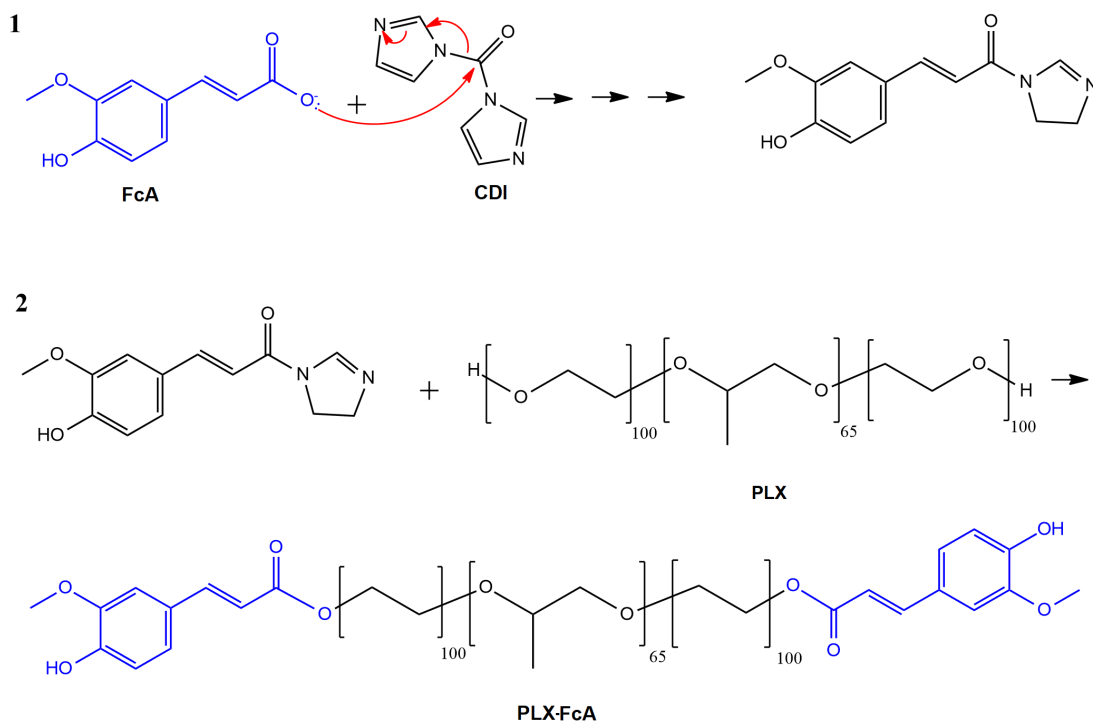


Figura 37: Representação esquemática das principais reações para conjugação do PLX-FcA.

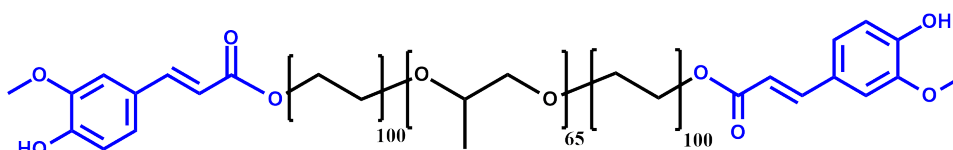


Figura 38: Estrutura química do FcA-PLX.

8.1.2 Preparo das amostras para caracterização das nanopartículas

Parte da amostra no estado sólido foi encaminhada para análise de espectroscopia na região do infravermelho, termogravimetria, calorimetria diferencial de varredura e ressonância magnética nuclear. Soluções de concentração 1 mg mL^{-1} de PLX e PLX modificado foram preparadas em água ultrapura para análise de tamanho de partículas. Soluções aquosas também foram preparadas para análise por espectrofotometria UV-Vis.

8.1.3 Teste de estabilidade

Quantidades do polímero comercial (PLX) e do polímero modificado (PLX-FcA) foram mantidas em uma placa de Petri e mantidas por aproximadamente 30 dias em estufa a 45°C e 80% de umidade relativa. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo e enviadas para análise por espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Amostras também foram coletadas para serem analisadas em espectrofotometria UV-Vis a 312 nm, a fim de monitorar a banda de absorção

referente ao FcA. Para essa análise, uma solução de 5mL foi preparada a partir de 5mg da amostra coletada utilizando água ultrapura. Essa preparação de amostra e avaliação foi realizada a cada intervalo de tempo.

8.2 Resultados e discussão

8.2.1 Caracterização do Pluronic conjugado ao ácido ferúlico (PLX-FcA)

As propriedades físico-químicas do PLX-FcA preparado podem ser melhor compreendidas a partir das análises de caracterização realizadas.

8.2.1.1 Espectrometria vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia vibracional foi utilizada para confirmar a conjugação do ácido ferúlico ao polímero. Para tanto, foram obtidos os espectros vibracionais do FcA, PLX e do PLX-FcA (**Figura 39**).

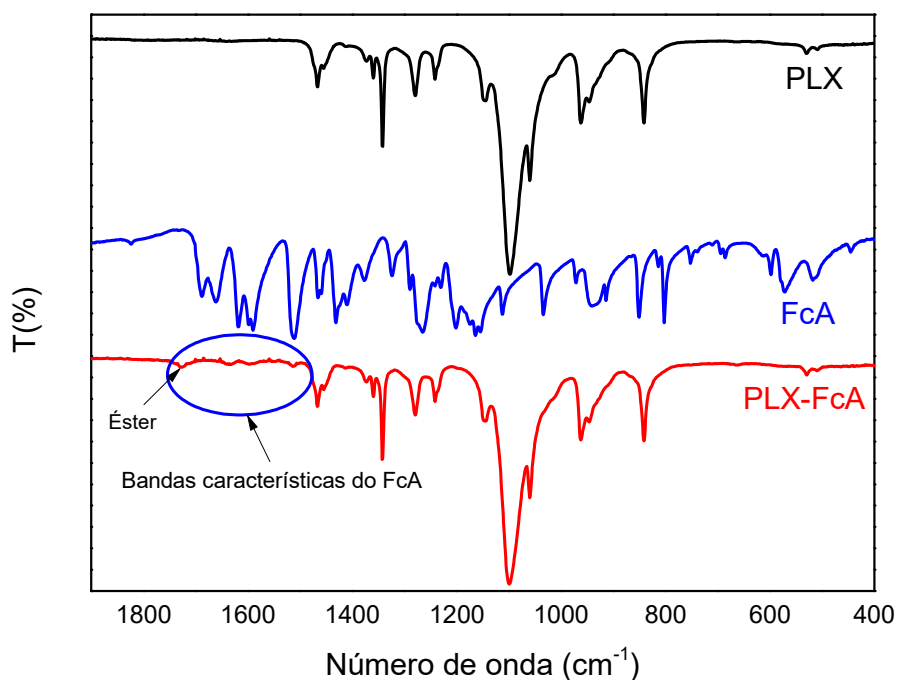


Figura 39: Representação gráfica do espectro vibracional do PLX, FcA e do PLX-FcA.

O espectro do ácido ferúlico possui uma banda intensa 3436 cm^{-1} , referente a deformação axial do grupamento OH do ácido carboxílico, e os picos em 1517 e 1433 cm^{-1} correspondem as vibrações das ligações simples e duplas dos carbonos, sendo associados ao anel aromático do fármaco (KIM et al. 2013). O espectro do FcA apresenta uma banda em 1207 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico do C-O-C do éter associado ao anel FcA. O espectro do FcA mostra ainda bandas características de vibrações de estiramento do grupo carbonila C=O, $\nu(\text{C=O})$ $1688\text{--}1661\text{ cm}^{-1}$ e vibrações fora do plano do grupo carboxílico, (OH)COOH 942 cm^{-1} e (C=O) 572 cm^{-1} . No espectro vibracional do PLX-FcA pôde-se observar bandas características do ácido ferúlico e a banda referente à formação do éster em 1727 cm^{-1} , devido à conjugação do ácido carboxílico ao polímero formando a função orgânica éster. As bandas no espectro vibracional do PLX-FcA referente à presença do FcA são de baixa intensidade devido à pequena massa de FcA comparada à de PLX, pois a conjugação do FcA ao PLX ocorre apenas nas subunidades terminais do polímero (Figura 38)

8.2.1.2 Análise por Ressonância Magnética nuclear

Em consonância com a espectroscopia vibracional, o estudo de ressonância magnética nuclear também indica a presença do FcA na estrutura do PLX modificado. A Figura 40 mostra a análise de RMN de ^1H do polímero PLX e a Figura 41 do PLX-FcA, onde é possível observar sinais característicos do FcA no polímero modificado.

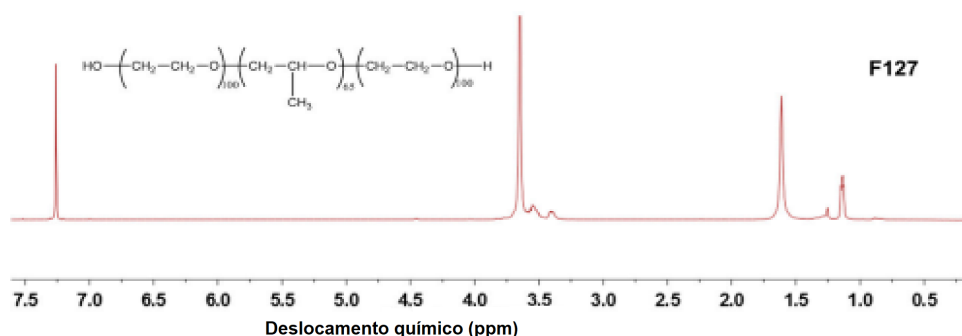


Figura 40: Representação gráfica da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H do polímero PLX. Adaptada de (Dou et al., 2016)

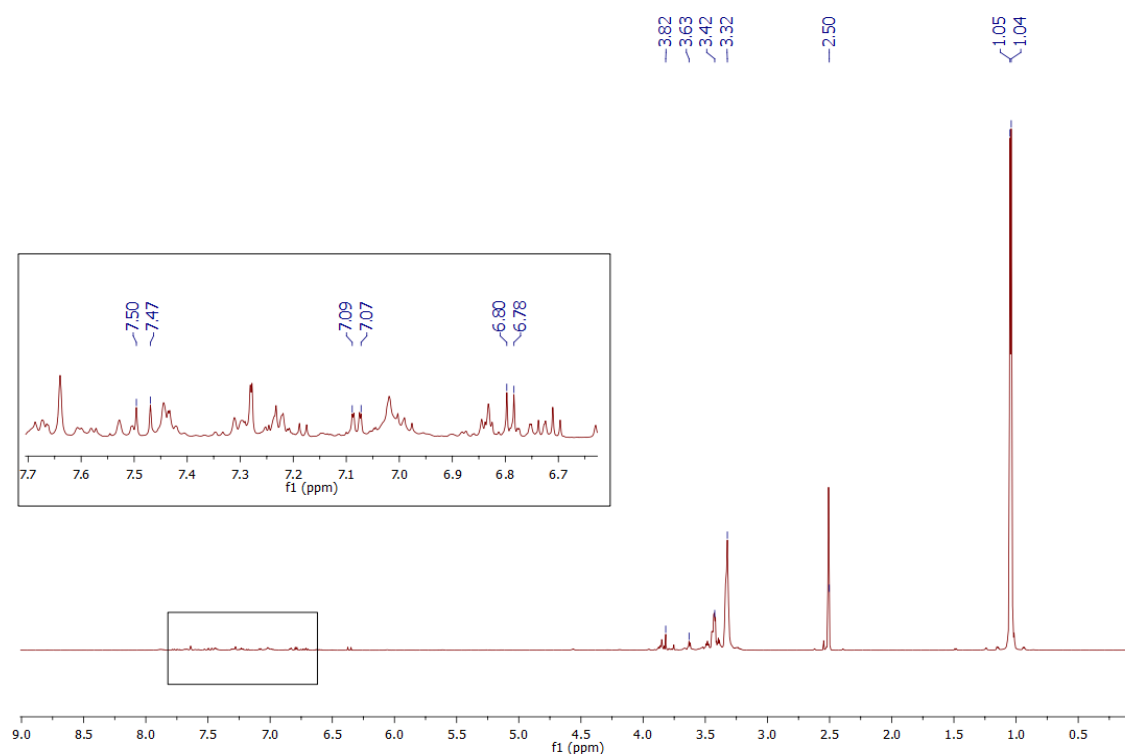


Figura 41: Representação gráfica da Representação gráfica da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H do polímero PLX-FcA.

O PLX não possui em sua estrutura a presença de hidrogênios ligados a anéis aromáticos, portanto os sinais que aparecem com deslocamento químico entre 6,5 e 8 ppm (ampliação na Figura 41) devem-se aos hidrogênios aromáticos e carbonos insaturados do FcA. Assim como no espectro vibracional do PLX-FcA, os sinais referentes ao FcA são de baixa intensidade devido a pequena quantidade de FcA em relação ao PLX e os sinais entre 6,5 e 8ppm no PLX-FcA devem-se a

carbonos insaturados do FcA. O sinal em 7,25 ppm do PLX (referente ao H da hidroxila) não aparece no RMN ^1H do PLX-FcA indicando a desprotonação. O sinal referente ao hidrogênio do ácido carboxílico do FcA em torno de 12ppm também não foi observado no RMN ^1H do PLX-FcA. O sinal observado em 3,82ppm é devido aos hidrogênios do grupo metoxilo (CH_3O) do FcA. O RMN ^1H do FcA livre possui ainda sinais referentes aos hidrogênios de carbonos aromáticos ou insaturados em 7,52; 7,30; 7,11; 6,82 e 6,39 ppm. Sinais com deslocamentos químicos similares são observados no RMN ^1H do PLX-FcA, confirmando a presença do FcA no PLX.

8.2.1.3 Espectroscopia Eletrônica na Região do Ultravioleta-visível

Soluções aquosas de FcA, PLX e PLX-FcA foram analisadas por espectroscopia eletrônica na região UV-Vis. As soluções foram preparadas com água ultrapura e foram realizadas varreduras na faixa de 200-500nm no espectrofotômetro UV-Vis (**Figura 42**).

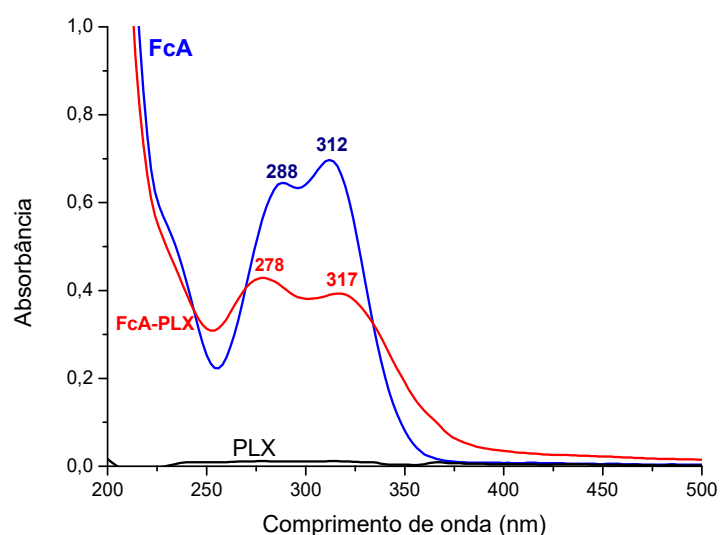


Figura 42: Espectros eletrônicos (Ultravioleta-Visível) do PLX ($1,27 \times 10^{-5}$ mol.L), PLX-FcA ($1,27 \times 10^{-5}$ mol.L) e ácido ferúlico ($2,54 \times 10^{-5}$ mol.L).

A análise espectrofotométrica na região UV-Vis foi realizada a fim de confirmar a modificação do pluronic. Podemos observar bandas de absorção em regiões similares entre FcA e PLX-FcA, mas com deslocamentos importantes (**Figura 42**). O FcA possui duas bandas de absorção principais que podem ser atribuídas às transições $\pi-\pi^*$ associadas ao sistema conjugado de ligações duplas da estrutura do FcA que ocorre em 312 nm e uma banda $n-\pi^*$ referente a transições devido a excitação de elétrons não ligantes (n) presentes no oxigênio no grupo hidroxila (OH) do anel aromático que ocorre em 288nm. Ao conjugar-se ao PLX há um deslocamento dessas bandas (**Figura 42**), que confirma que ocorreu uma modificação na estrutura do FcA.

8.2.1.4 Análise por termogravimetria

A análise termogravimétrica do PLX-FcA comparada a do PLX (**Figura 43**) indicou que o polímero modificado apresentou maior estabilidade térmica que o polímero comercial. O processo de degradação térmica do PLX inicia-se em 185°C, enquanto do PLX-FcA esse processo iniciou-se em uma temperatura superior a 230°C. Além de indicar maior estabilidade térmica do PLX-FcA em relação ao PLX, este estudo corrobora para o fato que ocorreu uma efetiva modificação química do PLX dado à diferença das curvas de decomposição térmica dos compostos.

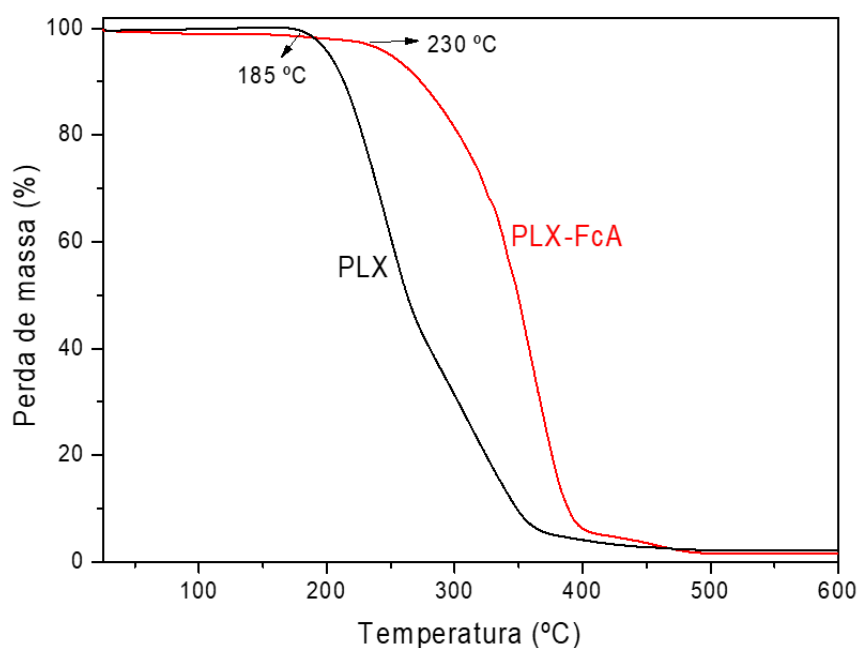


Figura 43: Representação gráfica do resultado da análise termogravimétrica do PLX e do PLX-FcA.

8.2.1.5 Calorimetria Diferencial de Varredura

Amostras de PLX e PLX-FcA foram analisadas por Calorimetria Diferencial de Varredura e os termogramas DSC são mostrados na **Figura 44**.

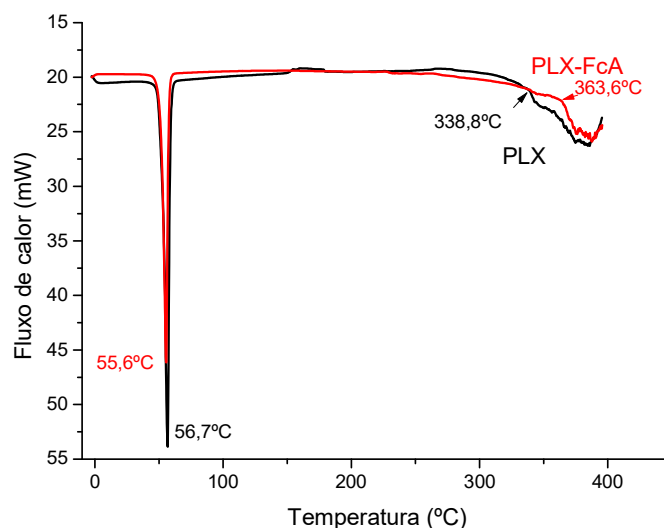


Figura 44: Termogramas DSC de PLX e PLX-FcA. Taxa de aquecimento 10.00°C/min (Perkin – Elmer Pyris Diamond DSC).

Os termogramas de DSC do PLX e PLX-FcA apresentaram eventos térmicos em temperaturas similares. A primeira transição em 56°C para PLX-FcA e 58,7°C para PLX deve-se a evaporação de moléculas de água. A degradação térmica do polímero iniciou-se em 338°C para PLX e em 364°C para PLX-FcA, indicando uma estabilidade térmica ligeiramente maior do PLX-FcA em relação ao polímero comercial.

8.2.1.6 Estudo da estabilidade do polímero em testes de degradação acelerada

A exposição ao calor, umidade e luz são fatores importantes de serem estudados, dado que influenciam na estabilidade de formulações farmacêuticas e cosméticas e, consecutivamente, na eficácia do produto. Assim, o polímero comercial (PLX) e o polímero modificado (PLX-FcA) foram submetidos à testes acelerados de estabilidade de armazenamento com monitoramento semanal por espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Os polímeros foram submetidos a 45°C e 80% de umidade por 30 dias, observou-se que com 21 dias de exposição o PLX degradou-se, enquanto a estrutura química do PLX-FcA permaneceu inalterada (**Figura 45**). Esse resultado corrobora com a análise térmica que mostrou que o PLX-FcA possui maior estabilidade térmica que o PLX.

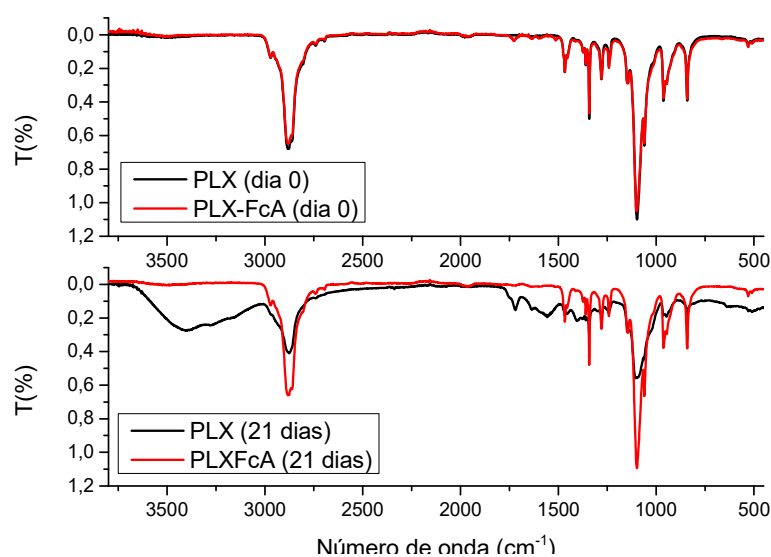


Figura 45: Representação gráfica dos espectros vibracionais do PLX e do PLX-FcA submetidos a teste de degradação acelerada.

A maior estabilidade do PLX-FcA em testes de degradação acelerada é um importante parâmetro para indicar o tempo de prateleira de produtos. Portanto, um ativo encapsulado no PLX-FcA possuirá um tempo de prateleira superior ao mesmo ativo encapsulado em PLX.

8.2.1.7 Atividade antioxidante

O método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi utilizado para determinação da atividade antioxidante do polímero modificado e foi constatado que a conjugação do FcA ao PLX conferiu ao polímero resultante uma nova propriedade de atuar como um agente antioxidante, o que pode ser de crucial importância para aplicação do PLX-FcA no encapsulamento de ativos sensíveis a oxidação (**Figura 46**).

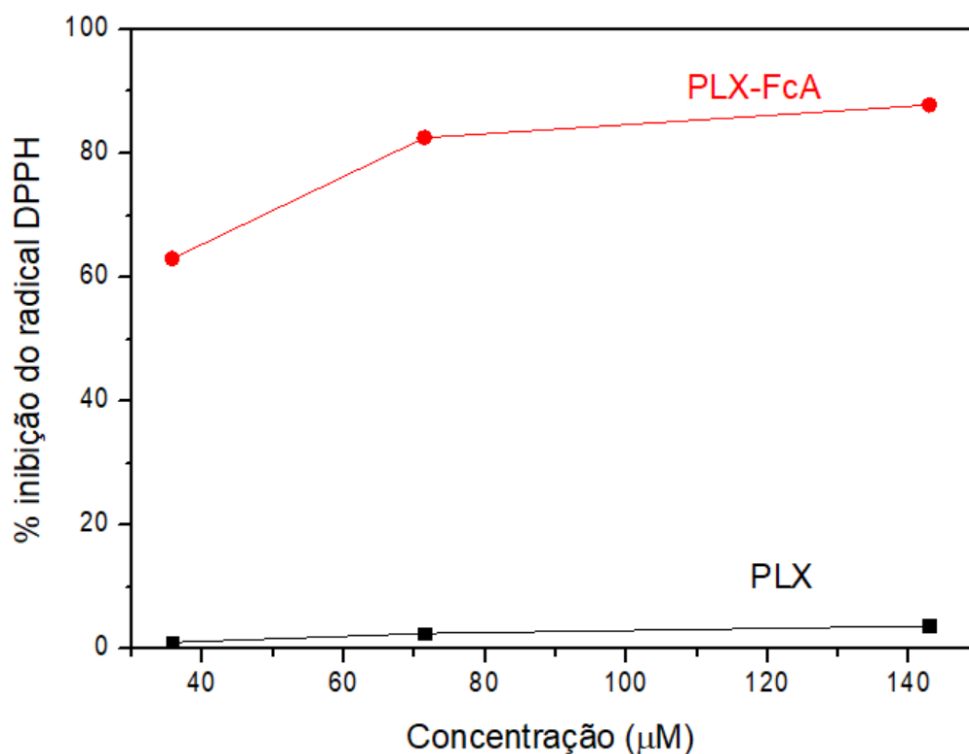


Figura 46: Representação gráfica dos padrões de atividade antioxidante (teste com DPPH) do polímero Pluronic puro e do pluronic modificado (PLX-FcA).

8.2.1.8 Análise de tamanho de partícula

A modificação química realizada no PLX para formação do polímero modificado PLX-FcA causou mudanças no modo como esses polímeros se organizam em solução aquosa. A análise de tamanho de partículas (em triplicata) formadas por PLX indicou que 55% das partículas apresentam tamanho médio de 9,8nm (**Figura 47**). Além disso, partículas com distribuição bastante heterogênea que correspondem a 36,0% com tamanho médio de 640nm e um terceiro grupo também heterogêneo com tamanho médio de 269nm correspondendo a aproximadamente 9%. O PLX-FcA apresentou a maioria das partículas (88,5%) com tamanho médio de 199nm e também apresentou uma pequena porção de micelas de tamanho na faixa de 31,3nm (11,5%). Pela **Figura 47** é possível observar que as nanopartículas e/ou aglomerados formados pelo PLX-FcA em solução aquosa apresentaram distribuição de tamanho mais homogêneas que o PLX. A distribuição mais homogênea de partículas de PLX-FcA provavelmente deva-se ao estabelecimento de interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio entre os monômeros.

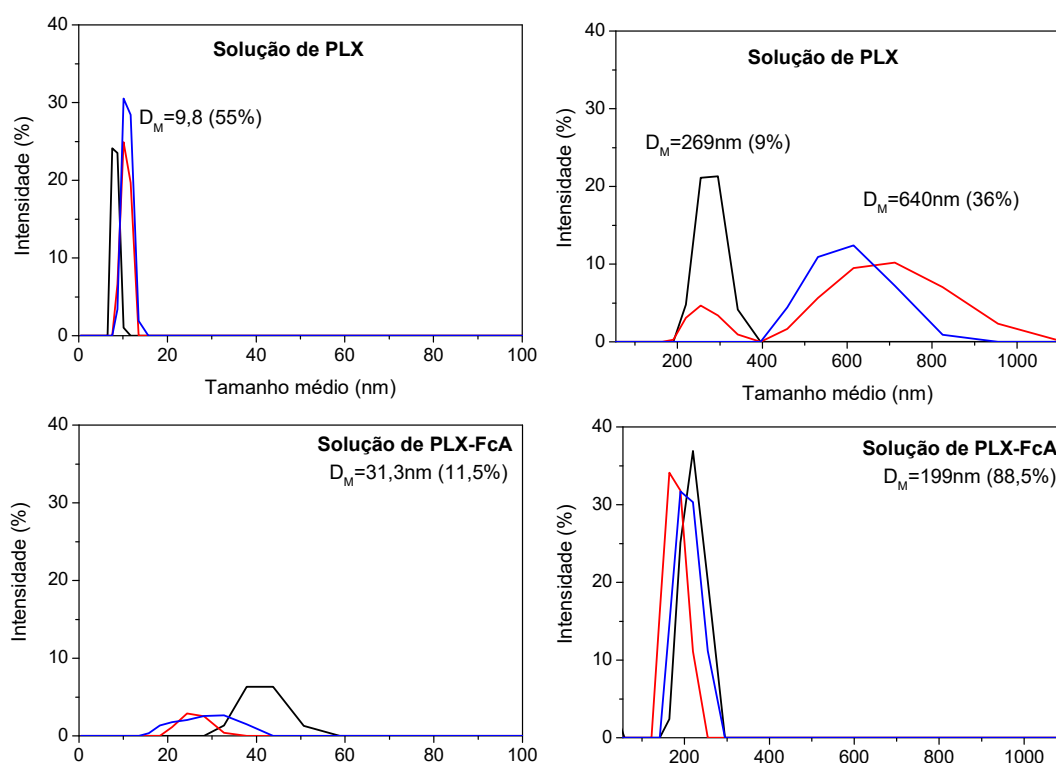


Figura 47: Distribuição do Tamanho médio das partículas (triplicata) formadas a partir de soluções aquosas de PLX e de PLX-FcA .

8.3 Conclusão

Análises de espectroscopia vibracional, eletrônica e de ressonância magnética nuclear indicaram que foi possível obter o polímero modificado. As análises térmicas por termogravimetria e calorimetria exploratória indicaram que o PLX-FcA apresenta estabilidade térmica superior ao PLX. Por meio de testes de degradação acelerada foi possível confirmar que o PLX-FcA apresentou maior resistência ao calor e à umidade, o que pode indicar maior tempo de prateleira comparado ao PLX. A presença do ácido ferúlico na estrutura do polímero modificado conferiu atividade antioxidante ao PLX-FcA, possibilitando que o polímero modificado possa ser capaz de estabilizar de forma mais efetiva ativos sensíveis à oxidação. A organização do PLX-FcA em solução aquosa apresentou partículas de tamanho mais homogêneas que do PLX, provavelmente devido à possibilidade de formar ligações de hidrogênio entre monômeros. Devido à atividade antioxidante, maior estabilidade térmica e maior tempo de prateleira, o polímero modificado da presente invenção pode ser aplicado para encapsulamento de ativos sensíveis à oxidação no preparo de produtos farmacológicos e/ou cosméticos.

O processo de obtenção do polímero modificado PLX-FcA gerou uma patente que foi depositada sobre o número BR 10 2024 015953 5.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nanoformulações de baixo custo e de simples preparo foram desenvolvidas neste trabalho e uma delas apresentou potencial para ser empregada como sistema polimérico biocompatível para encapsular ácido ascórbico, um ingrediente ativo de interesse da indústria dermocosmética.

A nanoformulação à base de Poloxamer 407 e alginato de sódio apresentou limitações importantes, mas foi capaz de encapsular os ativos niacinamida e ácido ascórbico livres e complexados ao zinco. O desafio é melhorar a estabilidade das nanopartículas formadas e otimizar o método desenvolvido por meio, por exemplo, do uso da ultrahomogeneização para obtenção de nanopartículas com tamanho mais uniforme. O complexo desenvolvido de zinco com ácido ascórbico e niacinamida pode ser encaminhado para testes de segurança (toxicidade, irritabilidade), estabilidade e eficácia, sendo assim, seu potencial para atuação na cosmetologia mais explorado.

A nanoformulação à base de poloxamer 407 encoberto com complexo polieletrólítico formado por quitosana e alginato de sódio apresentou tamanho de nanopartículas mais uniforme e com valores de potencial Zeta que indicam estabilidade do sistema. Essa nanoformulação foi capaz de encapsular o ativo ácido ascórbico promovendo uma liberação controlada desse ativo em meios que simularam o pH da pele e do sangue. Contudo, essa formulação mostrou-se inadequada para encapsular o ácido ferúlico. Esse nanossistema pode futuramente ser avaliado para encapsulamento de outros ativos livres ou complexados, incluindo o complexo de ácido ferúlico com zinco que foi sintetizado e caracterizado neste trabalho.

A conjugação química do ácido ferúlico ao poloxamer 407 resultou em um polímero modificado com propriedades de estabilidade aprimoradas em relação ao polímero de partida e com potencial para ser aplicado no encapsulamento de ativos sensíveis a oxidação. As propriedades desse polímero modificado podem ainda ser exploradas para o desenvolvimento de dispositivos poliméricos para encapsulamento de ingredientes ativos sensíveis à oxidação como muitos óleos essenciais, por exemplo. Contudo, são necessários mais estudos para compreender o comportamento desse novo polímero no encapsulamento de ativos.

O trabalho desenvolvido é relevante, não apenas pelas nanoformulações desenvolvidas e o preparo inédito de um polímero com propriedades antioxidantes, mas, por trazer também uma alternativa para lidar com a questão da difícil quantificação do ácido ascórbico encapsulado e liberado, devido sua rápida degradação em meio aquoso. O método de quantificação desenvolvido tem potencial para quantificar outros ativos redutores em outros sistemas.

APÊNDICES

Apêndice 1: Síntese do Complexo de zinco com ácido ascórbico e niacinamida (Complexo 1)

1.1 Parte experimental de síntese de Complexo 1

O procedimento adotado para preparo do complexo foi adaptado da literatura (Basu et al., 2021)(Basu et al., 2021). Brevemente, dissolveram-se 10 mmol (1,7619 g) de ácido ascórbico(AA), 10 mmol(1,2213) de niacinamida(NA) e 5 mmol (1,0980 g) de acetato de zinco diidratado em 10 mL de água destilada com o auxílio do banho ultrasônico por 5 minutos. A solução resultante foi deixada a temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, dentro de aproximadamente 15 dias observou-se formação de precipitado marrom escuro que foi filtrado, lavado com água mili-Q e encaminhado para caracterização. A estrutura sugerida para o complexo sintetizado está apresentada na Figura 1.1.

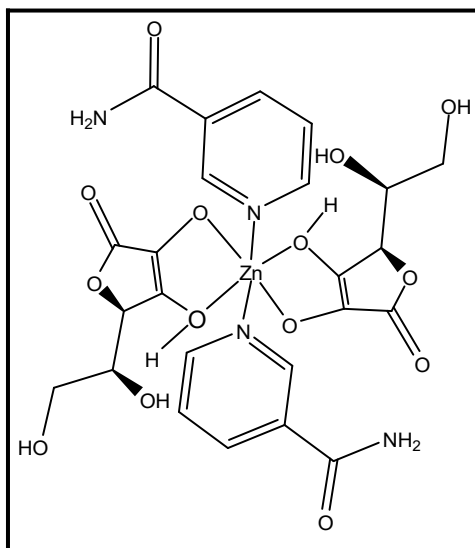


Figura 1.1: Estrutura 1 proposta para o complexo de zinco(II) (1)

1.2 Resultados e Discussão

Caracterização do complexo

Um novo complexo de zinco(II) contendo ascorbato (HAA) e nicotinamida (NA) foi isolado de uma solução aquosa como um sólido marrom escuro e encaminhado para análises.

Análise elementar

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas e os resultados estão descritos na Tabela 1.1.

Tabela 1.1- Porcentagens elementares de C, H e N do complexo

Fórmula química (MM)	%C Exp. (Calc.)	%H Exp. (Calc.)	%N Exp. (Calc.)	Erro(%)
[Zn(C ₆ H ₇ O ₆) ₂ (C ₆ H ₆ N ₂ O) ₂] – complexo 1 (659,86 g.mol ⁻¹)	41,88 (43,68)	3,73 (3,97)	7,86 (8,49)	C(4,13%) H(6,05%) N(7,48%)

Análise condutimétrica

A análise condutimétrica do complexo foi realizada utilizando uma solução de concentração 1×10^{-3} mol.L⁻¹ do complexo em DMSO e a constante de célula com valor de 0,8 cm⁻¹. Na Tabela 1.2 são apresentados os valores de condutividade molar aferidos.

Tabela 1.2- Valores de condutividade molar do solvente DMSO e complexo.

Composto	Condutividade(μS/cm)
DMSO	3,06
Complexo 1	2,61

O complexo comporta-se como não eletrólito, uma vez que a condutividade molar medida está abaixo do valor comumente atribuído a eletrólito 1:1 (65-90 μS/cm) (Geary, 1970). De fato, espera-se esse comportamento de não eletrólito, uma vez que o ácido ascórbico complexou-se ao zinco(II) como ascorbato na proporção 1:2 (metal:HAA) e a niacinamida complexou-se de forma neutra ao zinco.

Análise da temperatura de fusão

A análise da temperatura de fusão do complexo foi realizada e o valor encontrado juntamente com os valores tabelados para seus precursores se encontram na Tabela 1.3 (Duan et al., 2008; Moreschi et al., 2009; Yohann Corvis et al., 2013).

Tabela 1.3 - Valores tabelados de temperatura de fusão para os precursores e valor encontrado para o complexo 1.

Composto	Temperatura de fusão (°C)
Niacinamida	130–133
Ácido ascórbico	191–197
Acetato de zinco	242–245
Complexo 1	122-129

O complexo 1 apresentou ponto de fusão diferente de seus precursores; portanto, confirma-se que o produto não trata-se de uma mistura física dos ligantes livres com o sal de Zn(II).

Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia vibracional foi utilizada para auxiliar na proposição dos modos de coordenação dos ligantes ao zinco(II). Para tanto, também foram obtidos os espectros vibracionais dos ligantes livres. Os espectros do ácido ascórbico livre e do complexo estão ilustrados na Figura 1.2 e o espectro da niacinamida livre e do complexo na Figura 1.3 e propostas de atribuição das principais bandas do AA, NA e do complexo estão descritos na Tabela 1.4.

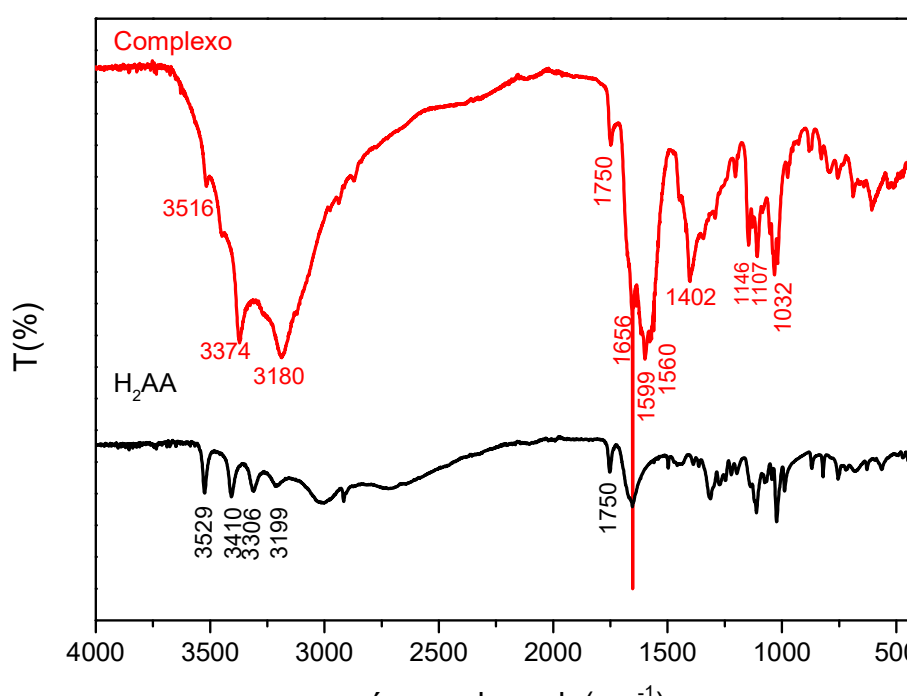
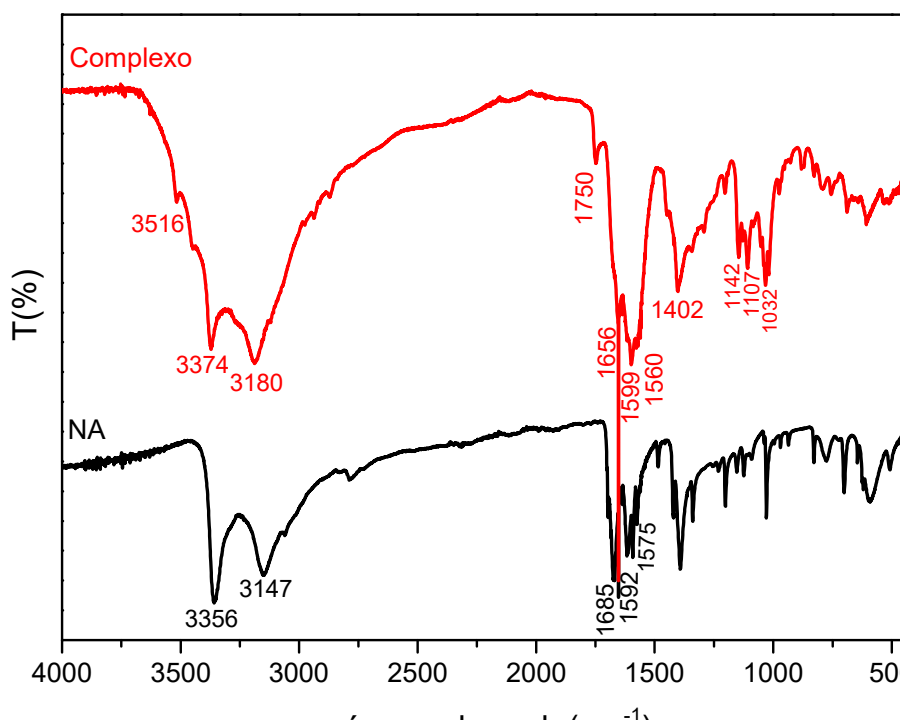


Figura 1.2: Espectro vibracional do AA e do complexo **1**.



Figura

1.3: Espectro vibracional do NA e do complexo 1

Tabela 1.4: Propostas de atribuição das principais bandas do AA, NA e do complexo 1

Atribuições	Principais bandas (cm ⁻¹)		
	AA	NA	Complexo
v(O-H)	3529, 3410, 3306 e 3199	-	3516, 3374, 3180
v(C=O) _{éster}	1750	-	1750
v(C-C) _{aromático}	-	1592	1599
v(C=N) _{aromático}	-	1575	1560
v _{as} (NH ₂) + v _s (NH ₂);	-	3356, 3147	3374, 3180
v(C=O) _{amida}	-	1685	1656

v-estiramento v_{as}-estiramento assimétrico v_s-estiramento simétrico

A espectroscopia vibracional foi usada para confirmar a desprotonação de AA e o modo de ligação dos ligantes ao íon zinco no complexo. O espectro FTIR do AA livre exibe bandas de absorção em 3529, 3410, 3306 e 3199 cm⁻¹ atribuídas aos 4 grupos O-H (hidroxila) presentes na molécula do ácido ascórbico livre. Assim, a ausência de uma banda em 3306 cm⁻¹ no espectro FTIR do complexo é um indicativo da desprotonação de um grupo hidroxila de AA (pKa1 4,1) e seu provável envolvimento na coordenação ao zinco(II). A banda em 1750 cm⁻¹ que corresponde à vibração de estiramento do grupo carbonila do AA livre (V. Sreeja; K. N. Jayaprabha; P. A. Joy,

2014) foi mantida na mesma posição no espectro vibracional do complexo, o que descarta a possibilidade de coordenação metálica a este grupo.

O espectro vibracional do NA livre apresenta uma banda intensa centrada em 1592 cm^{-1} devido às vibrações de estiramento do anel de piridina, enquanto no complexo essa banda é observada em 1599 cm^{-1} (C. Li et al., 2015; S. Ide, A. Ataç, 2002). A mudança para a frequência mais alta no espectro vibracional do complexo sugere a coordenação da NA através do átomo de nitrogênio do anel piridínico. Além disso, a banda de vibração de alongamento C=N da piridina foi deslocada de um valor de 1575 (em NA livre) para 1560 cm^{-1} após coordenação com o íon zinco(II). Destaca-se também a alteração no comportamento vibracional do grupo amida mediante a coordenação do NA ao zinco(II), embora este grupo não participe diretamente da coordenação metálica (C. Li et al., 2015; S. Ide, A. Ataç, 2002). A banda intensa em 3356 cm^{-1} e a banda de média intensidade em 3147 cm^{-1} no espectro vibracional do NA livre atribuídas respectivamente aos modos de alongamento assimétrico e simétrico do grupo amida NH_2 (Ramalingam et al., 2010), deslocaram-se para 3374 e 3180 cm^{-1} no espectro vibracional do complexo, respectivamente. Adicionalmente, pôde-se observar uma mudança significativa na banda de alongamento vibracional C=O de 1685 cm^{-1} (NA livre) para 1682 cm^{-1} (complexo). Essas modificações na energia vibracional do grupo amida provavelmente se devem ao estabelecimento de novas interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio.

Espectroscopia Eletrônica na Região do Ultravioleta-visível

O complexo também foi analisado por espectroscopia eletrônica, onde foi possível comparar soluções aquosas de mesma concentração dos ligantes livres e do complexo ($6,25 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$), Figura 1.4. As soluções dos ligantes e do complexo foram preparadas usando-se como solvente solução de NaCl $0,05\text{ mol L}^{-1}$ a fim de reproduzir as condições do procedimento de encapsulação nas nanopartículas.

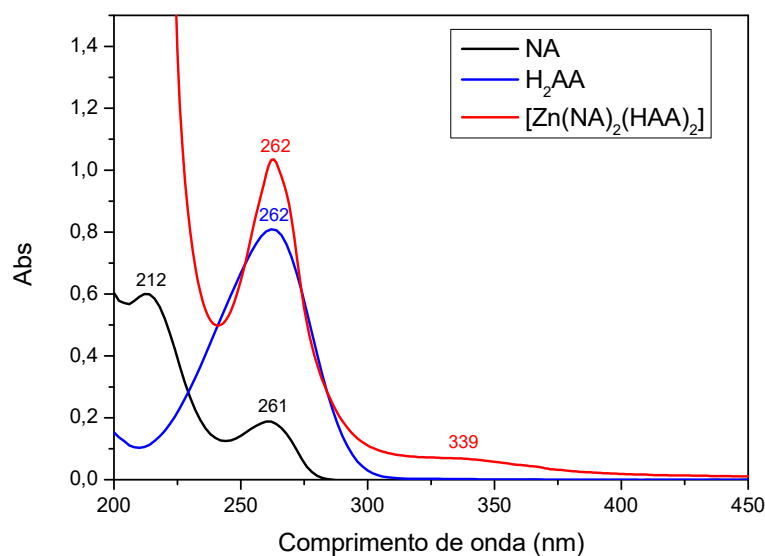


Figura 1.4: Espectros eletrônicos do Complexo **1** e dos ligantes (NA e AA) na concentração de $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em solução aquosa de NaCl $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

A Tabela 1.5 traz os valores das bandas de absorção e dos respectivos valores de absortividade molar do complexo e dos ligantes livres. Os valores de absortividade molar foram calculados empregando-se a lei de Lambert Beer (Equação 1.1).

$$A = \epsilon bc \quad (1.1)$$

Tabela 1.5: Valores das bandas de absorção e de absortividade molar para o complexo **1** e ligantes livres

Composto	λ_1 (nm)	ϵ_1 ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ_2 (nm)	ϵ_2 ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ_3 (nm)	ϵ_3 ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
AA	-	-	262	12.937	-	-
NA	212	9.600	261	3.040	-	-
1	212	53.867	262	16.624	339	1.088

Os sistemas moleculares possuem transições eletrônicas do tipo permitidas e proibidas (Pavia, 2010; Silverstein, 2005; Solomons & Fryhle, 2000). As transições permitidas são atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$, enquanto que as transições proibidas são do tipo $n \rightarrow \pi^*$. Esses tipos de transições geralmente são observados em moléculas heterocíclicas, tais como presentes nas moléculas de piridina, quinolina, isoquinolina entre outras (Assis, 2013; Martinho, 1994; Pavia, 2010; Silverstein, 2005), como no caso da NA, a banda na região de 212nm pode ser atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$ do nitrogênio piridimico.

Tanto o ácido ascórbico quanto a niacinamida possuem bandas de absorção na região do ultravioleta (200 a 400nm). As bandas na região de 262nm devem-se a transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. No caso do AA resulta da excitação eletrônica da ligação C=C (Arıcı et al., 2017), enquanto que no

caso do NA deve-se à aromaticidade do anel piridínico (Markarian & Sargsyan, 2011). Os significativos aumentos nos valores de absortividade molar do complexo nas regiões de 212 e 262 nm são indicativos da coordenação metálica aos ligantes. Somado a isso, o aparecimento de uma nova banda de absorção em torno de 339nm no espectro eletrônico do complexo pode indicar transições do tipo metal-ligante.

1.3 Conclusões

O sólido obtido foi caracterizado em solução e no estado sólido usando análises elementares e condutimétricas; espectroscopia vibracional e eletrônica. Verificou-se que o complexo é solúvel em água e outros solventes polares, como DMSO, metanol e etanol. Os resultados das análises elementares e as espectrométricas auxiliaram na proposição dos sítios de coordenação ao metal e confirmaram a fórmula molecular proposta para o complexo neutro $[Zn(HAA)_2(NA)_2]$. (Figura 1.1)

Apêndice 2: Complexo de zinco com ácido ferúlico (complexo 2)

2.1 Parte experimental

O procedimento adotado para preparo do complexo foi adaptado da literatura (M. Kalinowska, 2014; Selvaraj et al., 2021). Dissolveram-se 2,5 mmol de ácido ferúlico (FcA) em 10 mL de uma solução de bicarbonato de sódio $0,25\text{mol.L}^{-1}$. Gotejaram-se 5mL de cloreto de zinco $0,25\text{mol.L}^{-1}$ sobre a solução preparada de ácido ferúlico e bicarbonato. Um precipitado branco a levemente amarelado foi formado. A solução foi filtrada e o precipitado obtido foi lavado com água ultrapura a temperatura ambiente e encaminhado para caracterização. A Figura 2.1 apresenta a estrutura proposta para o complexo.

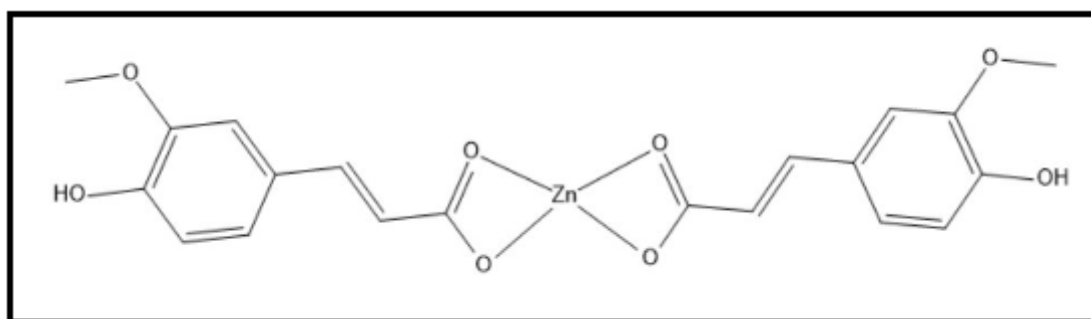


Figura 2.1: Estrutura proposta para o complexo de ferulato de zinco(II) (2)

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Caracterização do complexo 2

Um complexo de zinco(II) contendo ferulato foi isolado de uma solução aquosa como um sólido levemente amarelado e encaminhado para análises.

Análise elementar

Tabela 2.1 - Porcentagens elementares de C,H e N do complexo 2

Fórmula química (MM)	%C Exp. (Calc.)	%H Exp. (Calc.)	%N Exp. (Calc.)	Erro (%)
$[\text{Zn}(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4)_2]$ (451,73 g.mol ⁻¹)	51,58 (53,18)	3,85 (4,02)	1,85% (0,00%)	C(3,01%) H(4,23%)

Análise condutimétrica

A análise condutimétrica do complexo foi realizada utilizando uma solução de concentração $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ do complexo em água e a constante de célula com valor de $1,08 \text{ cm}^{-1}$. Na Tabela 2.2 são apresentados os valores de condutividade molar aferidos.

Tabela 2.2 - Valores de condutividade molar do solvente água e do complexo.

Composto	Condutividade($\mu\text{S/cm}$)
Água	9,49
Complexo 2	18,13

O valor de condutividade encontrado para o complexo 2, $18,13 \mu\text{S/cm}$, indica tratar-se de um composto não eletrólito, uma vez que a condutividade molar está abaixo da faixa comumente atribuída a eletrólitos 1:1 ($65\text{-}90 \mu\text{S/cm}$) (Geary, 1970). Esse resultado está coerente com a estrutura proposta (Figura 2.1), na qual o complexo 2 não apresenta contra-íons.

Análise da temperatura de fusão

A análise da temperatura de fusão do complexo foi realizada e o valor encontrado juntamente com os valores tabelados para seus precursores se encontram na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Valores tabelados de temperatura de fusão para os precursores e valor encontrado para o complexo.

Composto	Temperatura de fusão ($^{\circ}\text{C}$)
Ácido ferúlico	174
Cloreto de zinco	290
Zinco metálico	419
Complexo 2	235

O complexo apresentou ponto de fusão diferente de seus precursores; portanto, confirma-se que o produto não trata-se de uma mistura física dos ligantes livres com o sal de zinco.

Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia vibracional foi utilizada para auxiliar na proposição dos modos de coordenação do FcA ao zinco(II). Os espectros do FcA livre e do complexo 2 estão ilustrados na Figura 2.2 e propostas de atribuição das principais bandas do FcA e do complexo 2 estão descritos na Tabela 2.4.

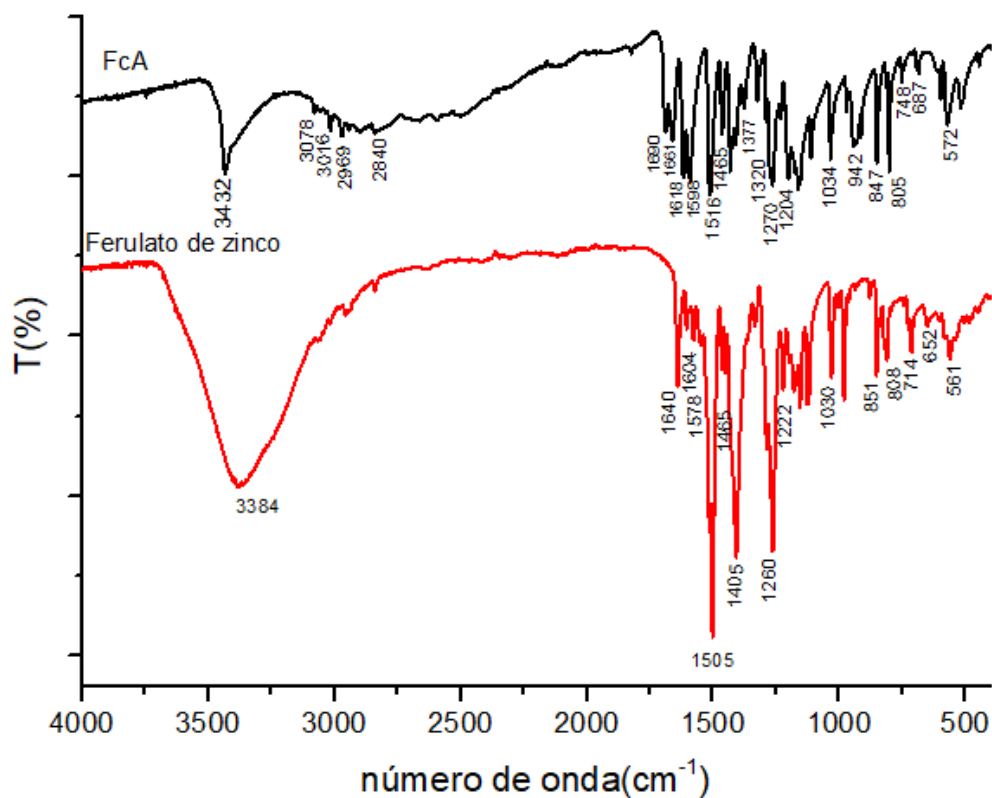


Figura 2.2: Espectros vibracionais do FcA e do Ferulato de zinco (complexo 2)

Tabela 2.4: Propostas de atribuição das principais bandas do FcA e do complexo

Atribuições	Principais bandas (cm ⁻¹)	
	FcA	Complexo
d ⁺ (O-H) _{fenólico}	3432	3384
d ⁺ (O-H) _{ácido}	3078	-
v _{as} (C-H)	3016, 2969 e 2840	3018, 2956, 2839
v(C=O)	1690, 1661	-
	1638	1640
d _{as} (C-H) _{aromático}	1465	1465
d _s (C-H) _{aromático}	1377	1375
v _{as} (C-O-C) _{eter/fenólico}	1270	1260
v(C-O) _{ácido}	1204	-
v(O-CH ₃)	1034	1030
d ⁺ (C=C) _{aromático}	1618, 1598 e 1516	1604, 1578, 1505
v(OH) _{ácido}	942	-
d ⁺ (C-C) _{aromático}	748 e 687	714 e 652
d ⁺ (C-H) _{aromático}	847 e 805	851 e 808
v(C=O)	572	-

A espectroscopia vibracional foi usada para confirmar a desprotonação de FcA e o modo de ligação do ligante ao íon zinco no complexo **2**. O espectro vibracional do FcA livre exibe banda de

absorção em 1204cm^{-1} atribuídas ao grupo C-O do ácido (Sebastian et al., 2009). Assim, a ausência dessa banda no espectro vibracional do complexo **2** é um indicativo da desprotonação desse grupo ($\text{pK}_{\text{a}1}$ 4,50 e $\text{pK}_{\text{a}2}$ 8,92) e seu provável envolvimento na coordenação ao zinco(II). As bandas em 1690 e 1661 cm^{-1} que corresponde à vibração de estiramento do grupo carbonila (L. Li et al., 2017; Yu et al., 2010) também desaparecem no espectro vibracional do complexo **2**, o que aponta para a possibilidade de coordenação metálica a este grupo. Também pode-se observar que vibrações fora do plano do grupo carboxílico $(\text{OH})_{\text{COOH}}$ em 942cm^{-1} e do grupo $(\text{C}=\text{O})$ 572 cm^{-1} não aparecem no espectro do complexo (Kula et al., 2007; M. Kalinowska, 2014). Uma banda de vibrações de estiramento do grupo hidroxila $(\text{OH})_{\text{COOH}}$ (3078cm^{-1}) (Sebastian et al., 2009) não é observado no espectro do complexo **2**. No espectro dos ferulados metálicos a banda atribuída às vibrações $(\text{OH})_{\text{ar}}$ 3432 cm^{-1} do substituinte no anel é deslocada para um número de onda inferior como uma banda larga por possível interação com água (L. Li et al., 2017; Sebastian et al., 2009). No espectro vibracional do complexo **2** é observado essa banda em 3384cm^{-1} . A banda que vem das vibrações de estiramento da ligação dupla entre um anel $\nu(-\text{C}=\text{C}-)$ e um grupo carboxílico/carboxilato está presente em 1618cm^{-1} no ácido ferúlico e 1640cm^{-1} no complexo (Kula et al., 2007; M. Kalinowska, 2014)

Espectroscopia Eletrônica na Região do Ultravioleta-visível

O complexo **2** também foi analisado por espectroscopia eletrônica, onde foi possível comparar soluções aquosas de mesma concentração dos ligantes livres e do complexo **2** ($3 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$), Figura 2.3.

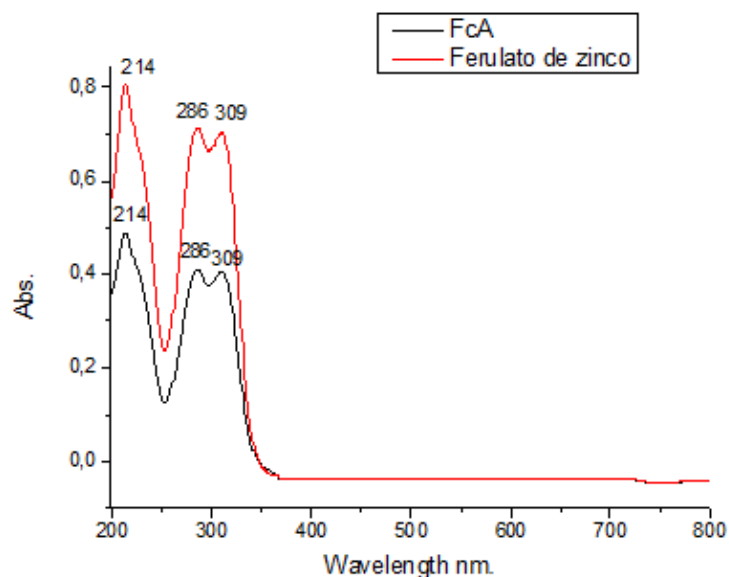


Figura 2.3: Espectros eletrônicos do Complexo **2** e do ligante FcA na concentração de $3,0 \times 10^{-5}\text{ mol.L}$ em solução aquosa.

A Tabela 2.5 traz os valores das bandas de absorção e dos respectivos valores de absortividade molar do complexo e dos ligantes livres. Os valores de absortividade molar foram calculados empregando-se a lei de Lambert Beer (Equação 1).

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

Onde A é a absorbância do analito na solução, ϵ é a absortividade molar do analito, b é a distância percorrida pela luz na solução (caminho ótico) e c concentração do analito.

Tabela 2.5: Valores das bandas de absorção e de absortividade molar para o complexo e ligantes livres

Composto	λ_1 (nm)	ϵ_1 (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_2 (nm)	ϵ_2 (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_3 (nm)	ϵ_3 (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
FcA	214	16267	286	13667	309	13533
Complexo 2	214	26900	286	23867	309	23500

A análise espectrofotométrica na região UV-Vis foi realizada a fim de corroborar com a afirmação de que houve coordenação metálica do zinco ao FcA. Na Figura 2.3 podemos observar bandas de absorção em regiões similares entre FcA e complexo **2** sem deslocamentos significativos. Os espectros UV/VIS de ferulados em água não apresentaram diferenças significativas de deslocamento de bandas (M. Kalinowska, 2014).

No complexo é observado efeito hipercrômico em todas as bandas. Os significativos aumentos nos valores de absortividade molar do complexo nas regiões de 214, 286 e 309 são indicativos da coordenação metálica aos ligantes.

Espectrometria de massas – ESI

O espectro de massa de ionização por electrospray (ESI-MS) é uma técnica amplamente utilizada para confirmação da formação e presença de compostos em solução, também podendo auxiliar na análise estrutural (Bursey, 1974).

O espectro de massa de ionização por electrospray (ESI-MS) foi realizado no modo positivo a 180°C, a partir de uma solução metanol/DMSO do complexo **2**, em alta resolução. A amostra foi injetada no aparelho por infusão direta. O espectro foi adquirido no equipamento MicroTOF lc Brucker Daltonics da Central Analítica do Instituto de Química da USP. Na Figuras 2.4 é apresentado o espectro de massa do complexo **2**.

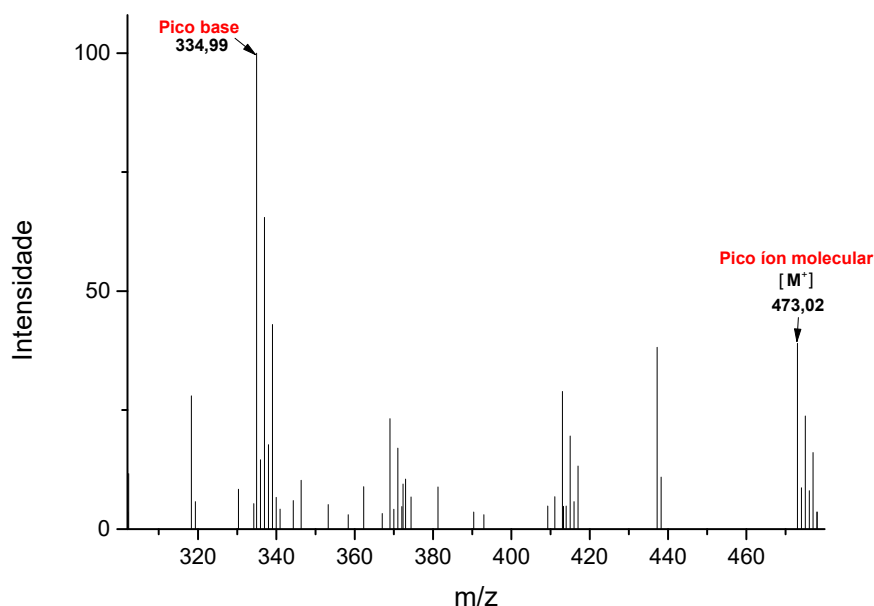


Figura 2.4: Espectro ESI(+)-MS em solução MeOH:H₂O (1:1) do complexo **2**.

Os espectros de ESI-MS do complexo **2** no modo positivo, permitiram a identificação dos íons moleculares e dos principais fragmentos para o complexo **2**. O pico referente ao íon molecular do complexo foi observado em $m/z = 473,020$, $\text{Na}[\text{Zn}(\text{FcA})_2]^+$, com fórmula molecular $[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NaO}_8\text{Zn}]^+$, cujo valor teórico é de 473,019 e o pico principal em $m/z = 334,993$, atribuível à espécie $[\text{Zn}(\text{FcA})(\text{dmso})]^+$ com fórmula molecular $[\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{SZn}]^+$, cujo valor calculado é de 334,993. Os picos condizentes com as propostas teóricas indica a presença do complexo em solução. As Figuras 2.5 e 2.6 apresentam um comparativo das distribuições isotópicas dos picos base e do íon-molecular do ESI-MS para o complexo **2** com valores teóricos calculados com auxílio do programa desenvolvido pela *Scientific Instrument Services* como parte da *Mass Spec Tools Collection* (Coleção de ferramentas de especificação de massa) desenvolvido por John J. Manura e David J. Manura, © 1996-2016, Scientific Instrument Services.

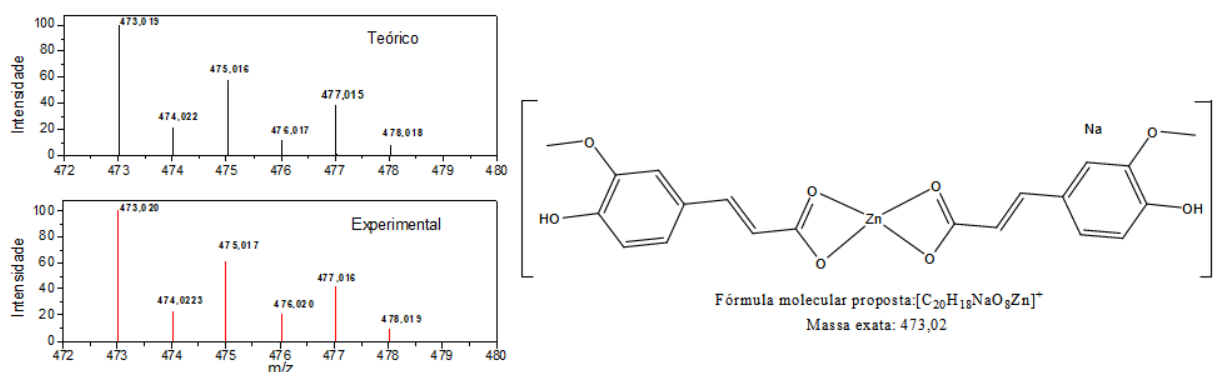


Figura 2.5: Comparativo da distribuição isotópica obtida experimentalmente e teórica com o auxílio do programa Mass Spec Tools Collection para a espécie $[C_{20}H_{18}NaO_8Zn]^+$.

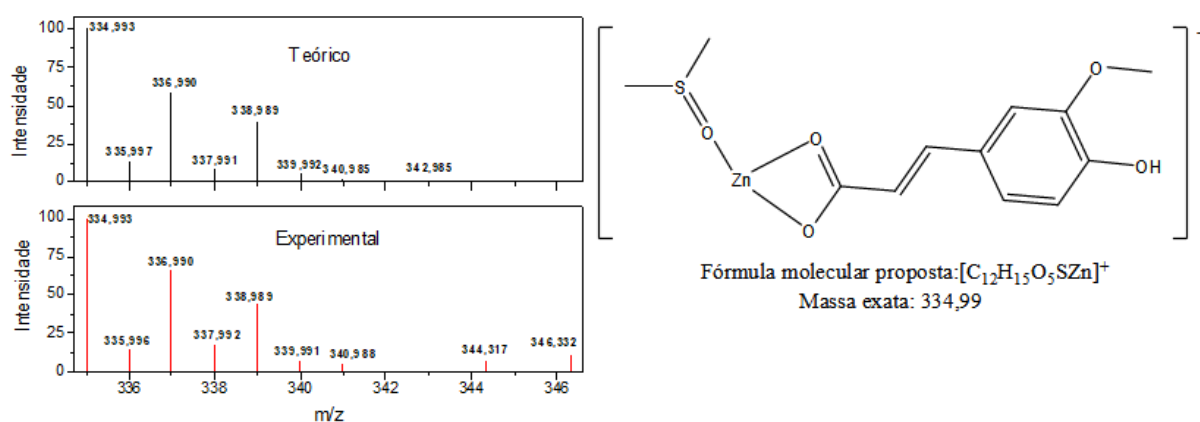


Figura 2.6: Comparativo da distribuição isotópica obtida experimentalmente e teórica com o auxílio do programa Mass Spec Tools Collection para a espécie $[C_{12}H_{15}O_5SZn]^+$.

Os resultados obtidos por meio da espectroscopia de massas no modo positivo foram condizentes com as estruturas propostas para os ligantes e confirmaram a presença dos mesmos em solução metanol/DMSO.

2.3 Conclusões

O sólido obtido foi caracterizado em solução e no estado sólido usando análises elementares e condutimétricas; espectroscopia vibracional e eletrônica e espectrometria de massas. Verificou-se que o complexo **2** é pouco solúvel em água e outros solventes polares, como DMSO, metanol e etanol. Os resultados das análises elementares e as espectrométricas auxiliaram na proposição dos sítios de coordenação ao metal e confirmaram a fórmula molecular proposta para o complexo neutro $[Zn(FcA)_2]$ (Figura 2.1).

REFERÊNCIAS

- Ahmad, I, Sheraz, M. A., Ahmed, S., Bano, R., & Vaid, F. H. M. (2012). Photochemical interaction of ascorbic acid with riboflavin , nicotinamide and alpha-tocopherol in cream formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 34, 123–131. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00690.x>
- Ahmad, Iqbal, Furqan, M., Ali, M., Anwar, Z., Saeed, R., Hussain, I., & Muhammad, S. (2018). Photochemical interaction of ascorbic acid and nicotinamide in aqueous solution : A kinetic study. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 182(February), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.011>
- Ahmed, L., Atif, R., Eldeen, T. S., Yahya, I., Omara, A., & Eltayeb, M. (2019). Study the Using of Nanoparticles as Drug Delivery System Based on Mathematical Models for Controlled Release. *International Journal of Latest Technology in Engineering, Management & Applied Science*, VIII(V), 52–56.
- Al-Khateeb, J. S. and N. A. (2003). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 145–171. <https://doi.org/10.1080/10408690390826473>
- Alam, M. I., Paget, T., Moosa, N. Y., Alghurairy, H., & Elkordy, A. A. (2024). Liposomal Drug Delivery against Helicobacter pylori Using Furazolidone and N-Acetyl Cysteine in Augmented Therapy. *Pharmaceutics*, 16, 1123.
- Alexandridis, P., Holzwarth, J. F., & Hatton, T. A. (1994). Micellization of Polyethylene oxide) - Poly (propylene oxide) -Poly (ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions : Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules*, 27(9), 2414–2425.
- Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M. R., Farahmand, H., Shojaosadati, S. A., Dorkoosh, F. A., & Elsabee, M. Z. (2011). Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. *Food Chemistry*, 126(3), 935–940. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.086>
- Amanda C. Caritá, M. ., Santos, B. F., Shultz, J. D., Michniak-Kohn, B., Chorilli, M., & Leonardi, G. R. (2019). efficiency and stability. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, xxxx, 0–14. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102117>
- Arıcı, M., Zaferyeşilel, O., Acar, E., & Dege, N. (2017). Synthesis, Characterization and Properties of nicotinamide and isonicotinamide complexes with diverse dicarboxylic acids. *Polyhedron*. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.02.013>
- Arıcı, M., , Okan ZaferYeşilela,* , E. A., & Necmi Degeb. (2015). Ionothermal synthesis , properties and vibrational Mürsel Arıcı , Okan ZaferYeşilela,* , Ersin Acarb , Necmi Degeb with nicotinamide. *SPECTROCHIMICA ACTA PART A: MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY*, 134(2015), 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.080>

- Assis, O. B. G. (2013). A asa da borboleta e a nanotecnologia : cor estrutural. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 35(2), 9. <https://doi.org/10.1590/s1806-11172013000200001>
- Ayhan Savaser, Ozgur Esim, Sevinc Kurbanoglu, Sibel A. Ozkan, Y. O. (2018). Chapter 3 - Current perspectives on drug release studies from polymeric nanoparticles. In *Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery* (pp. 101–145). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813663-8.00003-8>
- Bae, J. Y., & Park, S. N. (2016). Evaluation of anti-microbial activities of ZnO , citric acid and a mixture of both against *Propionibacterium acnes*. *International Journal of Cosmetic Science*, 38, 550–557. <https://doi.org/10.1111/ics.12318>
- Bai, J., Yang, C., Du, S., Li, P., Dong, B., Yang, B., Chen, X., & Cui, Y. (2019). Penetration and pharmacokinetics of ferulic acid after dermal administration. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research April*, 18(April), 843–849.
- Balbinot-Filho, C., Teixeira, R. F., Rebelatto, E. A., & Lanza, M. (2024). First-Order Derivative Spectrophotometry for Simultaneous Determination of Vitamin C and Nicotinamide: Application in Quantitative Analysis of Cocrystals. *ACS Omega*, 9, 28776–28783. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c03172>
- Ballarin, B., Mignani, A., Mogavero, F., Gabbanini, S., & Morigi, M. (2015). Applied Clay Science Hybrid material based on ZnAl hydrotalcite and silver nanoparticles for deodorant formulation. *Applied Clay Science*, 114, 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.06.014>
- Basu, S., Hajra, A., & Chattopadhyay, A. (2021). An ambient complexation reaction of zinc acetate and ascorbic acid leads to a new form of nanoscale particles with emergent optical properties. *Nanoscale Advances*, 3, 3298–3305. <https://doi.org/10.1039/d1na00023c>
- Becherán-marón, L., Peniche, C., & Argüelles-monol, W. (2004). Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate : influence of alginate composition and chitosan molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.03.010>
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 19–34. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00161-9)
- Bezerra, R. D. S., Morais, A. I. S., Osajima, J. A., Nunes, L. C. C., & Silva, E. C. (2016). Development of new phosphated cellulose for application as an efficient biomaterial for the incorporation / release of amitriptyline. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 362–375. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.063>
- Bos, G. M. J. (2019). The Effect of Vitamin C (Ascorbic Acid) in the Treatment of Patients with Cancer : A Systematic Review. *Nutrients*, 11, 977. <https://doi.org/10.3390/nu11050977>

- Bursey, M. M. (1974). Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds. In *Journal of AOAC INTERNATIONAL* (Vol. 57, Issue 2). <https://doi.org/10.1093/jaoac/57.2.421>
- Campus, G. N., & Pradesh, A. (2015). Original article Alginate-Poloxamer Beads for Controlled Release of Metoprolol Succinate. *Turk J Pharm Sci*, 12(1), 59–66.
- Canevarolo Jr., S. V. (2002). *Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*.
- Chan, H., Chan, G., Santos, J., Dee, K., & Co, J. K. (2017). Clinical trial A randomized , double-blind , placebo-controlled trial to determine the efficacy and safety of lactoferrin with vitamin E and zinc as an oral therapy for mild to moderate acne vulgaris. *International Journal of Dermatology*, 56, 686–690. <https://doi.org/10.1111/ijd.13607>
- Chellappan, D. K., Yee, N. J., Jeet, B., Ambar, K., & Singh, J. (2019). Formulation and characterization of glibenclamide and quercetin-loaded chitosan nanogels targeting skin permeation. *Ther. Deliv.*, 10(5), 281–293.
- Cheow, W. S., & Hadinoto, K. (2010). Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles : Modifications of standard nanoparticle preparation methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 370(1–3), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.08.050>
- Comunian, T., Babazadeh, A., Rehman, A., Shaddel, R., Jafari, S. M., Babazadeh, A., Rehman, A., & Shaddel, R. (2020). Protection and controlled release of vitamin C by different micro / nanocarriers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–22. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1865258>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Davarani, F. H., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Id, M. R. M. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 57(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Dantas, K.C.F.; Rosário, J.d.S.; Silva-Caldeira, P. P. (2022). Polymeric Nanosystems Applied for Metal-Based Drugs and Photosensitizers Delivery : The State of the Art and Recent Advancements. *Pharmaceutics*, 14(7), p.1506. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071506>
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(8), 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
- Dominika Kulig, Anna Zimoch-Korzycka, A. J. and K. M. (2016). Study on Alginate – Chitosan Complex Formed with. *Polymers*, 8(167), 1–17. <https://doi.org/10.3390/polym8050167>
- Dou, Q., Karim, A. A., & Loh, X. J. (2016). Modification of thermal and mechanical properties of PEG-PPG-PEG copolymer (F127) with MA-POSS. *Polymers*, 8(9), 341. <https://doi.org/10.3390/polym8090341>
- Duan, Y., Li, J., Yang, X., Hu, L., Wang, Z., Liu, Y., & Wang, C. (2008). Journal of Analytical and Applied Pyrolysis Kinetic analysis on the non-isothermal dehydration by integral master-plots

method and TG – FTIR study of zinc acetate dihydrate. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 83, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2008.05.001>

Duarah, S., Durai, R. D., & Narayanan, V. B. (2017). Nanoparticle-in-gel system for delivery of vitamin C for topical application. *Drug Deliv. and Transl. Res*, 7(5), 50–760. <https://doi.org/10.1007/s13346-017-0398-z>

E. Luque-Pérez and A.Ríos.M.Valcárcel. (2000). Flow injection spectrophotometric determination of ascorbic acid in soft drinks and beer. *Fresenius J Anal Chem*, 366, 857–862.

El-Megharbel, S. M., Al-Salmi, F. A., & Hamza, M. S. R. 1 and R. Z. (2021). Selenium/Chitosan-Folic Acid Metal Complex Ameliorates Hepatic Damage and Oxidative Injury in Male Rats Exposed to Sodium Fluoride. *Crystals*, 11, 1354. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cryst11111354>

Fletcher, N. A., & Krebs, M. D. (2018). RSC Advances Sustained delivery of anti-VEGF from injectable hydrogel systems provides a prolonged decrease of endothelial cell proliferation and angiogenesis in vitro. *RSC Adv*, 8, 8999–9005. <https://doi.org/10.1039/c7ra13014g>

Frydrych, A., Arct, J., & Kasiura, K. (2004). Zinc: A critical importance element in cosmetology. *Journal of Applied Cosmetology*, 22(1), 1–13.

Geary, W. J. (1970). THE USE OF CONDUCTIVITY MEASUREMENTS IN ORGANIC SOLVENTS. *Coordination Chemistry Reviews*.

Gehring, W. (2004). Nicotinic acid/niacinamide and the skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 3(2), 88–93. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2130.2004.00115.x>

George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs : Alginate and chitosan — a review. *Journal of Controlled Release*, 114, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.017>

Ghatak, S. B., & Panchal, S. J. (2010). Ferulic Acid – An Insight Into Its Current Research and Future Prospects. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.004>

Gohary, O. A. L., & Gamal, S. El. (1991). Release of furosemide from sustained release microcapsules prepared by phase separation technique. *DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY*, 17(3), 443–450.

Golubitskii, G. B., Budko, E. V, Basova, E. M., Kostarnoi, A. V, & Ivanov, V. M. (2007). Stability of Ascorbic Acid in Aqueous and Aqueous – Organic Solutions. *Journal of Analytical Chemistry*, 62(8), 823–828. <https://doi.org/10.1134/S1061934807080096>

Gupta, M., Mahajan, V. K., Mehta, K. S., & Chauhan, P. S. (2014). Zinc Therapy in Dermatology : A Review. *Dermatology Research and Practice*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/709152>

- Gupta, P. K., Jaiswal, A. K., Asthana, S., Verma, A., Kumar, V., Shukla, P., Dwivedi, P., & Dube, A. (2015). Self Assembled Ionically Sodium Alginate Cross-Linked Amphotericin B Encapsulated Glycol Chitosan Stearate Nanoparticles : Applicability in Better Chemotherapy and Non-Toxic Delivery in Visceral Leishmaniasis. *Pharm Res*, 32, 1727–1740. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1571-4>
- Hakozaki, T., Minwalla, L., Zhuang, J., Chhoa, M., Matsubara, A., Miyamoto, K., Greatens, A., Hillebrand, G. G., Bissett, D. L., & Boissy, R. E. (2002). The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *British Journal of Dermatology*, 147(1), 20–31. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2002.04834.x>
- Hamedfar, H., Zivari-Ghader, T., Akbarzadeh, A., & Davaran, S. (2023). Physicochemical Characteristics of Chitosan-Alginate Scaffold Containing Atorvastatin. *Advances in Polymer Technology*, 2023, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2023/9452164>
- Hamedi, H., Moradi, S., Tonelli, A. E., & Hudson, S. M. (2019). Preparation and Characterization of Chitosan – Alginate Polyelectrolyte Complexes Loaded with Antibacterial Thyme Oil Nanoemulsions. *Applied Sciences*, 9, 3933.
- Hao, J., Tong, T., Jin, K., Zhuang, Q., Han, T., Bi, Y., Wang, J., & XiaodanWang. (2017). Folic acid-functionalized drug delivery platform of resveratrol based on Pluronic 127/D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate mixed micelles. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 2279–2292. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S130094>
- Ho, Y., Mi, F., Sung, H., & Kuo, P. (2009). Heparin-functionalized chitosan – alginate scaffolds for controlled release of growth factor. *International Journal of Pharmaceutics*, 376, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.048>
- Hongguang Lu, Xiaowei Zhao, Wenjing Tian, Q. W. and J. S. (2014). RSC Advances nanoparticles with aggregation-induced emission characteristics for targeted cellular imaging †. *RSC Advances*, 4, 18460–18466. <https://doi.org/10.1039/c4ra01355g>
- İspir, E., İnal, M., Gün, Z., & Mustafa, G. (2024). Synthesis , characterization and in vitro release analysis of pluronic F127 copolymer micelles containing quercetin as a hydrophobic drug. *Polymer Bulletin*, 81, 6801–6822. <https://doi.org/10.1007/s00289-023-05040-9>
- Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T., & Iseki, K. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid : A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chemistry*, 114(2), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.073>
- Jain, R., Sukla, S. K., Nema, N., & Panday, A. (2015). Drug Nano-particle : A Release Kinetics Nanomedicine & Nanotechnology. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 6(5), 317. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000317>
- JANG, K.-I., & LEE, A. H. G. (2008). Stability of Chitosan Nanoparticles for L -Ascorbic. *J. Agric. Food Chem*, 56(6), 1936–1941. <https://doi.org/10.1021/jf073385e>

- Jang, K.-I., & Lee, H. G. (2008). Stability of Chitosan Nanoparticles for L -Ascorbic. *J. Agric. Food Chem*, 56, 1936–1941.
- Kabanov, A. V, Batrakova, E. V, & Miller, D. W. (2003). Pluronic block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood – brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 151–164.
- Kabanov, A. V, Batrakova, E. V, & Yu, V. (2002). Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 82(2002), 189–212. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00009-3](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00009-3)
- Karagianni, A., Malamataris, M., & Kachrimanis, K. (2018). Pharmaceutical Cocrystals : New Solid Phase Modification Approaches for the Formulation of APIs. *Pharmaceutics Review*, 10(18), 1–30. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10010018>
- Karim, R., Palazzo, C., Evrard, B., & Piel, G. (2016). Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme : Current state-of-the-art. *Journal of Controlled Release*, 227, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.026>
- Kaygusuz, H. (2016). International Journal of Biological Macromolecules Surfactant and metal ion effects on the mechanical properties of alginate hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92(2016), 220–224. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.004>
- Khaliq, N. U., Lee, J., Kim, S., & Sung, D. (2023). Pluronic F-68 and F-127 Based Nanomedicines for Advancing Combination Cancer Therapy. *Pharmaceutics Review*, 15, 2102.
- Khezri, K., Saeedi, M., & Maleki Dizaj, S. (2018). Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106(July), 1499–1505. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.084>
- Kim, K., Kim, Y. W., Lim, S. K., Roh, T. H., Yeon, D., Choi, S. M., Lim, D. S., Kim, Y. J., Baek, S., Seo, H., Kim, M., Kim, H. S., Lee, J. Y., Kacew, S., Lee, B., Kim, Y. W., Lim, S. K., Roh, T. H., Bang, D. Y., ... Kacew, S. (2017). Risk assessment of zinc oxide , a cosmetic ingredient used as a UV filter of sunscreens. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 20(3), 155–182. <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1290516>
- Kosaraju, S. L., Lynette, D., & Lawrence, A. (2006). Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers*, 64, 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.11.027>
- Kuen Yong Lee, D. J. M. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Kula, A., Mazur, L., & Rzączyńska, Z. (2007). Crystal structure, spectroscopic and thermal studies of 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid sodium salt. *Journal of Coordination Chemistry*, 60(8), 843–850. <https://doi.org/10.1080/00958970600936765>

- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids : Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Kumar, S., Dey, A., Singhvi, G., Manohar, M., Singh, V., & Kesharwani, P. (2022). Emerging trends of nanotechnology in advanced cosmetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 214, 112440. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112440>
- Laracuenta, M., Yu, M. H., & Mchugh, K. J. (2020). Zero-Order Drug Delivery: State of the Art and Future Prospects. *Journal of Controlled Release*, 327, 834–856. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.020>
- Lee, B., Min, G., Cui, J., & Al, B. L. E. E. E. T. (1999). Correlation of Drug Solubility with Trapping Efficiency and Release Characteristics of Alginate Beads. *Pharm. Pharmacol. Commun*, 5(1999), 85–89. <https://doi.org/10.1211/146080899128734505>
- Lee, M. H., Shin, G. H., & Park, H. J. (2018). Solid lipid nanoparticles loaded thermoresponsive pluronic – xanthan gum hydrogel as a transdermal delivery system. *Journal of Applied Polymer Science*, 46004(2018), 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.46004>
- Lesser, M. A. (1980). Alginates in Drugs and Cosmetics. *Economic Botany*, 4(4), 317–321.
- Li, C., Cui, F., Zhang, H., & Xuan, X. (2015). Ionothermal synthesis , properties and vibrational Mürsel Arıcıa , Okan ZaferYeşilela,*, Ersin Acarb , Necmi Degeb with nicotinamide. *SPECTROCHIMICA ACTA PART A: MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY*, 134(2015), 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.080>
- Li, D., Rui, Y., Guo, S., Luan, F., Liu, R., & Zeng, N. (2021). Ferulic acid : A review of its pharmacology , pharmacokinetics and derivatives. *Life Sciences*, 284(July), 119921. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119921>
- Li, G., Ying, Y., Lu, X., Chen, J., Liu, N., Qiu, C., & Wang, Y. (2022). Simultaneous loading of (–) -epigallocatechin gallate and ferulic acid in chitosan-based nanoparticles as effective antioxidant and potential skin-whitening agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 219(August), 333–345. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.242>
- Li, L., Liu, Y., Xue, Y., Zhu, J., Wang, X., & Dong, Y. (2017). Preparation of a ferulic acid – phospholipid complex to improve solubility , dissolution , and B16F10 cellular melanogenesis inhibition activity. 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0254-8>
- Li, X., Xie, H., Lin, J., Xie, W., & Ma, X. (2009). Characterization and biodegradation of chitosan – alginate polyelectrolyte complexes. *Polymer Degradation and Stability*, 94(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.10.017>
- Lin, F., Lin, A. J., Gupta, R. D., Tournas, A. J. A., Burch, A. J. A., Angelica, A. M., Monteiro-riviere, A. N. A., Grichnik, J. M., Zielinski, A. J., & A. S. R. P. (2005). Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins C and E and Doubles its Photoprotection of Skin. *Journal of*

Investigative Dermatology, 125(4), 826–832. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23768.x>

- Lin, Jia-jyun, Chen, J., Huang, S., Ko, J., Wang, Y., Chen, T., & Wang, L. (2009). Biomaterials Folic acid – Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting , diagnosis , and therapy applications. *Biomaterials*, 30(28), 5114–5124. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.004>
- Lin, Jing-yi, Selim, M. A., Shea, C. R., Grichnik, J. M., Omar, M. M., & Monteiro-riviere, N. A. (2003). UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *J AM ACAD DERMATOL*, 48(6), 866–874. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.425>
- Lobo, M. S., & Costa, P. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles '. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123–133. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- Loquercio, A., Castell-perez, E., Gomes, C., & Moreira, R. G. (2015). Preparation of Chitosan-Alginate Nanoparticles for Trans -cinnamaldehyde Entrapment. *Journal of Food Science*, 80(10), 2305–2315. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12997>
- Lukic, M.; Pantelic, I. ., & Savic, S. . (2021). Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations : From the Current State of the Art to Tailored Products. *Cosmetics*, 8(69), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030069>
- Ly, J., Tan, M., Zou, J., Yun, Y., Ren, Y., Guo, F., & Wang, G. (2024). Exploring the formation mechanism of ferulic acid / hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex : spectral analyses and computer simulation. *Sci Food Agric*, 104, 6584–6593. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13482>
- M. Kalinowska, et al. (2014). Spectroscopic (FT-IR , FT-Raman , ^1H , ^{13}C NMR , UV / VIS), thermogravimetric and antimicrobial studies of Ca (II), Mn (II), Cu (II), Zn (II) and Cd (II) complexes of ferulic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 122, 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.11.089>
- M.A. Saleem, R. V. K. and P. N. G. (2011). Formulation and Evaluation of Chitosan Based Polyelectrolyte Complex Hydrogels for Extended Release of Metoprolol Tartrate. *Research J. Pharm. and Tech*, 4(12), 1844–1851.
- Mahoney, G., Brennan, D., Starcher, B., Faryniarz, J., Ramirez, J., & Parr, L. (2009). Extracellular matrix in cutaneous ageing : the effects of biosynthesis. *Experimental Dermatology*, 18(3), 205–211. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00783.x>
- Managa, M., Pitchou Ngoy, B., Mafukidze, D., & Nyokong, T. (2018). Incorporation of metal free and Ga 5,10,15,20-tetrakis(4-bromophenyl) porphyrin into Pluronic F127-folic acid micelles. *Journal of Luminescence*, 194(September 2017), 739–746. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2017.09.045>

- Maria, K., Neves, M., Bruna, S., Costa, L., Fernanda, L., Dourado, N., Oliveira, R., Anderson, A. S., Santos, K., Ribeiro, R., Eustáquio, P., Juan, F., Campos, C., Assis, G., Goulart, C., & Silva-Caldeira, P. P. (2021). Four modified sodium alginate / carboxymethylcellulose blends for prednisone delivery. *J Appl Polym Sci.*, 138, 1–12. <https://doi.org/10.1002/app.50383>
- Markarian, S. A., & Sargsyan, and H. R. (2011). ELECTRONIC ABSORPTION SPECTRA OF ASCORBIC ACID IN WATER AND WATER–DIALKYL SULFOXIDE MIXTURES. *Journal of Applied Spectroscopy*, 78(1), 06–10. <https://doi.org/10.1007/s10812-011-9418-9>
- Martinho, J. M. G. (1994). Espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível. *Bol. Da Soc. Port. Química*, 52(3), 44–46.
- Mathematical models of drug release. (2015). In *Strateg. to Modify Drug Release from Pharm. Syst.*, Elsevier (pp. 63–86). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>
- Memom, M. A., Memon, M. H., Dahot, M. U., & Ansari, I. A. (2000). Spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceuticals by flow injection analysis using brown momo 1, 10-phenanthroline-ferro(III) complex as an oxidant. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 13(2), 69–74.
- Mi, F., Sung, H., & Shyu, S. (2002). Drug release from chitosan ± alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers*, 48, 61–72.
- Moreschi, E. C. P., Matos, J. R., & Almeida-Muradian, L. B. (2009). Thermal analysis of vitamin PP Niacin and niacinamide. *J Therm Anal Calorim*, 2009(98), 161–164. <https://doi.org/10.1007/s10973-009-0177-2>
- Nawaz, A., Ullah, S., Alnuwaiser, M. A., Rehman, F. U., & Selim, S. (2022). Formulation and Evaluation of Chitosan-Gelatin Thermosensitive. *Gels*, 8, 537. <https://doi.org/10.3390/gels8090537>
- Nitzan, Y. B., & Cohen, A. D. (2006). Zinc in skin pathology and care. *Journal of Dermatological Treatment*, 17(April), 205–210. <https://doi.org/10.1080/0954663060079143>
- Nusgens, B., Richard, A., Pg, H., Haftek, M., Creidi, P., Humbert, P. G., Creidi, P., Nusgens, B., & Schmitt, D. (2003). Topical ascorbic acid on photoaged skin . Clinical , topographical and ultrastructural evaluation : double-blind study vs . placebo. *Experimental Dermatology*, 12(2), 237–244. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2003.00008.x>
- Oliveira, C.; Coelho, C. ., Teixeira, J.A.; Ferreira-Santos, P. ., & Botelho, C. M. (2022). Nanocarriers as Active Ingredients Enhancers in the Cosmetic Industry—The European and North America Regulation Challenges. *Molecules*, 27, 1669. <https://doi.org/10.3390/Molecules27051669>
- Oréfice, R.; Pereira, M.; Mansur, H. (2012). *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. Materiais Poliméricos: Ciência e Aplicação como Biomateriais.* (1st ed.).
- Ostberg, T., & Graffner, C. (1994). journal of pharmaceuticals Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration : III . Influence of calcium concentration , amount of drug added

and alginate characteristics on drug release. *Journal of International Pharmaceutics*, *111*(1994), 271–282.

- Ostberg, T., Vesterhus, L., & Graffner, C. (1993). Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration : II . Effect of process and formulation factors on matrix properties. *International Journal of Pharmaceutics*, *97*(1993), 183–193.
- Othman, N., Masarudin, M. J., Kuen, C. Y., & Dasuan, N. A. (2018). Synthesis and Optimization of Chitosan Nanoparticles Loaded with L-Ascorbic Acid and Thymoquinone. *Nanomaterials*, *8*, 920. <https://doi.org/10.3390/nano8110920>
- Panwar, R., Pemmaraju, S. C., Sharma, A. K., & Pruthi, V. (2016). Microbial Pathogenesis Efficacy of ferulic acid encapsulated chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm. *Microbial Pathogenesis*, *95*, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.007>
- Paques, J. P., Linden, E. Van Der, Rijn, C. J. M. Van, & Sagis, L. M. C. (2014). Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, *209*, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.03.009>
- Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D., & Bolzinger, M. (2014). Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *457*, 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.05.057>
- Pavia, D. L. (2010). *Espectroscopia*.
- Pawar, S. N., & Edgar, K. J. (2012). Biomaterials Alginate derivatization : A review of chemistry , properties and applications. *Biomaterials*, *33*(11), 3279–3305. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.007>
- Pistone, S., Qoragllu, D., Smistad, G., & Hiorth, M. (2015). Formulation and preparation of stable cross-linked alginate-zinc nanoparticles in the presence of a monovalent salt. *Soft Matter*, *11*(28), 5765–5774. <https://doi.org/10.1039/c5sm00700c>
- Poojari, R., & Srivastava, R. (2013). Composite alginate microspheres as the next-generation egg-box carriers for biomacromolecules delivery. *Expert Opin. Drug Deliv*, *10*(8), 1061–1076. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.796361>
- Postolovic, K. S., Antonijevic, M. D., Ljuji, B., Kovacevic, M. M., Janković, M. G., & Stanić, Z. D. (2022). pH-Responsive Hydrogel Beads Based on Alginate, κ -Carrageenan and Poloxamer for Enhanced Curcumin, Natural Bioactive Compound, Encapsulation and Controlled Release Efficiency. *Molecules*, *27*, 4045. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules27134045>
- Prasad, A. S. (2014). Zinc is an antioxidant and anti-inflammatory agent : its role in human health. *Frontiers in Nutrition*, *1*(September), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00014>
- Prasanthan, P., & Kishore, N. (2021). RSC Advances Self-assemblies of pluronic micelles in partitioning of anticancer drugs and effectiveness of this system towards target protein †. *RSC Advances*, *11*, 22057–22069. <https://doi.org/10.1039/d1ra03770f>

- Pullar, J. M., Carr, A. C., & Vissers, M. C. M. (2017). The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients*, 9, 866. <https://doi.org/10.3390/nu9080866>
- Rabinarayan PARHI; Podilam SURESH. (2015). Original article Alginate-Poloxamer Beads for Controlled Release of Metoprolol Succinate. *Turk J Pharm Sci*, 12(1), 59–66.
- Raghupathi, K. R., Koodali, R. T., & Manna, A. C. (2011). Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. *Langmuir*, 27, 4020–4028. <https://doi.org/10.1021/la104825u>
- Ramalingam, S., Periandy, S., Govindarajan, M., & Mohan, S. (2010). Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy FT-IR and FT-Raman vibrational spectra and molecular structure investigation of nicotinamide : A combined experimental and theoretical study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75(5), 1552–1558. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.02.015>
- Rapee Khlibsuwan , Watcharee Khunkitti, T. P. (2020). Alginate-poloxamer beads for clotrimazole delivery: Molecular interactions, mechanical properties, and anticandidal activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148(2020), 1061–1071. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.217>
- Raszewska-famielec, M. and J. F. (2022). Nanoparticles for Topical Application in the Treatment of Skin Dysfunctions — An Overview of Dermo-Cosmetic and Dermatological Products. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 15980.
- Refat, M. S., El-megharbel, S. M., Hussien, M. A., Hamza, R. Z., Al-omar, M. A., Naglah, A. M., Afifi, W. M., & Kobeasy, M. I. (2017). Spectroscopic, structural characterizations and antioxidant capacity of the chromium(III) niacinamide compound as a diabetes mellitus drug model. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173(2017), 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.08.053>
- Regattieri, A. B., Sena, G. L., & Filho, E. A. da S. (2016). Preparation and Characterization of Ternary Emulsion Chitosan/SDS/Hexane. *Rev. Virtual Quim.*, 8(3), 622–633. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160047>
- Rostan, E. F., Debuys, H. V, Madey, D. L., & Pinnell, S. R. (2002). Pharmacology and therapeutics Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *International Journal of Dermatology*, 41(9), 606–611. [https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2002.01567.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2002.01567.x)
- S. Ide, A. Ataç, Ş. Y. (2002). Spectroscopic and structural studies on dichlorobis (nicotinamide) zinc (II). *Journal Of Molecular Structure*, 605(2002), 103–107. [https://doi.org/10.1016/s0022-2860\(01\)00747-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2860(01)00747-5)
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pasquale, A. De, Uccella, N., Barbuzzi, T., Paolino, D., & Bonina, F. (2000). *In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents*. 199, 39–47.

- Sajjadi, S. E., Shokoohinia, Y., & Moayedi, N. (2012). Pharmaceutical Products. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 7(4), 159–162.
- SALAH M. SULTAN, A. M. A. and F. E. O. S. (1994). FLOW INJECTION COLORIMETRIC METHOD FOR THE ASSAY OF VITAMIN C IN DRUG FORMULATIONS COMPLEX. *Talanta*, 41(I), 125–130.
- Salamanca, C. H., Barrera-Ocampo, A., Lasso, J. C., & Camacho, N. (2018). Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. *Pharmaceutics*, 10, 1–10. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030148>
- Sanches, M. P. et. al. (2020). Chitosan-Sodium Alginate Polyelectrolyte Complex Coating Pluronic® F127 Nanoparticles Loaded with Citronella Essential Oil. *J. Braz. Chem. Soc.*, 31(4), 803–812. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190244>
- Santos, A. C., Morais, F., Simões, A., Pereira, I., Sequeira, J. A. D., Pereira-Silva, M., Veiga, F., & Ribeiro, A. (2019). Nanotechnology for the development of new cosmetic formulations. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16(4), 313–330. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1585426>
- Schmid-Wendtner, M. H., & Korting, H. C. (2006). The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function. *Skin Pharmacol Physiol*, 19, 296–302. <https://doi.org/10.1159/000094670>
- Sebastian, S., Sundaraganesan, N., & Manoharan, S. (2009). Molecular and Biomolecular Spectroscopy Molecular structure , spectroscopic studies and first-order molecular hyperpolarizabilities of ferulic acid by density functional study. *Spectrochimica Acta Part A*, 74, 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.06.011>
- Segale, L., Mannina, P., Giovannelli, L., & Pattarino, F. (2015). Calcium alginate multi-unit oral dosage form for delayed release of celecoxib. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 293(2005), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.02.001>
- Selimović, A., & Salkić, M. (2011). Direct spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in the presence of alanine as a stabilizer. *Technologica Acta*, 4(1), 39.
- Selimović, A., Salkić, M., & Selimović, A. (2011). Direct Spectrophotometric Determination of L-Ascorbic acid in Pharmaceutical Preparations using Sodium Oxalate as a Stabilizer. *International Journal of Basic & Applied Sciences*, 11(2), 106–109.
- Selvaraj, V., Subramanian, R., & Saravanan, S. (2021). Ferulic acid-Cu (II) and Zn (II) complexes promote bone formation. *Process Biochemistry*, 107(March), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.016>
- Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I. (2014). Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential. *Journal of Physical Science*, 25(1), 59–75.

- Sharquie, K. E., Noaimi, A. A., & Hameed, S. D. (2013). Topical 15 % Zinc Sulfate Solution Is an Effective Therapy for Feet Odor *. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 03(September), 203–208.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/jcdsa.2013.33031>
- Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 163–174.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.028>
- Silva, G., Bezerra, N., Agda, M., Pereira, V., & Arantes, E. (2017). Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG / DTG , DSC and FTIR. *J Therm Anal Calorim*, 127, 1683–1691. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5654-9>
- Silverstein, R. M. et al. (2005). *Silverstein - Spectrometric Identification of Organic Compounds* (7th ed).
- Smijs, T. G., & Pavel, S. (2011). Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens : focus on their safety and effectiveness Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens : focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, Science and Applications*, 4, 95–112. <https://doi.org/10.2147/NSA.S19419>
- Sohn, Y. T., & Oh, J. H. (2003). Characterization of Physicochemical Properties of Ferulic Acid. *Arch Pharm Res*, 26(12), 1002–1008.
- Solomons, T. W. G., & Fryhle, C. B. (2000). *Química Orgânica* (7^a).
- Staniforth, V., Huang, W., Aravindaram, K., & Yang, N. (2012). Ferulic acid , a phenolic phytochemical , inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(5), 443–451.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.01.009>
- Stolar, T., Lukin, S., Tireli, M., Sovic, I., Karadeniz, B., Kerekovic, I., Dejanovic, I., Michiel, M., Matijas, G., Gretic, M., & Katanc, Z. (2019). Control of Pharmaceutical Cocrystal Polymorphism on Various Scales by Mechanochemistry: Transfer from the Laboratory Batch to the Large-Scale Extrusion Processing. *ACS Sustainable Chem. Eng*, 7, 7102–7110.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00043>
- SUN, F. L. A. A. M. (1980). Microencapsulated Islets as Bioartificial Endocrine Pancreas. *SCIENCE*, 210(May), 3–5. <https://doi.org/10.1126/science.6776628>
- Tanno, O., Ota, Y., Kitamura, N., Katsube, T., & Inoue, S. (2000). Nicotinamide increases biosynthesis of ceramides as well as other stratum corneum lipids to improve the epidermal permeability barrier. *British Journal of Dermatology*, 143(3), 524–531.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03705.x>
- Tanno, Osamu, Ota, Y., Yasuda, R., & Inoue, S. (1998). Niacinamide increases biosynthesis not only of ceramides but of fatty acids and cholesterol in cultured human keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*, 16(1), S201. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(98\)84200-X](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(98)84200-X)

- Telange, D. R., Jain, S. P., Pethe, A. M., Kharkar, P. S., & Rarokar, N. R. (2021). Use of combined nanocarrier system based on chitosan nanoparticles and phospholipids complex for improved delivery of ferulic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 171, 288–307. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.211>
- Tesfaldet, Z. O., Staden, J. F. Van, & Stefan, R. I. (2004). Sequential injection spectrophotometric determination of iron as Fe (II) in multi-vitamin preparations using 1 , 10-phenanthroline as complexing agent &. *Talanta*, 64, 1189–1195. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.02.044>
- Tsuchida, E., & Abe, K. (1982). Interactions Between Macromolecules in Solution and Intermacromolecular Complexes. In *Adv Polym Sci* (pp. 1–119). <https://doi.org/10.1007/bfb0017549>
- Uddin, M. S., Hawlader, M. N. A., & Zhu, H. J. (2001). Microencapsulation of ascorbic acid : effect of process variables on product characteristics. *J. Microencapsulation*, 18(2), 199–209. <https://doi.org/10.1080/02652040010000352>
- União Europeia. (2009). Regulamento (CE) N°1223/2009 Do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 151.
- V. Pillay, C.M. Dangor, T. Govender, K.R. Moopanar, N. H. (1998). Ionotropic gelation : encapsulation of indomethacin in calcium alginate gel discs. *Journal of Microencapsulation*, 15(2), 215–226. <https://doi.org/10.3109/02652049809006851>
- V. Sreeja; K. N. Jayaprabha; P. A. Joy. (2014). Water-dispersible ascorbic-acid-coated magnetite nanoparticles for contrast enhancement in MRI. *Appl Nanosci*, 5 435–441(2015), 435–441. <https://doi.org/10.1007/s13204-014-0335-0>
- Varvara, M., Bozzo, G., Celano, G., Disanto, C., Pagliarone, C. N., & Celano, G. V. (2016). *The use of ascorbic acid as a food additive : technical-legal issues*. 5. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.4313>
- Wang, J.-R., Bao, J., Fan, X., Dai, W., & Mei, X. (2016). pH-switchable vitamin B9 gels for stoichiometry-controlled spherical co-crystallization. *The Royal Society of Chemistry*, 00, 1–4. <https://doi.org/10.1039/C6CC07701C>
- Wanka, G., Hoffmann, H., & Ulbricht, W. (1994). Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Triblock Copolymers in Aqueous Solutions. *Macromolecules*, 27, 4145–4, 4145–4159.
- Wasupalli, G. K., & Verma, D. (2018). Molecular interactions in self-assembled nano-structures of chitosan- sodium alginate based polyelectrolyte complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.075>
- Xiaolin, T., Dafeng, T., Zhongyan, W., & Fengkui, M. (2009). Synthesis and Evaluation of Chitosan-Vitamin C Complexes. *Journal of Applied Polymer Science*, 114(January), 2986–2991. <https://doi.org/10.1002/app>
- Yang, J., Xie, Y., & He, W. (2011). Research progress on chemical modification of alginate : A review. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.048>

- Yin, X., Chen, K., Cheng, H., Chen, X., Feng, S., & Song, Y. (2022). Chemical Stability of Ascorbic Acid Integrated into Commercial Products : A Review on Bioactivity and Delivery Technology. *Antioxidants*, *11*, 1–20. <https://doi.org/10.3390/antiox11010153>
- Yohann Corvis, Menet, M.-C., Négrier, P., Lazerges, M., & Espeau, P. (2013). The role of stearic acid in ascorbic acid protection from degradation: a heterogeneous system for homogeneous thermodynamic data. *New J. Chem.*, *37*(3), 761–768. <https://doi.org/10.1039/c0xx00000x>
- Yu, D., Yang, J., Branford-white, C., Lu, P., Zhang, L., & Zhu, L. (2010). Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, *400*(1–2), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.010>
- Zackheim, H. S. (1975). Treatment of Psoriasis With 6-Aminonicotinamide. *Archives of Dermatology*, *111*(7), 880. <https://doi.org/10.1001/archderm.1975.01630190070007>
- Zhu, Q., Guo, T., Xia, D., Li, X., Zhu, C., Li, H., & Ouyang, D. (2013). Pluronic F127-modified liposome-containing tacrolimus–cyclodextrin inclusion complexes: improved solubility, cellular uptake and intestinal penetration. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *65*, 1107–1117. <https://doi.org/10.1111/jphp.12074>

ANEXOS

Anexo 1: Dados estatísticos das análises de tamanho de partícula fornecidos pelo equipamento

Quadros contendo os dados estatísticos fornecidos pelo software ZS XPLOERER das análises de tamanho de partícula e índice de polidispersividade realizadas em triplicata para os sistemas S1 a S7.

S1 – sem adição de AA

Name	Mean	Standard Deviation	RSD	Minimum	Maximum	
Z-Average (nm)	357,6	-	-	357,6	357,6	
Polydispersity Index (PI)	0,2899	-	-	0,2899	0,2899	
Peak 1 Mean by Intensity ordered by area (nm)	485,8	-	-	485,8	485,8	
Peak 1 Area by Intensity ordered by area (%)	100	-	-	100	100	

S2- 1mg de AA

Name	Mean	Standard Deviation	RSD	Minimum	Maximum	
Z-Average (nm)	290,5	8,179	2,815	283,5	299,5	
Polydispersity Index (PI)	0,2906	0,01972	6,784	0,2791	0,3134	
Peak 1 Mean by Intensity ordered by area (nm)	405,2	16,36	4,038	386,4	415,5	
Peak 1 Area by Intensity ordered by area (%)	97,79	3,833	3,92	93,36	100	
Peak 2 Mean by Intensity ordered by area (nm)	67,6	-	-	67,6	67,6	
Peak 2 Area by Intensity ordered by area (%)	6,639	-	-	6,639	6,639	

S3- 2mg de AA

Name	Mean	Standard Deviation	RSD	Minimum	Maximum	
Z-Average (nm)	335,9	-	-	335,9	335,9	
Polydispersity Index (PI)	0,2751	-	-	0,2751	0,2751	
Peak 1 Mean by Intensity ordered by area (nm)	453,3	-	-	453,3	453,3	
Peak 1 Area by Intensity ordered by area (%)	100	-	-	100	100	

S4 – 3 mg de AA

Name	Mean	Standard Deviation	RSD	Minimum	Maximum	
Z-Average (nm)	317,4	-	-	317,4	317,4	
Polydispersity Index (PI)	0,1884	-	-	0,1884	0,1884	
Peak 1 Mean by Intensity ordered by area (nm)	380,6	-	-	380,6	380,6	
Peak 1 Area by Intensity ordered by area (%)	100	-	-	100	100	

S5 – 5mg de AA

Name	Mean	Standard Deviation	RSD	Minimum	Maximum	
Z-Average (nm)	317,5	-	-	317,5	317,5	
Polydispersity Index (PI)	0,2397	-	-	0,2397	0,2397	
Peak 1 Mean by Intensity ordered by area (nm)	405,1	-	-	405,1	405,1	
Peak 1 Area by Intensity ordered by area (%)	100	-	-	100	100	

S6 – 10mg de AA

Name	Mean	Standard Deviation	RSD	Minimum	Maximum	
Z-Average (nm)	365,8	-	-	365,8	365,8	
Polydispersity Index (PI)	0,285	-	-	0,285	0,285	
Peak 1 Mean by Intensity ordered by area (nm)	517,4	-	-	517,4	517,4	
Peak 1 Area by Intensity ordered by area (%)	98,97	-	-	98,97	98,97	
Peak 2 Mean by Intensity ordered by area (nm)	19,09	-	-	19,09	19,09	
Peak 2 Area by Intensity ordered by area (%)	0,7223	-	-	0,7223	0,7223	

S7 – 20mg de AA

Name	Mean	Standard Deviation	RSD	Minimum	Maximum	
Z-Average (nm)	399,2	-	-	399,2	399,2	
Polydispersity Index (PI)	0,2847	-	-	0,2847	0,2847	
Peak 1 Mean by Intensity ordered by area (nm)	524,8	-	-	524,8	524,8	
Peak 1 Area by Intensity ordered by area (%)	100	-	-	100	100	

Anexo 2: Gráfico dos dados de liberação cumulativa de AA, a partir das NPs preparadas no capítulo 7, em pH 5,5 e 7,4, ajustados a 4 modelos cinéticos.

