

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS INOVADORAS CONTENDO FUCOXANTINA:
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CONTROLE DE QUALIDADE E
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA**

Letícia Malgarim Cordenonsi

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS INOVADORAS CONTENDO FUCOXANTINA:
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CONTROLE DE QUALIDADE E
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA**

Tese apresentada por **LETÍCIA
MALGARIM CORDENONSI** para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof.^a Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval
Coorientador (a): Prof.^a Dr. Renata Platcheck Raffin

Porto Alegre
2018

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 14 de dezembro de 2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Diogo Miron

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. Nathalie Ribeiro Wingert

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. Sabrina Nunes Nascimento

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Malgarim Cordenonsi, Leticia
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS INOVADORAS CONTENDO
FUcoxANTINA: DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CONTROLE DE
QUALIDADE E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA / Leticia Malgarim
Cordenonsi. -- 2018.

237 f.

Orientadora: Elfrides Eva Scherman Schapoval.

Coorientadora: Renata Platcheck Raffin.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2018.

1. fucoxantina. 2. cancer. 3. nanoparticulas
lipidicas. 4. validação. 5. avaliação toxicológica. I.
Scherman Schapoval, Elfrides Eva, orient. II.
Platcheck Raffin, Renata, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico Elfrides Schapoval, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com bolsa de estudos CAPES e *no Dipartimento di Scienze del Farmaco da Università degli Studi di Pavia (Pavia/Itália)*, através do Programa PDSE/CAPES.

Aos meus pais
que me apoiaram em
todos momentos e me
incentivaram a aceitar desafios.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Paulo Cezar e Maria Izabel, e a meu irmão Carlos, por me mostrarem a importância do estudo, pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Agradeço, de forma especial, à minha orientadora Prof^a. Elfrides Schapoval, por ter acreditado em mim, pelo incentivo à pesquisa e pela oportunidade que me concedeu de realizar o mestrado e doutorado e, acima de tudo pelo exemplo de profissional e pessoal. Agradeço também à minha coorientadora Prof^a. Renata Raffin pelos ensinamentos transmitidos e aos demais professores do grupo.

Agradeço à Prof^a. Giuseppina Sandri pela acolhida e pela oportunidade de trabalho junto ao seu grupo de pesquisa na *Università Degli Studi di Pavia* e também aos colegas de laboratório pelo acolhimento e amizade.

Aos meus colegas do Laboratório 402, em especial à Rafaela, Julia, Joanna, Lívia e Mariana. Obrigada pelo convívio, auxílio e pela amizade.

Ao Prof. Helder Teixeira e o LATOX pela parceria científica.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho.

A todos que mesmo não citados, contribuíram para este trabalho e participaram desta etapa na minha vida. Muito obrigada!

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente Tese foi redigida na forma de capítulos, com encarte de publicações, para uma melhor compreensão e discussão dos resultados obtidos. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- Introdução contendo a apresentação do tema;
- Objetivo geral e objetivos específicos do trabalho;
- Revisão bibliográfica;
- Capítulo I: Caracterização da fucoxantina e do seu isômero e o desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE;
- Capítulo II: Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas inovadoras contendo uma combinação de manteiga de bacuri e óleo de tucumã;
- Capítulo III: Desenvolvimento e caracterização de hidrogel contendo nanopartículas lipídicas inovadoras de fucoxantina para aplicação cutânea;
- Capítulo IV: Avaliação toxicológica *in vitro* de nanopartículas lipídicas contendo fucoxantina e seus isômeros;
- Capítulo V: O papel da quitosana como revestimento de nanopartículas lipídicas na liberação de fucoxantina na pele;
- Discussão geral: proporcionar uma compreensão geral dos resultados obtidos;
- Conclusões;
- Referências.

RESUMO

A fucoxantina (FUCO) tem apresentado efeitos promissores no tratamento do câncer, como promotor da apoptose, indutor da interrupção do ciclo celular, supressor de metástases e ação cutânea na melanogênese induzida por raios UVB. As nanopartículas lipídicas (NL) apresentam destaque frente a outros sistemas e novas matérias-primas vêm sendo utilizadas para sua preparação, destacando-se as matérias-primas provenientes da Amazônia brasileira. No entanto, a FUCO é uma molécula instável, o que limita seu uso. Diante do exposto, o presente trabalho visa o desenvolvimento de NL inovadoras contendo uma combinação de manteiga de bacuri e óleo de tucumã para a incorporação da FUCO (NL-FUCO). O **Capítulo I** apresenta a caracterização por espectrometria de massas e de ressonância magnética nuclear da FUCO matéria-prima, que foi adquirida em duas apresentações, incorporada em um óleo e em pó. As duas matérias-primas da FUCO foram identificadas como total-*trans* e 9'-*cis* FUCO, respectivamente. Na etapa seguinte, foi desenvolvido um método analítico indicativo de estabilidade por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação e controle de qualidade da FUCO e do seu isômero. Para isto, foi utilizada uma coluna C18, fase móvel isocrática composta por acetonitrila e água pH 7,0 (9,5:0,5 v/v) e detecção em 450 nm. Os resultados demonstraram que o método é linear na faixa de concentração estudada, preciso e exato. A robustez do método foi avaliada por desenho experimental Box-Behnken, demonstrando que as modificações nos fatores estudados não interferiram na quantificação da FUCO. No **Capítulo II**, as NL inovadoras foram desenvolvidas com o preparo de seis formulações, variando as proporções da manteiga de bacuri e do óleo de tucumã, pelo método homogeneização de alto cisalhamento. Na etapa seguinte, estas formulações foram caracterizadas e os resultados indicaram que o diâmetro médio das NL foram inferiores a 255 nm, com baixo índice de polidispersão (pdl) e potencial zeta entre -11 mV e -24 mV. A avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrou partículas esféricas, homogêneas e com dimensões nanométricas. No estudo de estabilidade, todas as formulações mantiveram-se estáveis por dois meses à temperatura ambiente, porém a formulação com 5% de manteiga de bacuri e 4% de óleo de tucumã apresentou melhores resultados. No **Capítulo III**, está descrita a incorporação da FUCO na formulação de NL inovadoras

anteriormente selecionada. As NL-FUCO apresentaram diâmetro médio de 243 nm, baixo pdl, alta taxa de encapsulação e teor adequado. O método por CLAE para quantificação da FUCO nas NL demonstrou ser linear, preciso e exato. Na segunda etapa, as NL-FUCO foram incorporadas em um hidrogel e apresentaram pH adequado para aplicação cutânea, mantendo sua dimensão nanométrica, com baixo pdl e teor próximo a 100%. No estudo de fotoestabilidade com luz UVA, as NL protegeram a FUCO. No estudo de estabilidade, as NL-FUCO mostraram-se estáveis durante 45 dias armazenadas em 6 °C, 25 °C e 40 °C. O estudo de dissolução indicou uma liberação sustentada da FUCO a partir das NL, quando comparada à FUCO livre. Através dos estudos de permeação cutânea *in vitro*, foi possível quantificar a FUCO na epiderme e na derme e comprovou-se a capacidade das NL em modificar a permeação da FUCO. Quando o estrato córneo foi removido, as concentrações da FUCO aumentaram na epiderme e na derme. Em conclusão, os resultados obtidos demonstram que as NL-FUCO são um sistema promissor para aplicação cutânea. O **Capítulo IV** apresenta a avaliação toxicológica *in vitro* da FUCO e das NL-FUCO, através dos ensaios de citotoxicidade por MTT, vermelho neutro e o método de exclusão com azul de Tripán. Concomitantemente, foram avaliadas as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e o potencial de membrana mitocondrial. A partir dos resultados obtidos, NL-FUCO se mostrou biocompatível com células 3T3 até a concentração de 80 µg/mL. Houve aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e do potencial de membrana mitocondrial, sugerindo que a FUCO possui capacidade pró-oxidante e impulsiona a síntese de adenosina trifosfato (ATP). Porém, são necessários estudos para a investigação da toxicidade *in vivo* das NL-FUCO. No **Capítulo V**, descreve-se o papel da quitosana no revestimento das NL-FUCO. O revestimento com quitosana aumentou o tamanho das NL, entretanto os valores se mostraram adequados para sistemas nanométricos. Com a análise do potencial zeta e a da MET pode-se confirmar a presença do revestimento com quitosana. O estudo de bioadesão *in vitro* foi realizado com membrana de casca de ovo e confirmou que revestimento de quitosana aumentou significativamente a bioadesão das NL. O estudo de proliferação *in vitro* evidenciou que as LN-FUCO mantiveram as propriedades de proliferação da quitosana.

Palavras-chave: Fucoxantina, câncer, nanopartículas lipídicas, validação, estudo de estabilidade, avaliação toxicológica.

ABSTRACT

Fucoxanthin (FUCO) has shown promising effects in the cancer treatment, such as apoptosis promoter, cell cycle arrest, inhibition of metastasis and cutaneous action in UVB induced melanogenesis. Lipid nanoparticles (LN) are prominent compared to other systems and new raw materials are being used for the preparation, highlighting the raw materials coming from the Brazilian Amazon. However, FUCO is an unstable molecule, which limits its use. Therefore, the present work aims to develop of innovative LN containing a combination of bacuri butter and tucumã oil for the incorporation of FUCO (LN-FUCO). **Chapter I** presents the characterization by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance of FUCO raw material, which was acquired in two presentations, incorporated in an oil and powder. The two FUCO raw materials were identified as total-*trans* and 9'-*cis* FUCO. In the next step, an analytical method was developed for the quantification and quality control of FUCO and its isomer by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). For this, a C18 column, isocratic mobile phase composed of acetonitrile and water pH 7.0 (9.5:0.5 v/v) and detection at 450 nm were used. The results demonstrated that the method is linear in the concentration range studied, accurate and precise. The robustness of the method was evaluated by the Box-Behnken experimental design, demonstrating that the modifications in the factors studied did not interfere in the quantification of FUCO. **In Chapter II**, the innovative LN were developed, six formulations were prepared, varying the proportion of the butter of bacuri and of the oil of tucumã, by high shear homogenization method. In the next step, these formulations were characterized and the results indicated that the mean diameter of LN were lower than 255 nm, polydispersion index (pdl) lower and zeta-potential between -11 mV and -24 mV. The assessment of morphology by transmission electron microscopy showed spherical homogeneous and with nanometric dimensions particles. In the stability study, all formulations were stable for two months at room temperature; however, the formulation with 5% bacuri butter and 4% tucumã oil presented the best result. **Chapter III** describes the incorporation of FUCO in the innovative LN. The LN-FUCO presented a mean diameter of 243 nm, pdl lower, high entrapment efficiency and adequate drug loading. The HPLC method for quantification of FUCO in LN was shown to be linear, precise and accurate. In the second step, the LN-FUCO were incorporated in a hydrogel and presented a suitable pH for cutaneous application,

maintaining its nanometric dimension, with pdl lower and close to 100% drug loading. In the study of photostability with UVA light, LN protected FUCO. In the stability study, LN-FUCO were stable for 45 days stored at 6 °C, 25 °C and 40 °C. The dissolution studies indicated a sustained release of FUCO from LN as compared to FUCO free. Through *in vitro* skin permeation studies, it was possible to quantify the FUCO in the epidermis and dermis and to demonstrate the ability of LN to modify the FUCO permeation. When the stratum corneum was removed, FUCO concentrations increased in the epidermis and in the dermis. In conclusion, the results obtained demonstrate that LN-FUCO is a promising system for cutaneous application. **Chapter IV** presents the *in vitro* toxicological evaluation of FUCO and LN-FUCO through MTT assay, neutral red, and trypan blue dye exclusion test. Concomitantly, the reactive oxygen and nitrogen species and the mitochondrial membrane potential were evaluated. From the results, LN-FUCO is biocompatible with 3T3 cells up to the concentration of 80 µg/mL. There were increased reactive species and mitochondrial membrane potential, suggesting that FUCO possesses pro-antioxidant capacity and boosts the synthesis of adenosine triphosphate (ATP). However, studies are needed to investigate the *in vivo* toxicity of LN-FUCO. In **Chapter V** describes the role of chitosan in the coating of LN-FUCO. The chitosan coating increased the size of the LN; however the values were shown to be adequate for nanometric systems. The presence of chitosan can be confirmed by the analysis of the zeta-potential and MET. *In vitro* bioadhesion study was performed with egg shell membrane and confirmed that chitosan coating significantly increased the bioadhesion of LN. *In vitro* study showed that the LN-FUCO maintained the proliferation properties of chitosan.

Keywords: Fucoxanthin, cancer, lipid nanoparticles, validation, stability studies, toxicological evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As principais camadas da pele, a epiderme, a derme e a hipoderme e seus vários anexos	33
Figura 2. Rotas para atravessar o estrato córneo: (A): via transepidérmica: via intercelular e transcelular e (B) via transapêndices	35
Figura 3. Níveis de invasão do câncer de pele: (I): é limitado à epiderme; (II): invade parcialmente a derme papilar; (III): preenche completamente a derme papilar; (IV): estende-se até a derme reticular; (V): estende-se para a hipoderme	37
Figura 4. Alga <i>Laminaria japonica</i> e em destaque a região da alga que é utilizada para extrair a fucoxantina.	39
Figura 5. Estrutura da (a) total- <i>trans</i> fucoxantina, (b) 9'- <i>cis</i> fucoxantina (c) 13- <i>cis</i> fucoxantina e (d) 13'- <i>cis</i> fucoxantina.	40
Figura 6. Fatores (moléculas e mecanismos) que são regulados pela fucoxantina, resultando em efeitos anticarcinogênicos	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	Célula-B do linfoma 2
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Homonuclear correlation spectroscopy</i> /Ressonância magnética nuclear bidimensional
COX-2	Ciclooxigenase 2
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DAD	Detector de arranjo de diodos
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> / Espalhamento de luz dinâmico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> / Calorimetria exploratória diferencial;
EM	Espectrometria de massas
FUCO	Fucoxantina
GIJC	<i>Gap junctional intercellular communication</i> /Junção da comunicação intracelular
ICH	<i>International Council for Harmonization</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
I-κB	Proteína inibitória κB
m/z	Relação massa/carga
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MC1R	Receptor de melanocortina 1
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MMP-9	Metaloproteína de matris-9
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo
NF-κB	Fator nuclear κB
NR	<i>Neutral red</i> /Vermelho neutro
NL	Nanopartículas lipídicas
NL-FUCO	Nanopartículas lipídicas contendo fucoxantina

pdl	Índice de polidispersão
PRB	Proteína de susceptibilidade ao retinoblastoma
R	Coeficiente de correlação
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> / Espécies reativas do oxigênio
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> / Espécies reativas de nitrogênio
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i> / Farmacopeia Americana
UVA	Raios ultravioletas A
UVB	Raios ultravioletas B
UVC	Raios ultravioletas C

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS.....	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
3.1 Pele.....	33
3.2 Câncer de pele.....	36
3.3 Carotenoides	37
3.4 Fucoxantina (FUCO).....	38
3.4.1 Estabilidade.....	41
3.4.2 Atividades farmacológicas	42
3.4.3 Tratamento e prevenção do câncer.....	45
3.5 Matérias-primas de origem vegetal da Amazônia	46
4. CAPÍTULO I - Caracterização da fucoxantina e do seu isômero e o desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE.....	49
4.2 Artigo científico	53
5. CAPÍTULO II - Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas inovadoras contendo uma combinação de manteiga de bacuri e óleo de tucumã	Erro! Indicador não definido.
5.1 Introdução.....	Erro! Indicador não definido.
5.2 Artigo científico	Erro! Indicador não definido.
6. CAPÍTULO III - Desenvolvimento e caracterização de hidrogel contendo nanopartículas lipídicas inovadoras de fucoxantina para aplicação cutânea	Erro! Indicador não definido.
6.1 Introdução.....	Erro! Indicador não definido.
6.2 Artigo científico	Erro! Indicador não definido.
7. CAPÍTULO IV - Avaliação toxicológica <i>in vitro</i> de nanopartículas lipídicas contendo fucoxantina e seus isômeros	Erro! Indicador não definido.
7.1 Introdução.....	Erro! Indicador não definido.
7.2 Artigo científico	Erro! Indicador não definido.
8. CAPÍTULO V – O papel da quitosana como revestimento de nanopartículas lipídicas na liberação de fucoxantina na pele.....	Erro! Indicador não definido.
8.1 Introdução.....	Erro! Indicador não definido.
8.2 Artigo científico	Erro! Indicador não definido.
9. DISCUSSÃO GERAL.....	195

10. CONCLUSÕES..... 211
11. REFERÊNCIAS 215

Em todo o mundo, mais de oito milhões de pessoas morrem anualmente em decorrência de câncer. No Brasil, o câncer de pele não melanoma é o que apresenta maior incidência, correspondendo a 29% de todos os tumores malignos registrados no país. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que, entre 2018-2019, irão surgir aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, dentre estes 170 mil são de pele (WHO, 2012; BRASIL, 2017).

No tratamento do câncer, o uso de quimioterápicos produz efeitos colaterais graves, há resistência intrínseca à quimioterapia e o tratamento com radiação é tóxico, eliminando não apenas células tumorais, mas também células saudáveis. Na busca de novos medicamentos, há um crescente interesse em produtos naturais a partir de fontes marinhas, e especialmente produtos provenientes de algas (MOLASSIOTIS et al., 2005; MUTHUIRULAPPAN e FRANCIS, 2013). O carotenoide fucoxantina (FUCO) é um pigmento laranja presente em algas marinhas, que tem apresentado efeitos promissores no tratamento do câncer, como promotor da apoptose, indutor da interrupção do ciclo celular, supressor de metástases e ação cutânea na melanogênese induzida por raios ultravioletas B (UVB) (SHIMODA et al., 2010; KUMAR, MASASHI e KAZUO, 2013).

As nanopartículas estão sendo empregadas com sucesso na área farmacêutica por aumentarem a eficiência em sistema na entrega de substâncias ativas lipofílicas, aumentarem a seletividade e a eficiência, protegerem contra degradação e reduzirem os efeitos colaterais (BONIFÁCIO et al., 2014). A aplicação cutânea de carreadores coloidais tem como objetivo a liberação sustentada da substância ativa encapsulada, podendo suprir a pele por um período de tempo prolongado, proporcionando índices terapêuticos mais adequados, além de reduzir os efeitos adversos em sítios não específicos e a irritação no local de administração (BARRATT, 2003). Diante do exposto, as nanopartículas lipídicas (NL) apresentam destaque frente a outros sistemas nanoestruturados, pois possibilitam a incorporação de ativos lipofílicos. Além disso, os seus componentes possuem baixa citotoxicidade e a possibilidade de produção por método simples, sem o uso de solventes orgânicos (ALMEIDA e SOUTO, 2007; SHAH et al., 2007).

Novas matérias-primas vêm sendo utilizadas para a preparação de NL, destacando-se as matérias-primas provenientes da Amazônia brasileira. O presente trabalho propõe o uso inédito da combinação da manteiga de bacuri e o óleo de

tucumã para a produção de NL inovadoras para aplicação cutânea. Estas matérias-primas são emolientes e também podem ser utilizadas como um agente hidratante. Como novos ativos, bacuri tem alto nível de tripalmitina e ácido palmitoleico graxo, além disso, representa uma rica fonte de xantonas e benzofenonas poliisopreniladas. O tucumã é rico em ômega 3, 6 e 9, carotenoides e também é uma importante fonte de vitamina B2 (DE ROSSO e MERCADANTE, 2007; ACUNA, JANCOVSKI e KENNELLY, 2009; MORAIS e GUTJAHR, 2009; LUSTOSA et al., 2016).

Diante do exposto, a FUCO tem ação promissora no tratamento tópico do câncer de pele, entretanto a molécula é extremamente instável, o que limita seu uso. Assim, o presente trabalho visa o desenvolvimento de NL inovadoras contendo uma combinação de manteiga de bacuri e óleo de tucumã para a incorporação da FUCO (NL-FUCO) para aplicação cutânea, bem como, a avaliação toxicológica *in vitro* da FUCO e das NL-FUCO.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas inovadoras contendo uma combinação de manteiga de bacuri e óleo de tucumã para a incorporação da fucoxantina, bem como, conduzir estudos para validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para o controle de qualidade.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar por meio das técnicas de espectrometria de massas e de ressonância magnética nuclear a FUCO matéria-prima, que foi adquirida em duas apresentações, incorporada em um óleo e em pó;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação da FUCO por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Desenvolver e caracterizar as nanopartículas lipídicas inovadoras contendo matérias-primas da Amazônia brasileira pelo método de homogeneização de alto cisalhamento;
- Incorporar a FUCO nas nanopartículas lipídicas inovadoras anteriormente preparadas e realizar a caracterização físico-química;
- Incorporar a suspensão de nanopartículas lipídicas inovadoras contendo FUCO em um gel e realizar a caracterização físico-química;
- Realizar estudo de dissolução e permeação cutânea *in vitro*;
- Realizar estudos toxicológicos *in vitro*;
- Revestir as nanopartículas lipídicas contendo FUCO com quitosana.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e representa a principal comunicação com o meio externo. Diversas funções são desempenhadas pela pele, como a regulação da temperatura corporal, função sensorial, proteção física e contra radiação ultravioleta. A pele possui pH levemente ácido, variando entre 4,60-5,80, decorrente da presença de aminoácidos e de ácido láctico (DEGIM, 2006; BOLZINGER et al., 2012).

Apesar de sua espessura variar de acordo com as diferentes partes do corpo, a estrutura fundamental da pele é basicamente a mesma, conforme demonstrado na Figura 1. É composta de três camadas principais, a epiderme estratificada e vascularizada, a derme e a hipoderme, possuindo ainda vários anexos como folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas. A epiderme, que constitui a camada mais externa, é a que merece mais atenção nos estudos de permeação cutânea. Esta camada é subdividida em cinco estratos, que são denominados, da parte inferior para superior, em germinativo ou basal, espinhoso, granuloso, lúcido e estrato córneo. A maior parte da epiderme é constituída por um epitélio escamoso, que é formado principalmente pelos queratinócitos (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004; LACHMAN, LIEBERMAN e LINKKANIG, 2010; BENSON e WATKINSON, 2012).

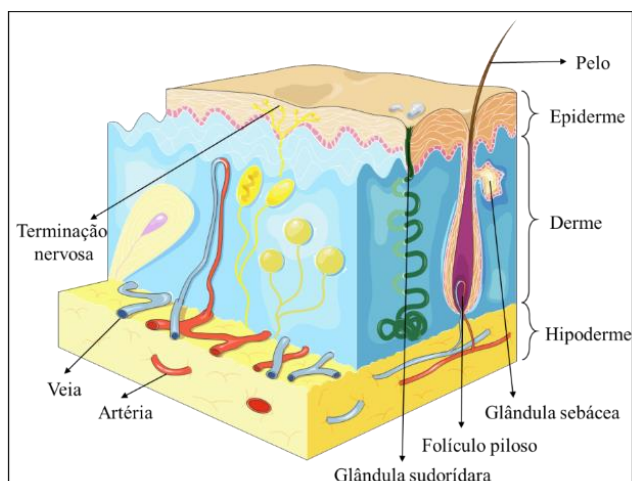


Figura 1. As principais camadas da pele: a epiderme, a derme e a hipoderme e seus vários anexos (Figura produzida pelos elementos da Servier Medical Art:

www.servier.fr/servier-medical-art).

O estrato córneo, com apenas 10 a 15 μm de espessura, regula a perda de água e previne a entrada de substâncias prejudiciais e de microrganismos na superfície da pele. Estruturalmente, o estrato córneo é uma camada heterogênea, composta por queratinócitos localizados em uma matriz lipídica organizada em bicamadas lamelares. Esta camada é constituída por aproximadamente 15 a 20% de água, sendo esta quantidade importante para manter a elasticidade e integridade da pele (KULKARNI, 2010; BENSON e WATKINSON, 2012).

Abaixo da epiderme está localizada a derme, que é constituída por fibras proteicas de colágeno, elastina e matriz extracelular. Essa camada de tecido conjuntivo tem a função de dar suporte, elasticidade e flexibilidade aos tecidos. Serve de barreira à permeação de fármacos muito lipofílicos, diminuindo assim a permeação destes para as camadas mais profundas. Na epiderme estão localizados os capilares, glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos, nervos e terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004; DEGIM, 2006; LACHMAN, LIEBERMAN e LINKKANIG, 2011).

A camada mais interna é a hipoderme ou tecido celular subcutâneo, que não faz parte da pele propriamente dita, apenas a une aos órgãos subjacentes. É uma camada de reserva energética, sendo composta por adipócitos, proporcionando ação isolante contra o frio (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004; LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2010; BOLZINGER et al., 2012).

Conforme apresentado na Figura 2, existem duas maneiras para a substância ativa atravessar o estrato córneo intacto, via transepidérmica ou via transapêndices.

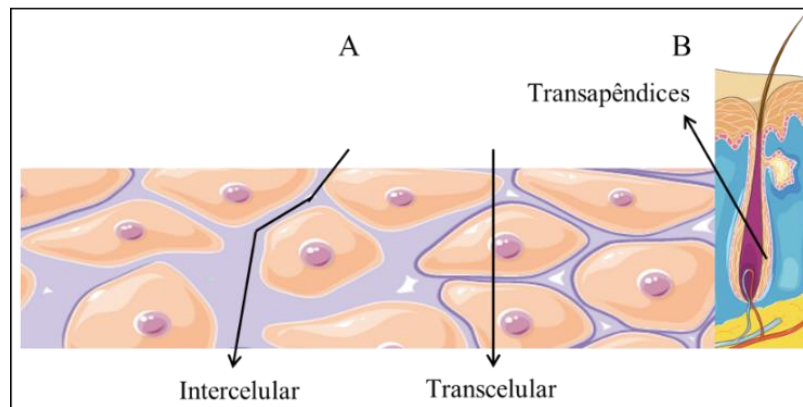


Figura 2. Rotas para atravessar o estrato córneo: (A): via transepidérmica: via intercelular e transcelular e (B) via transapêndices (Figura produzida pelos elementos da Servier Medical Art: www.servier.fr/servier-medical-art).

Pela via transepidérmica, a substância ativa pode percorrer dois caminhos, a via intercelular e transcelular. Na via intercelular, que é o caminho mais comum, a permeação ocorre entre os corneócitos e a substância ativa passa pela matriz extracelular, de características hidrofílicas. Na via transcelular, a permeação ocorre através dos corneócitos e da matriz lipídica, encontrando estruturas lipofílicas e hidrofílicas, o que lhe dificulta a permeação. Na via transapêndices, a permeação ocorre através dos anexos da pele, como os pêlos e as glândulas. Esta última, não é considerada como uma rota significativa para a permeação de fármacos, porque os anexos cutâneos ocupam somente 0,1% da área total da superfície da pele. No entanto, a entrega da substância ativa por esta via pode ser importante para a permeação de compostos que se difundem lentamente e de substâncias com elevado peso molecular, tais como as nanopartículas (TROMMER e NEUBERT, 2006; LADEMANN et al., 2011; LANE 2013).

Desta forma, a pele é uma barreira natural para a penetração de substâncias. Portanto, dificilmente uma substância ativa administrada topicamente, sem uma formulação adequada, atingirá as camadas mais profundas da pele, em concentrações suficientes para o tratamento de tumores cutâneos. Dentre os métodos utilizados para melhorar a penetração cutânea de fármacos, pode-se citar os sistemas de liberação modificados como os lipossomas e as nanopartículas (MOSER et al., 2001; WELSS, BASKETTER e SCHRÖDER, 2004). Entretanto, não existe regra para prever como ocorre a permeação de sistemas nanoestruturados,

pois vai depender das características físico-químicas de cada sistema, como o diâmetro de partícula e a hidrofobicidade (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004). O efeito oclusivo, devido à dimensão nanométrica das partículas, é um fator que deve ser considerado, pois afeta a penetração de substâncias ativas, podendo ocasionar um controle maior da penetração dos sistemas nanoestruturados (JAIN et al., 2014).

Além da barreira natural que a pele representa, há evidências que demonstram que a maioria das células cancerosas possui resistência à apoptose ou apresentam mecanismos de apoptose defeituosos, permitindo assim o desenvolvimento incontrolável de células. O processo de apoptose, portanto, é o principal alvo de agentes quimioterápicos (OKADA e MAK, 2004; CHINEMBIRI et al., 2014).

3.2 Câncer de pele

O câncer de pele é a neoplasia mais frequentemente diagnosticada em caucasianos em todo o mundo e a incidência continua aumentando devido ao aumento da exposição à luz ultravioleta. Além disso, existem outros agentes causadores, dos quais incluem-se vírus, predisposição genética, agentes mutagênicos presentes em alimentos e em produtos químicos (ERB et al., 2005).

A doença é caracterizada pelo crescimento anormal e descontrolado das células que compõem as diferentes camadas da pele. Define-se os diferentes tipos de câncer de pele de acordo com a camada da pele que é afetada (Figura 3). O mais frequente é o câncer de pele não melanogênico, também chamado de carcinoma basocelular, que é responsável por 70% dos casos e surge nas células basais, que se encontram na camada mais profunda da epiderme. O carcinoma epidermóide é responsável por 25% dos casos e afeta as células espinhosas. O mais agressivo e raro, detectado em 4% dos pacientes, é o melanoma, que tem origem nos melanócitos (CHINEMBIRI et al., 2014; BRASIL, 2015).

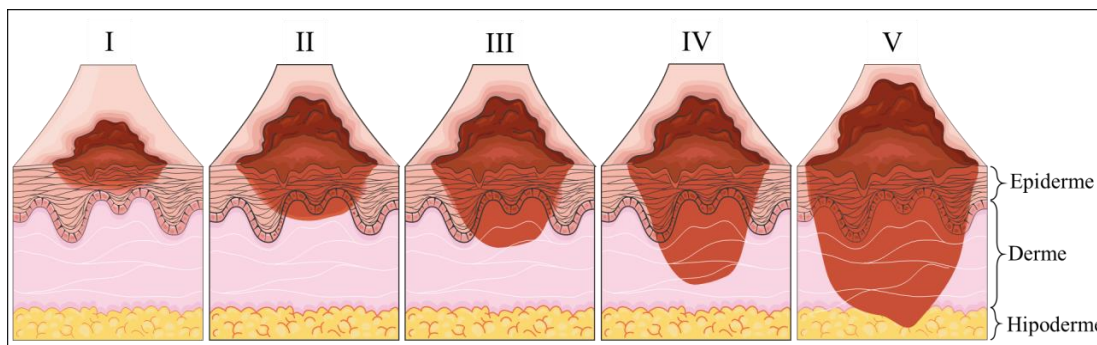


Figura 3. Níveis de invasão do câncer de pele: (I): é limitado à epiderme; (II): invade parcialmente a derme papilar; (III): preenche completamente a derme papilar; (IV): estende-se até a derme reticular; (V): estende-se para a hipoderme (Figura produzida pelos elementos da Servier Medical Art: www.servier.fr/servier-medical-art).

No tratamento tópico do câncer de pele, a substância ativa necessita atravessar o estrato córneo para atingir as camadas mais profundas da pele, onde está localizado o tumor. Entretanto, o estrato córneo forma a principal barreira contra a penetração de substâncias na pele, devido as suas bicamadas lipídicas e os queratinócitos (TROMMER e NEUBERT, 2006; LADEMANN et al., 2011; LANE 2013).

3.3 Carotenoides

Os carotenoides são amplamente difundidos na natureza, estando presentes em algas, plantas superiores, fungos e bactérias, sendo responsáveis pela coloração amarela, laranja ou vermelha destes (MCNULTY, JACOB e MASON, 2008; GAMMONE, RICCIONI e D'ORAZIO, 2015). Estruturalmente, os carotenoides são tetraterpenoides que contêm oito unidades de isopreno, formando assim uma estrutura básica de 40 carbonos. Esta estrutura básica pode ser modificada através de reações de ciclização, hidrogenação e desidrogenação; introdução de grupos contendo moléculas de oxigênio; rearranjos, encurtamento da cadeia ou combinações dessas modificações, resultando em diversas estruturas (YAHIA e ORNELAS, 2010).

A classificação dos carotenoides pode ser dada de acordo com sua origem, em marinhos ou terrestres e de acordo com sua estrutura química, em carotenos ou

xantofilas. Os carotenos não possuem oxigênio em sua estrutura química, apresentando características hidrofóbicas, como o β -caroteno e o licopeno. As xantofilas são pigmentos amarelos e possuem oxigênio na estrutura química, apresentando-se quimicamente menos hidrofóbicas e mais polares que os carotenos. O oxigênio pode estar ligado à molécula como uma hidroxila ou como pares de átomos de hidrogênio que são substituídos por átomos de oxigênio atuando como uma ponte (grupamento epóxido). O grupo das xantofilas inclui a FUCO, luteína, zeaxantina, neoxantina, entre outros compostos (MCNULTY, JACOB e MASON, 2008; GAMMONE, RICCIONI e D'ORAZIO, 2015).

Os efeitos benéficos dos carotenoides contra o câncer e doenças cardiovasculares foram reconhecidos e estimulam intensas investigações sobre o papel desses compostos como antioxidantes e como reguladores de resposta do sistema imune. Apesar de muitas hipóteses comprovadas, suas funções não estão completamente elucidadas *in vivo* (UENOJO, MARÓSTICA JUNIOR e PASTORE, 2007).

3.4 Fucoxantina (FUCO)

A FUCO é considerada o mais abundante de todos os carotenoides com pigmentação alaranjada que não são convertidos em vitamina A (não pró-vitamina A). Este carotenoide é encontrado em cloroblastos de numerosas classes de macroalgas e microalgas marinhas, como *Undaria pinnatifida* (Wakame), *Laminaria japonica* (Ma-Kombu), *Phaeodactylum tricornutum* e *Cylindrotheca closterium*. Essas algas crescem ao longo da costa do Pacífico e sua colheita ocorre entre os meses de junho e julho. Logo após a colheita, a alga é seca e a FUCO é extraída. O seu rendimento médio é de 20 mg por 100 g de alga seca, porém, a quantidade extraída pode diferir significativamente dependendo da espécie da alga (Figura 4) (SHIMODA et al., 2010; KIM et al., 2012; GAGEZ et al., 2012).

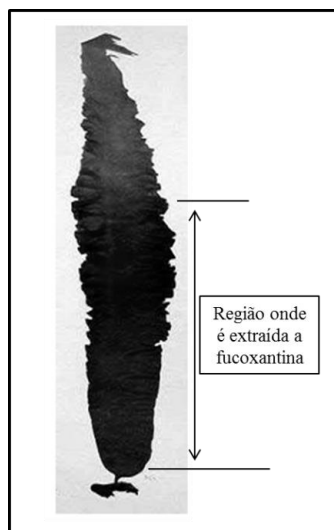


Figura 4. Alga *Laminaria japonica* e em destaque a região da alga que é utilizada para extrair a fucoxantina (Adaptado de KANAZAWA et al., 2008).

A estrutura completa da FUCO, incluindo a sua quiralidade, foi elucidada por Englert e colaboradores (1990). A molécula da FUCO apresenta massa molecular de 658,92 g/mol e fórmula molecular $C_{42}H_{58}O_6$. É considerada uma estrutura molecular única devido ao grupo alênico (Figura 5), além de grupos funcionais incluindo hidroxilas, epóxido, carbonilas e carboxilas que estão presentes em sua cadeia de polieno (SHO, 2001; SHIMODA et al., 2010; ZHANG et al., 2015).

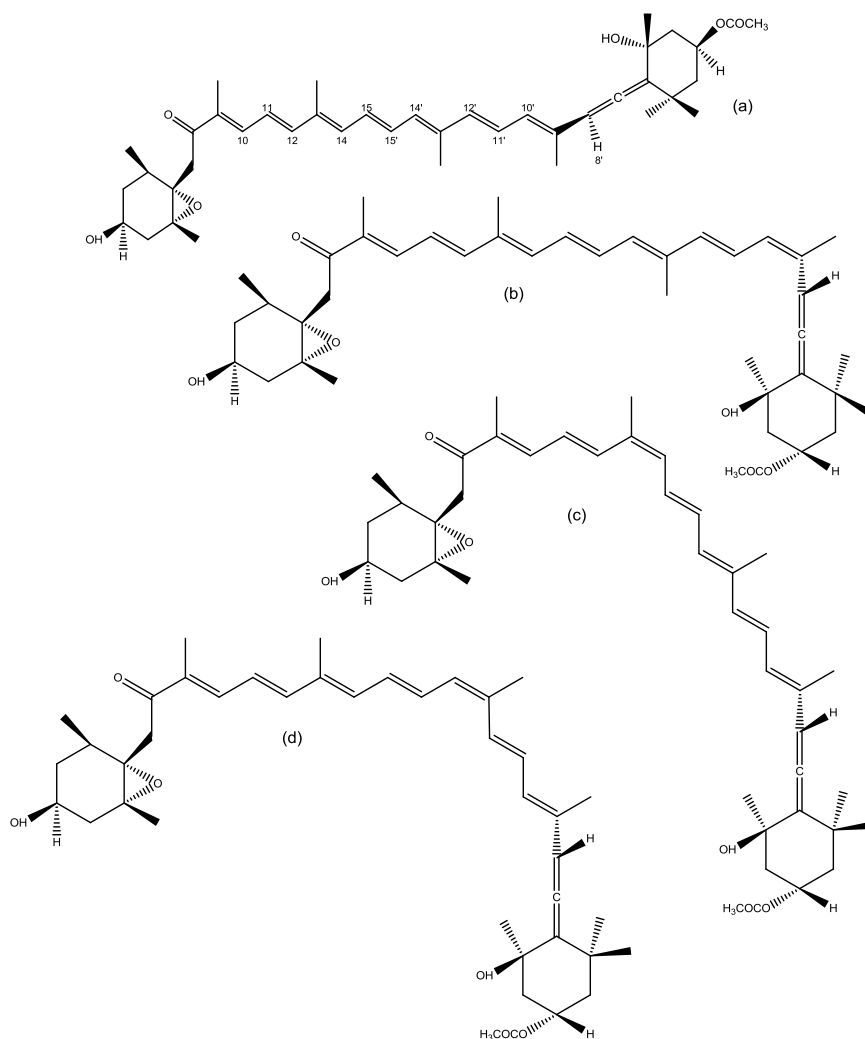


Figura 5. Estrutura da (a) total-*trans* fucoxantina, (b) 9'-*cis* fucoxantina (c) 13-*cis* fucoxantina e (d) 13'-*cis* fucoxantina.

Os carotenoides, em geral, são encontrados em várias formas isoméricas devido à configuração do comprimento da sua cadeia e o conjugado de duplas ligações característicos deste grupo (BOON et al., 2010). Na cadeia de polieno da FUCO, cada ligação dupla pode ter duas configurações, designadas como *cis* ou *trans*, dependendo da disposição dos grupos substituintes. A forma total-*trans* da FUCO é o principal isômero encontrado na natureza. A presença de uma ligação dupla *cis* cria maior impedimento estérico entre os átomos de hidrogênio e / ou grupos metílicos, de modo que os isômeros *cis* são geralmente menos estáveis termodinamicamente do que a forma total-*trans*. Em algas marrons (*Undaria pinnatifida*), total-*trans* FUCO foi o principal isômero encontrado (88%), seguido de uma pequena quantidade de 13-*cis* e 13'-*cis* FUCO (9%) (NAKAZAWA et al., 2009;

ZHANG et al., 2015). Nakazawa e colaboradores (2009) relatam que, embora existam trabalhos sobre os efeitos dos isômeros total-*trans*, pouco se sabe sobre os efeitos biológicos dos isômeros *cis* e a comparação entre eles.

3.4.1 Estabilidade

Como ocorre com outros carotenoides, a FUCO sofre degradação durante o armazenamento, com exposição ao calor, luz, oxigênio, enzimas, lipídios insaturados e outras moléculas pró-oxidantes (AMAN, SCHIEBER e CARLE, 2005; SANGEETHA, BHASKAR, BASKARAN, 2009).

Existem poucos estudos que avaliaram a estabilidade da FUCO. O primeiro foi publicado em 2010, por Hii e colaboradores (2010), no qual foi avaliada a estabilidade da FUCO, por espectrofotometria, quando extraída da alga *Sargassum binderi*. Foram testados diferentes valores de pH, o uso de antioxidante ácido ascórbico 1,0%, a exposição à luz e sob condições escuras no período de 4 semanas. Os resultados revelaram que a FUCO apresentou maior estabilidade quando armazenada em condições sob abrigo da luz e em pH alcalino, em comparação à condição neutra e ácida. Ao abrigo da luz, a adição de ácido ascórbico retarda a degradação da FUCO. Em conclusão, a FUCO é sensível à exposição à luz e às condições de pH ácido, podendo ser estabilizada com a adição de ácido ascórbico.

Em outro estudo, a FUCO foi extraída de algas marrons (*Sargassum binderi*) e submetida a um estudo de estabilidade com diferentes valores de pH, exposição à luz (escuro e claro) e a diferentes temperaturas de armazenamento (4 °C, 25 °C e 50 °C). Os testes de estabilidade demonstraram que a FUCO é mais estável entre os valores de pH 5,0 e 7,0, armazenada ao abrigo da luz e à temperatura entre 4 °C e 25 °C (YIP et al., 2014).

Do mesmo modo, Zhao e colaboradores (2014) investigaram os efeitos do aquecimento, exposição ao oxigênio e luz sobre a estabilidade da FUCO (*Costaria costata*) quando vinculada em óleo de canola. Os resultados demonstraram que o aquecimento promoveu a degradação da FUCO a partir de 25 °C até 100 °C, na ausência de luz e de oxigênio, ressaltando que com o aumento gradativo da temperatura houve a formação de isômeros *cis*, 13-*cis*, 13'-*cis* e 9'-*cis* da FUCO. A exposição ao oxigênio promoveu a degradação oxidativa a 25 °C, enquanto que a

luz fluorescente gerou a degradação dos isômeros 13-*cis* e 13'-*cis*, além da formação considerável do isômero 9'-*cis*.

3.4.2 Atividades farmacológicas

Estudos demonstram que a FUCO possui várias atividades biológicas, atuando no tratamento da dislipidemia (WOO et al., 2010), na prevenção da obesidade (MAEDA et al., 2009), como antidiabético (MAEDA et al., 2007), antioxidante (HEO e JEON, 2009) e no tratamento e prevenção do câncer (MIYASHITA et al., 2011).

Enfatizando nos estudos sobre farmacologia do tratamento e prevenção do câncer, existem linhas de pesquisas com diferentes linhagens celulares e *in vivo*, evidenciando que a FUCO exerce efeitos anticarcinogênicos que envolvem diferentes moléculas e vias, como está esquematizado na Figura 6.

A supressão da formação de tumores de pele foi relatada por Nishino (1995), quando a FUCO foi administrada oralmente em animais. Além da diminuição na porcentagem de ratos com tumores, o número médio de tumores por rato também diminuiu significativamente. Da mesma forma, a FUCO também suprimiu o crescimento de melanoma em ratos (KIM, et al., 2013).

O efeito pró-oxidante da FUCO sobre as células cancerosas está sendo relacionado com a produção de radicais livres, propondo que este seja um dos mecanismos pelos quais a FUCO protege contra as células cancerosas (KOTAKENARA et al., 2001; SANGEETHA, BHASKAR, BASKARAN, 2009). A inibição do crescimento em linhagens celulares de leucemia pela FUCO foi estudada por Kim e colaboradores (2010) e este efeito foi atribuído à geração de espécies reativas do oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS), que leva à apoptose, pela parada do ciclo celular na fase da interfase G1. Entretanto, na literatura também está relatado que a atividade antioxidante da FUCO é devida ao grupo epóxido e às hidroxilas presentes na molécula, consideradas como fortes antioxidantes (BERTRAM e VINE, 2005; D'ORAZIO et al., 2012).

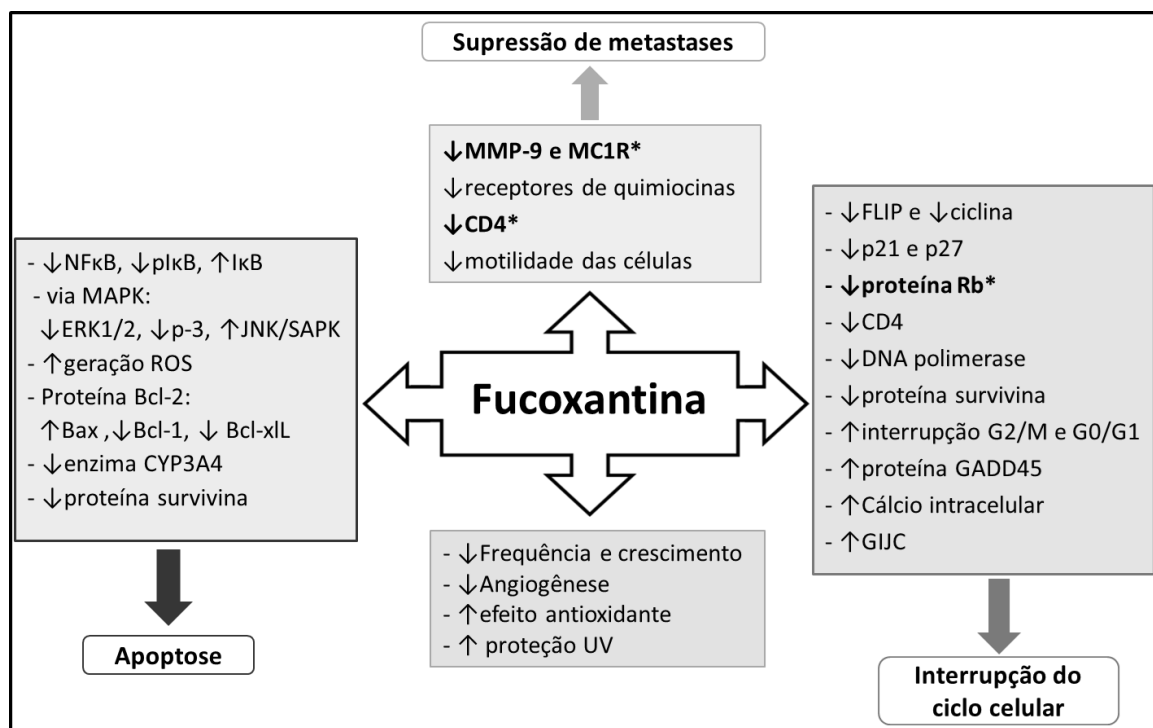
A interrupção do ciclo celular tem sido atribuída a diferentes vias e moléculas. Enquanto Yu e colaboradores (2001) observaram a parada do ciclo celular na fase da interfase G2 e fase mitótica, Liu e colaboradores (2009) relataram o efeito da FUCO à expressão aumentada de genes da junção da comunicação intracelular

(GIJC) e ao aumento dos íons de cálcio intracelular. Além disso, a FUCO interrompeu o crescimento celular na fase da interfase G1 e isso foi acompanhado por alteração na expressão de mais de 50 genes (SATOMI e NISHINO, 2007). Entre estes genes, houve um aumento das proteínas GADD45 (LIEBERMANN et al., 2011), proteínas p21 e p27 (DAS et al., 2005; SATOMI e NISHINO, 2009), proteína FLIP (KOTAKE-NARA et al., 2001) e diminuição da proteína de susceptibilidade ao retinoblastoma (pRb) (DAS et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2011), da survivina (WANG et al., 2012) e da enzima DNA polimerase (MURAKAMI et al., 2002). Ishikawa e colaboradores (2008) encontraram diminuição da expressão da proteína ciclina e linfócitos TCD4 no tratamento com FUCO na leucemia.

O efeito que a FUCO exerce na apoptose de células cancerosas, como na interrupção do ciclo celular, também envolve diferentes vias e moléculas. A FUCO exerce ação sobre as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), diminuindo a expressão das proteínas p38 e ERK1/2 e aumentando a expressão da proteína JNK/SAPK, resultando na apoptose de células no câncer de próstata (SATOMI e NISHINO, 2007; JOHNSON e LAPADAT, 2002). Nakazawa e colaboradores (2009) compararam os efeitos das formas *total-trans* e *cis* da FUCO e observaram uma diminuição das proteínas Bcl-2 (célula-B do linfoma 2), que foi associada à apoptose das células. Neste mesmo sentido, Kotake-Nara e colaboradores (2001) mostraram que houve diminuição na expressão das proteínas Bcl-2 e um aumento da expressão da proteína Bax, que é pró-apoptótica. O fator nuclear κ B (NF- κ B) possui propriedades pró-apoptóticas, e em um estudo, a FUCO reduziu a fosforilação de NF- κ B e pI- κ B e aumentou a expressão da proteína inibitória κ B (I- κ B) (YAMAMOTO et al., 2011). A expressão do gene survivina diminuiu com a administração da FUCO em células T adultas leucêmicas (ISHIKAWA et al., 2008).

Liu e colaboradores (2009) pesquisaram o possível papel da FUCO como adjuvante para prevenir ou superar a resistência aos fármacos induzida pela rifampicina em células com câncer de fígado e células com câncer colorretal humano. No seu estudo, houve a diminuição da atividade e da expressão da enzima citocromo P450 3A4 (CYP3A4) e da atividade do gene promotor do CYP3A4. Assim, os resultados indicam que a FUCO pode desempenhar um papel importante como agente quimioterápico.

Como parte da avaliação de segurança da FUCO, um estudo de toxicidade em ratos foi realizado, por via oral, em dose única (1,0 e 2,0 g/kg) e em doses repetidas (0,50 e 1,0 g/kg) por 30 dias. Em ambas as avaliações, não houve mortalidade e não foram observadas anomalias. No estudo de doses repetidas, a histologia não apresentou mudanças anormais nos tecidos do fígado, rim e do baço, concluindo que a FUCO não demonstra qualquer efeito tóxico relevante após quatro semanas diárias de tratamento (BEPPU et al., 2009a). Os mesmos autores conduziram outro estudo, no qual avaliaram a mutagenicidade do fucoxantíol, o principal composto formado após a ingestão oral da FUCO, pelo teste de Ames, e da FUCO pelo teste de micronúcleos. No teste de Ames, a mutação reversa bacteriana foi avaliada utilizando estirpes de *Salmonella typhimurium* e de *Escherichia coli*, e o resultado foi considerado negativo em todos os casos. No teste de micronúcleos, foram administrados oralmente doses de 0,5; 1,0 e 2,0 g/kg da FUCO em ratos. Após 24 horas, não foram observadas alterações. Com base nos dados do estudo pode-se presumir que a FUCO administrada via oral é um composto seguro em termos de mutagenicidade (BEPPU et al., 2009b).



↑ e ↓ indicam o aumento e diminuição dos fatores;

* fatores envolvidos no câncer de pele

Figura 6. Fatores (moléculas e mecanismos) que são regulados pela fucoxantina, resultando em efeitos anticarcinogênicos (Adaptado de KUMAR, MASASHI e KAZUO, 2013 e MARTIN, 2015).

3.4.3 Tratamento e prevenção do câncer

Na Figura 6, estão destacados alguns fatores envolvidos no câncer de pele. A FUCO inibiu a expressão e secreção de metaloproteína de matriz-9 (MMP-9), ligada à invasão e à migração de tumores. Além disso, também reduz as expressões da glicoproteína da superfície celular (CD44) e receptores de quimiocina, conhecidos por estarem envolvidos na migração, invasão e adesão celular (ASAI, YONEKURA e NAGÃO, 2008). Do mesmo modo, a FUCO causa a interrupção do ciclo celular de células de melanoma através da diminuição das expressões da pRb (KIM et al., 2010; KIM et al., 2013).

A FUCO, em uma concentração que não apresenta efeito citotóxico (30 µM), suprimiu a invasão de células B16-F10 de melanoma em camundongos, bem como a migração celular em um ensaio de cicatrização de feridas. Estes resultados foram acompanhados por uma diminuição de MMP-9, CD44 e do receptor de quimiocina 4,

que são conhecidos por desempenharem papéis cruciais na migração e invasão do câncer, bem como na redução da formação de fibras de actina nas células, demonstrando que a FUCO suprime a metástase de células B16-F10 de melanoma altamente metastáticas *in vitro* e *in vivo* (CHUNG et al., 2013).

Em um estudo conduzido por Shimoda e colaboradores (2010), a aplicação cutânea da FUCO (1%) inibiu a atividade da tirosinase e da melanogênese em melanoma induzido por radiação UVB, além de suprimir a ciclooxigenase 2 (COX-2) e o receptor de melanocortina 1 (MC1R), que são os estimulantes da melanogênese das células epiteliais. Do mesmo modo, foi demonstrado efeito protetor da FUCO frente à radiação UVB, demonstrando também o efeito antioxidante da FUCO (HEO e JEON, 2009; URIKURA, SUGAWARA e HIRATA, 2011).

Neste contexto, Martin (2015) evidencia a baixa toxicidade da FUCO em células normais e o grande potencial como agente quimiopreventivo e/ou agente quimioterápico no tratamento do câncer. Além disso, Muthuirulappan e Francis (2013) sugerem o desenvolvimento de nanopartículas contendo FUCO, pois há evidências científicas dos efeitos terapêuticos e de sua estabilidade limitada.

3.5 Matérias-primas de origem vegetal da Amazônia

O Brasil está entre os 17 países mega diversos do mundo, com exuberante diversidade biológica tanto em número de espécies quanto na variedade e na complexidade. A floresta Amazônica é o maior reservatório natural de plantas no mundo e os materiais extraídos são uma importante fonte de pesquisa que visam a descoberta de novas substâncias com atividades farmacológicas. A indústria farmacêutica tem usado compostos de origem natural tanto como ativos em si quanto como base para o desenvolvimento de novas moléculas (BUTLER, 2004; OLIVEIRA e do AMARAL, 2004; ALVES et al., 2008; PIMENTEL et al., 2015).

Desta forma, a biodiversidade brasileira pode representar uma nova estratégia para a indústria, como fonte de novos insumos farmacêuticos, associados a métodos modernos de *drug delivery*, como as nanopartículas.

Neste contexto, tem-se o bacuri (*Platonia insignis* Mart., Clusiaceae), que é uma árvore cujos os frutos são usados para a produção da menteiga e do óleo de bacuri. Popularmente, usado para fins fitoterápicos é bem difundido como sendo um remédio contra picadas de aranha e cobra, para problemas de pele e contra o

reumatismo e artrite. A manteiga de bacuri é absorvida alguns minutos depois que é aplicada e a pele torna-se aveludada ao toque, além de remover manchas e reduzir cicatrizes. Estes efeitos são devido ao seu alto nível de tripalmitina (50% a 55%), que penetra na pele rapidamente. Da mesma forma, a elevada quantidade de ácido palmitoleico (5%) confere ao bacuri propriedades emolientes, que também pode ser usado como um agente hidratante (MORAIS e GUTJAHR, 2009; RUFINO et al., 2010; SILVA et al., 2015; UEKANE et al., 2017). Além disso, a família Clusiaceae representa uma rica fonte de xantonas e benzofenonas poli-isopreniladas, responsáveis por várias atividades biológicas, destacando-se os efeitos antioxidantes e cicatrizantes (DIDEROT, SILVERE e ETIENNE 2006; ACUNA, JANCOVSKI e KENNELLY, 2009; RUFINO et al., 2010; KUMAR, SHARMA e CHATTOPADHYAY, 2013; LUSTOSA et al., 2016).

O tucumã (*Astrocaryum vulgare*, Arecaceae) é nativo da região amazônica, possivelmente do estado do Pará, onde tem o seu centro de dispersão, até a Guiana Francesa e Suriname. A fruta possui um caroço que é recoberto externamente de uma polpa alaranjada, de consistência oleosa. Popularmente, o tucumã possui muitas utilidades: o caroço é utilizado no artesanato, as folhas fornecem uma fibra bastante resistente e a polpa do fruto é consumida *in natura* ou em forma de bebida, contendo uma das mais elevadas concentrações de provitamina A, o β -caroteno. O óleo é empregado na cozinha e em massagens e é extraído da polpa que contém 25,6% de ácidos graxos saturados e 74,4% de ácidos graxos insaturados compostos por ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico. Como é rico em ômega 3, 6 e 9, é um bom hidratante e é usado em cosméticos em hidratantes para a pele, loções para o corpo e produtos para cabelos danificados. O óleo é uma excelente fonte de carotenoides, contendo 21 tipos destes, e de vitamina B2 (riboflavina), além de apresentar compostos bioativos, como catequina e quercetina (BORA et al., 2001; DE ROSSO e MERCADANTE, 2007; MORAIS e GUTJAHR, 2009; KODAMA et al., 2010).

4. CAPÍTULO I - Caracterização da fucoxantina e do seu isômero e o desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE

4.1 Introdução

Qualidade, segurança e eficácia são os atributos mais relevantes de um produto farmacêutico. No entanto, considerando que as substâncias ativas compreendem um amplo espectro de compostos, variando de pequenas moléculas naturais ou sintéticas a grandes produtos biológicos, devem ser realizadas abordagens para garantir a qualidade destes (MAGGIO, VIGNADUZZO e KAUFMAN, 2013).

Uma condição essencial para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, tanto do ponto de vista científico quanto regulamentar, é a elucidação e caracterização química da substância ativa (GANDHI et al., 2002). O *International Council for Harmonization (ICH)* (2005) menciona que a pureza da substância ativa utilizada é de extrema importância para o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica.

A escolha de uma metodologia analítica adequada também é de fundamental importância para o procedimento de controle de qualidade. Os métodos analíticos utilizados devem ser devidamente validados, desde a matéria-prima até o produto acabado, incluindo todas as fases do desenvolvimento do fármaco, desde a pesquisa até o controle de qualidade (BOUABIDI et al., 2010; GIL, 2010). O desenvolvimento de um indicativo de estabilidade é um processo que pode ser separado em três estágios. Primeiramente, requer-se a obtenção da substância ativa adequada, em seguida a seleção da técnica e da detecção correta, que compreende também o desenvolvimento e otimização do método e, finalmente, a validação do método (MAGGIO, VIGNADUZZO e KAUFMAN, 2013).

Deste modo, no Capítulo I está descrito o desenvolvimento de um método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Inicialmente, foi adquirido o padrão da FUCO e a matéria-prima em duas apresentações, incorporada em um óleo e na forma de pó. Portanto, foi realizada a caracterização das duas matérias-primas pelas técnicas de espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e RMN bidimensional (COSY). Por cromatografia gasosa (CG), objetivou-se caracterizar o óleo ao qual a FUCO foi incorporada. Estas caracterizações foram realizadas visando o uso da FUCO em estudos futuros, pois sabe-se que variações na

isomeria da molécula podem diferir consideravelmente na sua eficácia biológica (CRUPI et al., 2013). Por fim, houve a validação do método analítico indicativo de estabilidade por CLAE para detecção e quantificação da FUCO, seguindo os parâmetros oficiais (BRASIL, 2003, ICH, 2005; USP, 2017). O trabalho está disposto na forma de artigo científico, de acordo com as normas da revista na qual foi publicado.

4.2 Artigo científico

Characterization and analysis of fucoxanthin and its isomers

Publicado no periódico *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research*, v.5, n. 7, p. 322-334, 2017.

Characterization and analysis of fucoxanthin and its isomers

Leticia Malgarim Cordenonsi*^a, Andressa Santer^a, Rafaela Martins Sponchiado^a,
Martin Steppe^a, Renata Platcheck Raffin^b, Elfrides Eva Scherman Schapoval^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre - RS, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano,
97010-032 Santa Maria – RS, Brasil.

*Corresponding author: Leticia Malgarim Cordenonsi,
Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy /
Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS),
Av. Ipiranga 2752, sala 402 Porto Alegre-RS, Brazil, CEP 90610-000
Phone: +55 51 33085214
Email: leticiacordenonsi@hotmail.com

Abstract

Fucoxanthin (FUCO) is extremely instable and occur in nature as different isomers which may differ considerably in their biological effectiveness. Therefore, the aim of this work was to identify the FUCO isomers in oil and powder samples by LC-MS and NMR analyses and then to develop a precise, reliable, and rapid HPLC-DAD method for quantifying them; moreover, the effect of heating, basic and acid medium and light on their stability was measured. FUCO and isomers were identified as all-*trans* and 9'-*cis* fucoxanthin with MS and NMR spectra. Different chromatographic parameters were carefully optimized and the method was specific, linear (1-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $r>0.99$), precise (standard deviation values $<0.7\%$), accurate (mean recovery = 103.25%), low limit of quantification (0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Moreover, the robustness was investigated using the Box–Behnken experimental design and factors studied simultaneously were: pH of mobile phase, wavelength and column temperature, each at three levels, producing results within the acceptable range. This proposed method was successfully applied the analysis of FUCO, emphasizing thus the advantages of the method: high efficiency, reliable and rapid analysis. Our results suggested that method can be used for the quality control of FUCO and its isomers.

Keywords: Marine carotenoids, fucoxanthin, isomers, study stability, validation, HPLC.

1. Introduction

Carotenoids are isoprenoid molecules, which are some of the first naturally occurring pigments and are responsible for the bright color of various fruits, vegetables, insects, and marine animals [1-3]. They are supposedly potential agents for the treatment of cancer, diabetes, and cardiovascular diseases [4-7].

Fucoxanthin (FUCO) (3'-acetoxy-5,6-epoxy-3,5'-dihydroxy-6',7'-didehydro-5,6,7,8,5',6'-hexahydro- β,β -caroten-8-one) is a marine carotenoid present in the chloroplasts of numerous classes of microalgae and brown macroalgae, such as wakame (*Undaria pinnatifida*), kombu (*Laminaria japonica*), hijiki (*Hijikia fusiformis*), arame (*Eisena bicyclis*), and *Sargassum fulvellum*. It is the most abundant of all carotenoids, accounting for more than 10% of the estimated total natural production [8-10]. Currently there is great interest in isolating novel bioactive compounds from the marine environment, which contains rich natural resources, such as algae [1].

The complete structure of FUCO including chirality was determined by Englert and co-workers [11]. This carotenoid has a distinctive structure with an uncommon allenic bond and 5,6-monoepoxide in its molecule and further includes oxygenic functional groups, such as hydroxyl, epoxy, carbonyl, and carboxyl groups in addition to its polyene chain (Figure 1) [12-13].

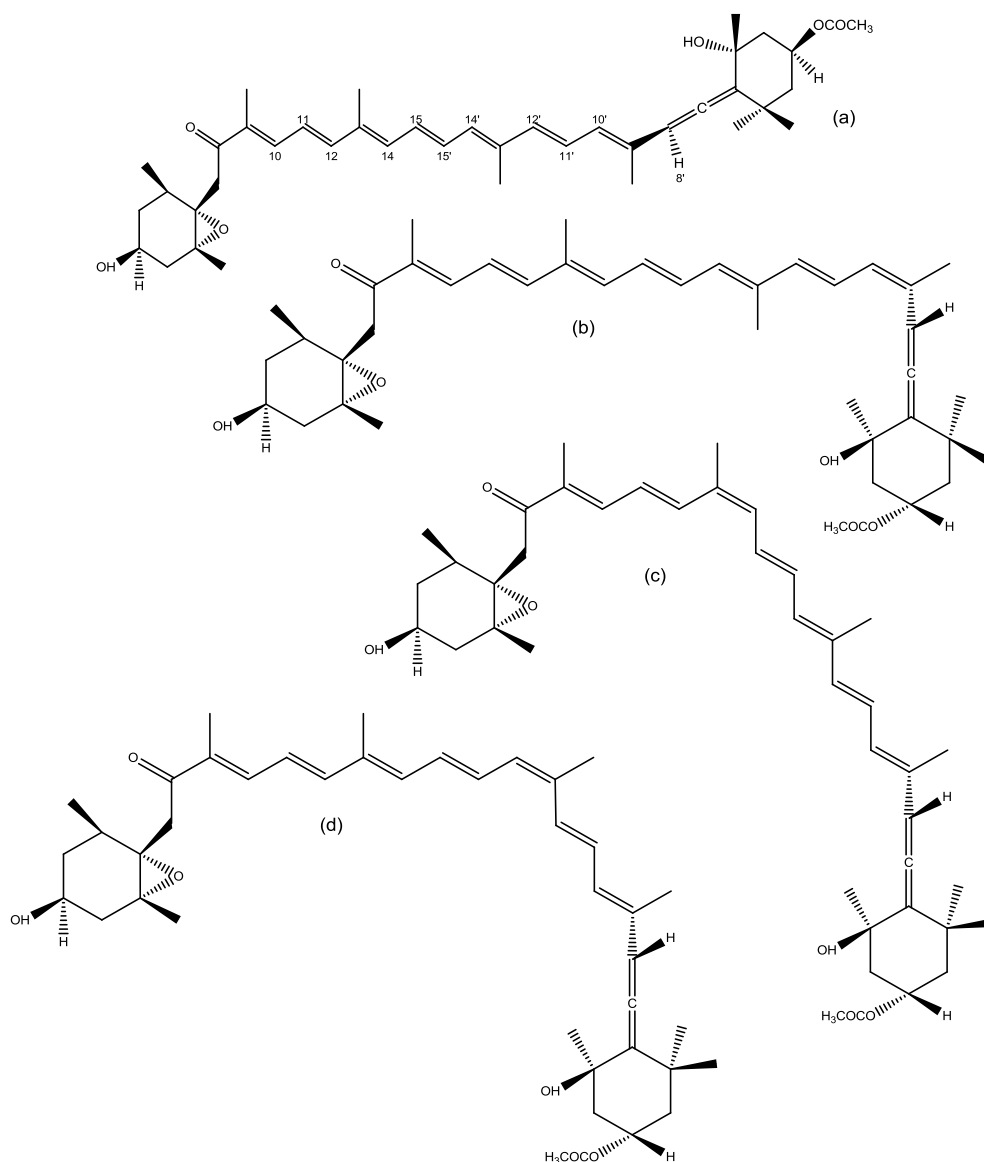


Figure 1. Structure of (a) all-*trans* fucoxanthin, (b) 9'-*cis* fucoxanthin (c) 13-*cis* fucoxanthin, and (d) 13'-*cis* fucoxanthin (C₄₂H₅₈O₆).

FUCO rich brown seaweeds have traditionally been used in the Southeast and is a promising option for the prevention and treatment of cancer and a wide variety of related pathologies, including obesity and diabetes [14-17]. Cancer preventing influences of FUCO are mediated through different signaling pathways, as the caspases, different proteins and enzymes. Furthermore, other molecules are involved in cell cycle arrest, apoptosis and anti-angiogenesis or inhibition of metastasis [18-21].

This carotenoid is extremely instable and occur in nature as different isomers which may differ considerably in their biological effectiveness [2]. Therefore, the aim of this work was to identify the FUCO isomers in oil and powder samples by LC-MS and NMR analyses and then to develop a precise, reliable, and rapid HPLC-DAD method for quantifying them; moreover, the effect of heating, basic and acid medium and light on their stability was measured.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

A reference standard of FUCO ($C_{42}H_{58}O_6$) with purity of >95%, was supplied by Cayman Chemical Company® (Ann Arbor, MI, USA). Samples of FUCO in powder and oil were assigned a content of 30% and 2%, respectively, were kindly donated by Shaanxi Jiahe Phytochem Co., Ltd. (Xian, China). All chemicals used were of pharmaceutical or analytical grade. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q apparatus (Millipore®, USA).

2.2 Identification of fucoxanthin in oil and powder

2.2.1 Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS)

LC-MS/MS measurements were carried out using an Agilent 1100 Series chromatographic system coupled to an AB Sciex API 5000 triple quadrupole mass spectrometer with an electrospray source in positive ionization mode (ESI+). The conditions used were collision energy 10 eV, declustering potential 100 eV and source temperature 300 °C. Instrument control and data processing were carried out by means of Analyst 1.6.1 software. Separation was achieved in a Symmetry C18 LC column (75 x 4.6 mm; 3.5 mm particle diameter) from Waters. The injection volume was 6 μ L, with flow rate adopted was 0.4 μ L min^{-1} and mobile phase is composed by acetonitrile and water (9.5:0.5 v/v). Separately, FUCO in oil and powder were prepared in acetonitrile at 5.0 μ g mL^{-1} .

2.2.2 Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis

Previously, several solvents (methanol, ethanol, acetone, and n-hexane), solvent volume and extraction temperature were tested to determine the optimal conditions for FUCO extraction. Every procedure was performed under dark

conditions to prevent pigment degradation. Separately, approximately 10 mg of FUCO in oil and powder were spiked with 2 mL of n-hexane. The mixtures were centrifuged at 3,000 rpm for 5 min (Centrifuge Excelsa®). Supernatants were separated and the extraction procedure was repeated twice using 1 mL of n-hexane. The n-hexane was evaporated to dryness at room temperature. The residue of FUCO was dissolved in 1 mL deuterated methanol (CD₃OD) and used for NMR spectroscopy. The proton NMR (¹H NMR) and two-dimensional COSY spectra of FUCO in oil and powder were recorded on a Bruker® AVANCE600 (Rheinstetten, Germany). Chemical shifts were adjusted with δ (ppm) referring to the solvent peak δ H 3.31 for CD₃OD. Data were processed with the MestRe Nova program, interpreted and compared with data in the literature.

2.2.3 Gas Chromatography

For preparation of FUCO, into 0.5 g oil containing FUCO were added and then shaken 5.0 mL methanol and 0.1 mL methanolic potassium hydroxide. The mixture was heated at 100 °C for 15 min in a water bath. After cooling, 2.5 mL hexane were added and occasionally shaken; 5.0 mL saturated sodium chloride solution were added and shaken vigorously. The organic layer was separated and analyzed. The chemical composition was analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) (Shimadzu®, quadrupole MS system QP5000, at 70 eV). A silica capillary column of VF-23 Varian® (30 m x 0.25mm x 0.25 m, coated with DB-5) was used to separate constituents. Injector and detector temperature were set at 220 °C and 250 °C, respectively; the oven temperature was programmed as 50-260 °C at 3 °C min⁻¹, using helium as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL⁻¹. The injection volume was 1.0 μ l (splitless mode). The identification of compounds was based on the comparison of retention indices and their mass spectra, with authentic standards and with data taken from the literature [22] or by comparison with mass spectra recorded in the database. Relative amounts of the components were calculated based on GC peak areas.

2.3 HPLC-DAD system

An HPLC Agilent® model 1200 UV/LC system (Santa Clara, USA), consisting of a quaternary pump, a degasser, a column thermostat, a diode array detector

(DAD) and a thermostated auto sampler was used. System control and data analysis were performed using ChemStation software. Chromatographic identification and quantification of FUCO was achieved on an Agilent® Eclipse Plus C18 analytical column (4.6 mm x 150 mm, 5.0 µm). All separations were obtained in isocratic mode using acetonitrile and water, pH adjusted to 7.0 with sodium hydroxide 0.1 M (NaOH) (9.5:0.5 v/v). The system was programmed at 40 °C for the column oven, 450 nm for the detection wavelength, flow rate was 1.0 mL min⁻¹ and 50 µL for the injection volume.

The stock solutions of reference standard and sample solutions of FUCO in oil were prepared in order to optimize the experimental procedure and decrease the chance of analytical errors. The solutions were prepared with acetonitrile and the dilutions were done with acetonitrile and water, pH adjusted to 7.0 with NaOH 0.1 M (9:1 v/v). All analyses were performed under dark conditions.

2.4 Validation of HPLC-DAD method for fucoxanthin in oil

The method was validated based on the International Council on Harmonization (ICH) guidelines [23-24] and United States Pharmacopeia (USP) requirements [25], following the validation parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification, and robustness. A Box-Behnken design with three factors was planned for robustness evaluation.

Specificity. Forced degradation studies were performed in order to provide an indication of stability. FUCO in acetonitrile, at 30.0 µg mL⁻¹, was subjected to degradation under acidic (hydrochloric acid - HCl 0.01 M), basic (NaOH 0.01 M), photolytic (UV-A radiation - 352 nm and UV-C radiation - 254 nm), oxidative (hydrogen peroxide - H₂O₂ 0.3%), and thermal (65 °C) stress conditions. The acidic and basic conditions were carried out at room temperature for 4 h and the solutions were neutralized with base or acid before injection. The oxidation reaction with H₂O₂ 0.3% was performed out at room temperature for 3 h before injection. For the photolytic degradation study, aliquots of FUCO were transferred to a 1 cm quartz cell, for 4 h. The cells were exposed, positioning them horizontally to have the maximum exposure area, under the direct incidence of UV-A radiation (Blacklight blue lamp – Orion, 352 nm/ 30 W) and UV-C radiation (Light Express lamp LE UV, 254 nm/30 W), in a glass chamber that is mirrored internally (100 × 16 × 16 cm). For the thermal

degradation study, FUCO was placed at a constant temperature of 65 °C for 1 h. All samples were analyzed by HPLC-DAD to ensure the purity of the FUCO peak in all the stressed sample solutions.

Linearity. Linearity was determined by three analytical curves (peak area versus concentration), each one with nine concentrations for reference standard of FUCO, in the range of 1.0-40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1.0; 3.0; 5.0; 10.0; 15.0; 20.0; 25.0; 30.0 and 40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Precision. The precision of the method was evaluated by injection of six preparations of FUCO at a concentration of 30.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quantified against a reference standard. The results were expressed by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) and the relative standard deviation (RSD, %) was calculated.

Accuracy. The accuracy of the method was evaluated in triplicate by adding standard solution at three concentration levels, low, medium, and high (5.0, 20.0, and 40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively) by the standard addition technique. The percentage of recovery was calculated at each level.

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). The limits were obtained based on the signal-to-noise by the ChemStation software. The LOD and LOQ for each sample were estimated at a concentration level in which the signal-to-noise ratio reached 3:1 and 10:1, respectively. The precision of LOQ was evaluated and the RSD were calculated.

Robustness. The robustness was investigated using the Box–Behnken experimental design. Three experimental parameters range in three levels were tested, pH range +/- 0.2 pH unit; temperature column +/- 2 °C, and wavelength +/- 2 nm. Three replicates were used in the experiment and Minitab® software was used for modeling.

2.5 Kinetic degradation of fucoxanthin in oil

Degradation kinetics study was carried out under oxidative (H_2O_2 0.3%), stress conditions at room temperature, at pre-established times (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 and 180 min). In this study, kinetic rate of FUCO degradation in oil was determined by plotting the drug concentration (zero order process), the log (first-order process), and the reciprocal (second-order process) of concentration versus

time. The determination coefficients (R^2) were obtained and the best observed fit indicated the reaction order. The kinetic parameters, such as the apparent order degradation rate constant (k), half-life time ($t_{1/2}$), and $t_{90\%}$ (time where 90% of original concentration of the drug is left), were obtained.

2.6 Analysis using HPLC-DAD method of fucoxanthin in powder

After identifying FUCO in powder, the sample was analyzed by HPLC-DAD using the method previously described in item 2.3. Stability studies were performed according to described forced degradation studies for FUCO in oil.

2.7 Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA, a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. The experimental designs was performed by the Minitab 14 (Minitab Inc, State College, PA, USA) data analysis software system.

3. Results and discussion

3.1 Identification of fucoxanthin in oil and powder

Several studies were conducted for the extraction and purification for FUCO from algae employing the use of different methods, modifying the solvent type, extraction time, temperature and extraction technology (maceration, ultrasound-assisted extraction, Soxhlet extraction, and pressurized liquid extraction). These methods, however, can induce oxidation, producing degradation products and isomers [26-28]. The correct identification of isomers is a fundamental point for the development of a stability indicating HPLC-DAD method, because accurate analysis is a prerequisite, since isomers differ substantially in their biochemical activity [29-30].

In the present study, FUCO isomers were identified by LC-MS/MS. Daughter ions obtained from protonated molecular ions of FUCO in oil ($[M + H]$ 659.2 m/z) included main ions from each compound at m/z 641.6, 581.4, 429.4, 411.5 and 213.3. In powder, daughter ions obtained from protonated molecular ions ($[M + H]$ 659.3 m/z) included main ions from each compound at m/z 641.3, 581.4, 497.7, 297.4 and 213.3. The mode scanning at m/z 641, 659, and 581 corresponding to $[M + H - nH_2O]^+$, $[M + H]^+$ and $[M + H - H_2O - AcOH]^+$, respectively. These three

fragments ions and dehydrated product ions from protonated molecules $[M + H - nH_2O]^+$ are observed for all hydroxylated carotenoids, such FUCO. Moreover, intensities of the dehydrated product ions may vary and reveal the structural characteristics of the hydroxylated end groups of isomeric carotenoids, allowing the distinction between structural isomers. FUCO and its isomers possess the same molecular formula, $C_{42}H_{58}O_6$, but the results showed differences in the fragments ions in LC-MS spectra [9-31].

The pure compounds from the extractions were subjected to 1H NMR and two-dimensional COSY analysis. Chemical shift values for each FUCO isomer corroborated with previously reported values (Table 1). Furthermore, a detailed comparison of these data, particularly focusing on the olefinic protons in the COSY spectra (Figure 2), revealed that strong cross peaks between H8' and H11' and between H19' and H10', proved the 9'-*cis* isomer. The purified FUCO in oil was identified as all-*trans* fucoxanthin and FUCO in powder was identified 9'-*cis* fucoxanthin [11-32,33].

Table 1. 1H NMR chemical shifts of the olefinic protons (in ppm, CD₃OD) of fucoxanthin.

	H10	H11	H12	H14	H15	H15'	H14'	H12'	H11'	H10'	H8'	H19'
Oil	7.50	6.70	6.98	6.63	6.80	7.38	6.41	6.50	6.74	6.19	6.10	1.87
Powder	7.49	6.68	6.98	6.63	6.82	7.34	6.40	6.43	7.03	6.15	7.00	4.75

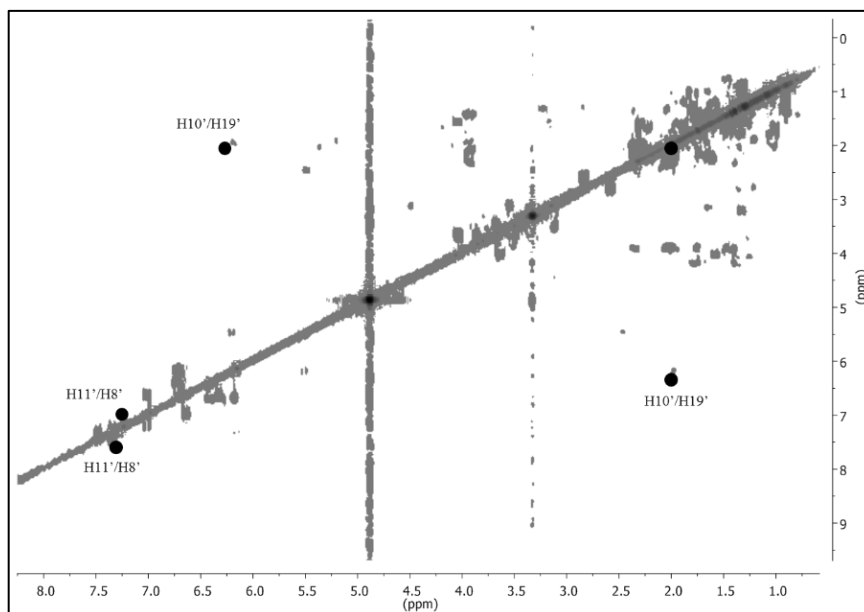


Figure 2. COSY spectrum of fucoxanthin in powder. Only relevant cross-peaks were assigned, between H8'/H11' and H19'/H10'.

In order to identify the components of oil by GC–MS, a representative chromatogram of FUCO in oil is provided in Figure 3. Seven integratable peaks were observed, four compounds were identified like as fatty acid, caprilic acid (49.4% in 13.1 min) and capric acid (36.1% in 20.5 min) were largest components. Although present in relatively small amounts are palmitic (37.6 min) and γ -linolenic acid (46.8 min). Three peaks were observed as fragments of FUCO, 13.4% of total peak area in 51.4, 57.4, and 60.2 min. Identification of fragments were made by comparison with mass spectrum with data taken from the literature.

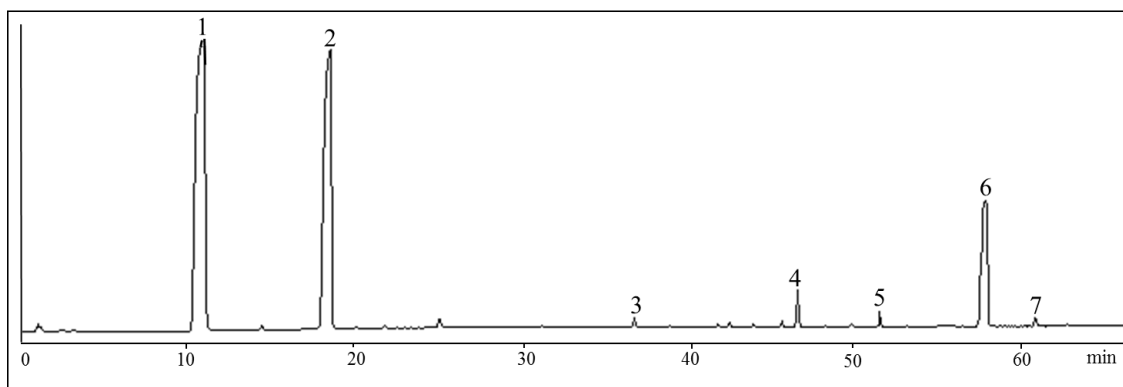


Figure 3. GC chromatogram of the FUCO in oil: (1) caprilic acid, (2) capric acid, (3) palmitic acid, (4) γ -linolenic acid and (5-7) fragments of FUCO.

The information provided by MS is of great help since it allows differentiation of carotenoids, because give rise to molecular weight and characteristic fragmentation patterns. On the other hand, carotenoids and its isomers are very similar in their chemical composition, having the same molecular weight and differences in the fragments ions [34]. In these cases, the information provided by and NMR and HPLC-DAD analyses contributes to unequivocal identification. In conclusion, FUCO in oil was identified as all-*trans* fucoxanthin and FUCO in powder was identified 9'-*cis* fucoxanthin. In addition, the oil has been identified like as fatty acid.

3.3 Optimization of chromatographic conditions

The main problem in carotenoid analysis arises from their instability. This means precautionary to avoid quantitative losses, such as completion of the analysis within the shortest possible time, protection from light, avoiding high temperature and contact with acid [3].

The physical and chemical properties of FUCO, such as polarity and solubility will be considered for determination by HPLC. Likewise, various experimental conditions were tested and optimized by using different column temperature, flow rate, ratios of acetonitrile/water, and pH values.

Acetonitrile was selected because FUCO is insoluble in water and soluble in organic solvents and DMSO. The flow rate was altered between 0.9, 1.0, and 1.2 mL min⁻¹ to shorten the time of analysis, but it was observed that the resolution was not drastically affected by increasing the flow rate. The column was heated to temperatures of 40 °C, thus reducing the pressure, because the viscosity of the mobile phase strongly depends on the temperature. It was reported that FUCO has good thermostability, between 80 – 100 °C, for 1 h [3,35].

After selection of column temperature, flow rate and ratio of acetonitrile/water, the next step is to optimize pH in the mobile phase. According to the USP requirements, system suitability tests are an integral part of methods. These tests are used to verify that the chromatographic system is adequate for the intended analysis. Parameters affecting the chromatographic response were studied, such as number of plates (column efficiency), retention time, tailing factor, retention factor, and

resolution compared with different pH values, 3.0, 5.0, 7.0, and 9.0 (Figure 4). At higher pH values, separation occurred with decreased retention times, but pH 7.0 is more efficient with a high number of plates. Resolution and tailing factor do not change at different pHs.

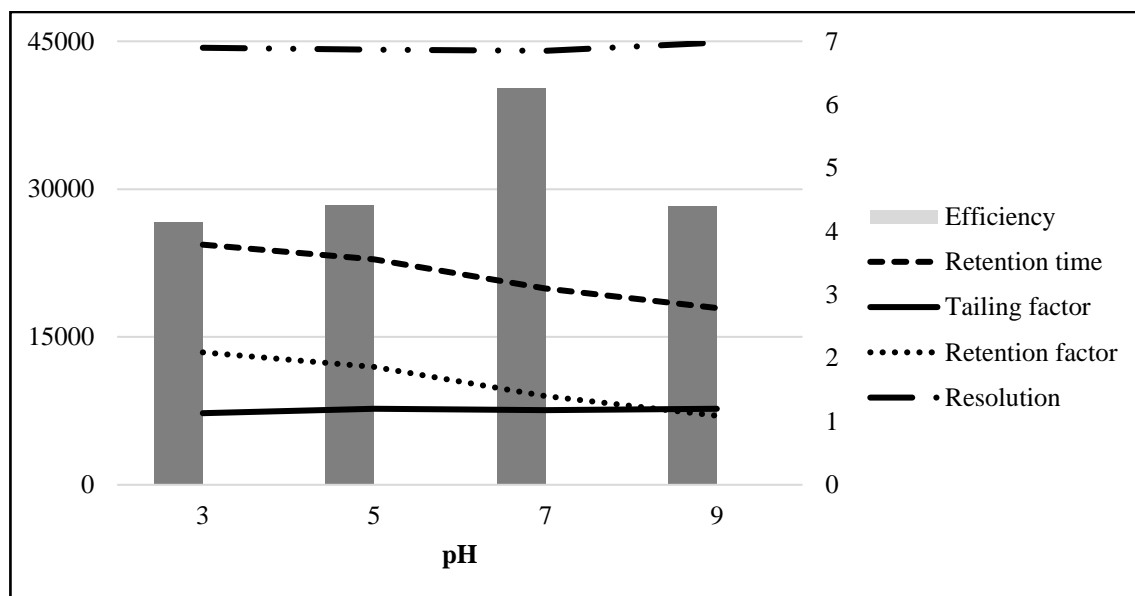


Figure 4. The effect of pH 3.0, 5.0, 7.0 and 9.0 on plates (column efficiency), retention time, tailing factor, retention factor and resolution of FUCO.

Based on the previous studies by Muthuirulappan and Francis [36] and Yip and co-workers [37], when FUCO was extracted from Malaysian brown seaweed, the stability tests showed that is most stable in pH 5.0-7.0, stored in conditions of darkness. In addition, according to Hii [38], FUCO is less stable in an acidic pH condition.

In Figure 5a shows the chromatograms obtained by HPLC-DAD and UV absorption spectra of reference standard and FUCO; FUCO eluted after 3 min, with a retention time identical to the standard reference and the purities of all the peaks were greater than 99.9%, indicating homogenous peaks. FUCO and reference standard showed an absorption spectrum with maximum at 332, 447 and 468 nm. Most carotenoids absorb maximally at three wavelengths, resulting in three peaks and the greater the number of conjugated double bonds, the higher the wavelength maximum values [3]. Other minor peak appears (retention time of 4.4 min) around the

FUCO peak and the UV-VIS spectrum of this peak showed a hypochromic shift (Figure 5b).

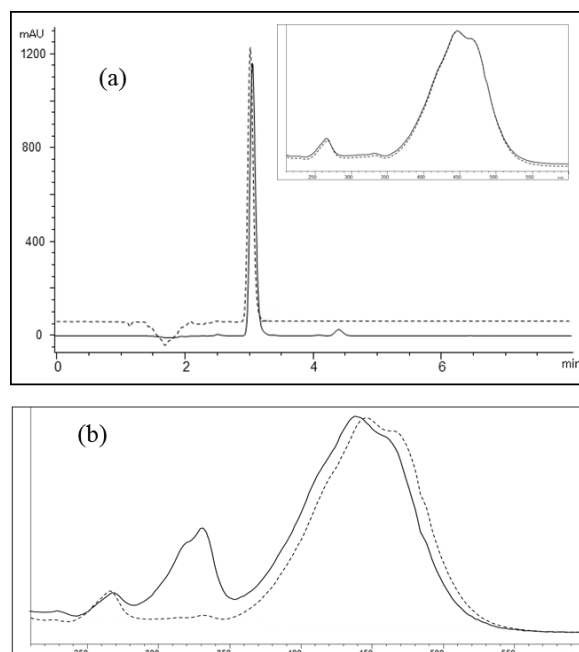


Figure 5. (a) HPLC-DAD chromatogram and UV absorption spectra ($30.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) of reference standard (trace) and FUCO (line); **(b)** HPLC-DAD chromatogram and UV absorption spectra of FUCO (trace) and minor peaks (line).

3.3 Method validation for fucoxanthin in oil

The purpose of developing an analytical method is to provide a qualitative and quantitative result with an acceptable uncertainty level. In addition, the validation is needed to assure high quality, so that the products will be accepted by the regulatory agencies and obey the mandatory requirements for the registration of any pharmaceutical product [39,40]. The method validation parameters have been defined in different national and international committees. However, some of the definitions vary between the different organizations and an attempt was made to harmonize them for pharmaceutical applications [24].

Forced degradation studies

Forced degradation studies can help to identify the likely degradation products, which can in turn help establish the degradation pathways, intrinsic stability of the molecule, and presence of its potential impurities [41]. The specificity of the

developed method was determined by injecting sample solutions, $30.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, which was prepared under stress conditions. Table 2 summarizes the forced degradation results and chromatograms of the stress tests are shown in Figure 6.

After exposure to acid and alkaline conditions, approximately 48% and 65% of FUCO were degraded, respectively. The FUCO peak was recorded at 3.2 min, under the same condition and additional peaks were seen in the chromatogram. FUCO was found to be highly labile to oxidative degradation, after 3 h, approximately 60% drug degradation was observed. Under photolytic conditions, decreases in FUCO concentration from acetonitrile solution were observed. After 4 h of exposition to UV-A irradiation approximately 26% of FUCO degradation was detected and after only 45 min of UV-C, 72% of FUCO was degraded. FUCO was found to be stable at 65°C , indeed after 1 h, only 1.6% degraded. The minor peak (retention time of 4.4 min) maintained its area. In addition, the resolution of peaks was calculated. This value of 2.0 or greater between two peaks will ensure that the sample may be accurately measured. Analyzing the chromatograms and values expressed in the table, all peaks were separated by this method with satisfactory resolution.

Alkaline condition and light irradiation (UV-C) were the main accelerators for the degradation of FUCO and other peaks appear in the chromatograms of the forced degradation study, demonstrating that the degradation products were detected using the optimized chromatographic conditions. During the analysis, bleaching solution of FUCO was observed under all stress conditions. Loss or change of color at any time during the analysis provides an immediate indication of degradation or structural modification [3].

Table 2. Summary of forced degradation results of FUCO in oil subjected to degradation under acidic (HCl 0.01 M), basic (NaOH 0.01 M), photolytic (UV-A and UV-C radiation), oxidative (H₂O₂ 0.3%), and thermal (65 °C) conditions.

Stress Condition	Time	Degradation	Resolution	Remarks
Reference standard	-	-	-	-
FUCO	0	-	-	-
Acidic	4 h	48.2%	6.28*	Increase area of minor peaks
Alkaline	4 h	65.2%	2.7/5.71**	Increase area of minor peaks and degradation products formed
Oxidative	3 h	59.8%	5.38*	Increase area of minor peaks
UV-A radiation	4 h	26.6%	5.52*	Increase area of minor peaks and degradation products formed
UV-C radiation	45 min	71.9%	6.03*	Significant degradation observed, increase area of minor peaks and degradation products formed
Temperature	1 h	1.6%	5.83*	-

* Resolution from the FUCO peak (3.2 min) and peak about 4.4 min

** Resolution from the FUCO peak (3.2 min) and peaks about 2.2 and 4.4 min

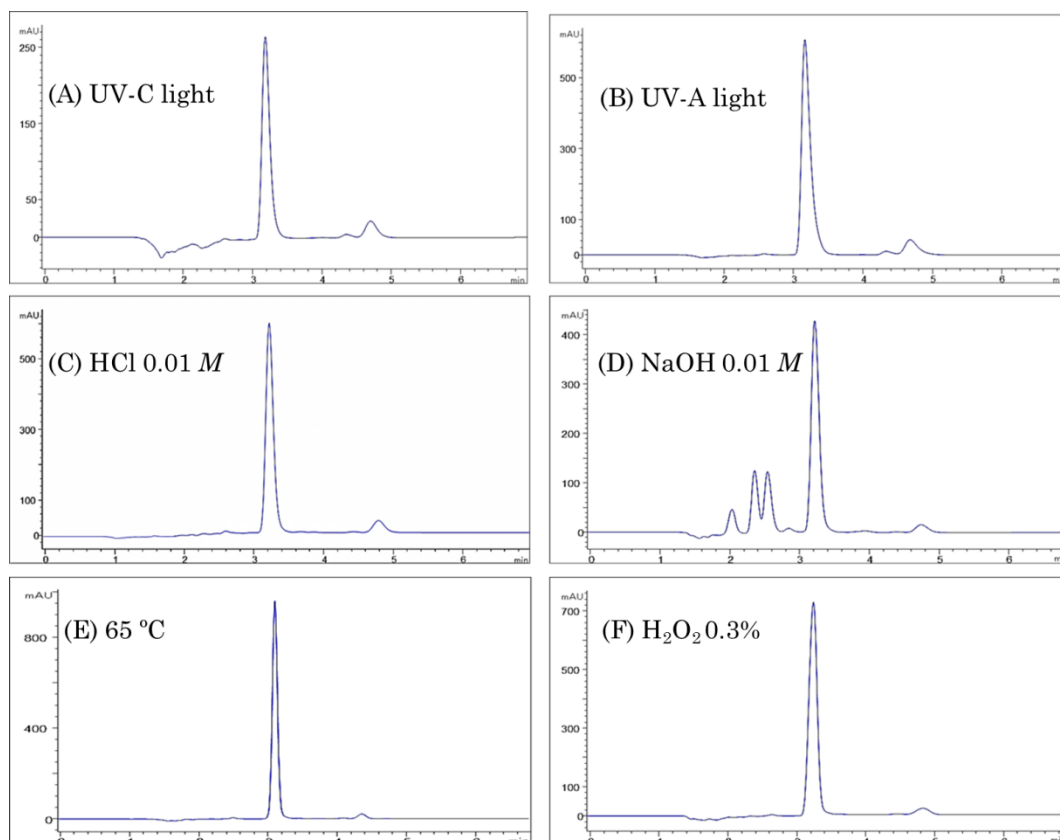


Figure 6. HPLC chromatograms obtained after forced degradation: (A) UV-C light for 45 min; (B) UV-A light for 4 h; (C) HCl 0.01 M for 4 h; (D) NaOH 0.01 M for 4 h; (E) 65 °C during 1 hour; (F) H₂O₂ 0.3% for 3 h.

Like other carotenoids, FUCO can be degraded when exposed to heat, light, oxygen and other pro-oxidant molecules, due to an extensive system of conjugated double bonds (polyene chain) [42]. The formation of some *cis* isomers by isomerization would happen which was related to treatment conditions. FUCO usually resulted in one main peak consisting of the *trans* form along with its isomers [13] and small fragments are also generated through breakdown at various carbon-carbon double bonds in the polyene chain, such as apocarotenoids (carotenoids with a shortened carbon skeleton) [43] (Figure 7).

The presence of a *cis* double bond carotenoid molecule creates greater steric hindrance between nearby hydrogen atoms and/or methyl groups, so that *cis* isomers are generally less stable thermodynamically than the *trans* form. With some double bonds, steric hindrance is relatively small so that isomers with *cis* double bonds in these positions are relatively easily formed and relatively stable. Therefore, 9'-*cis*, 13-

cis, and 13'-*cis* isomers were formed as main isomers during the incubation of all *trans* FUCO [30,44]. In this respect, isomerism has an effect on the absorption spectrum, with a new maximum appearing in the UV spectra (around 320–340 nm), retention time in chromatograph, melting points, solubility and molecule stability [45].

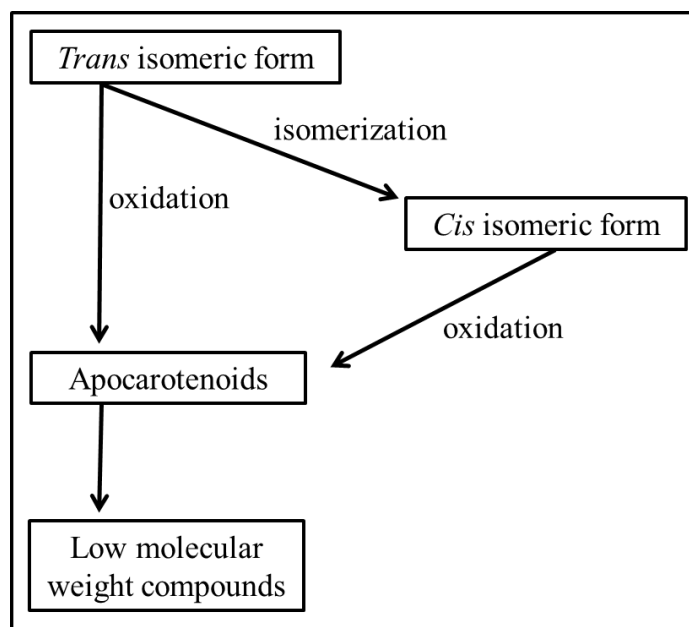


Figure 7. Possible scheme for the carotenoid degradation (Adapted from Yahia and Ornelas, [46]).

A spectrophotometric analysis of FUCO in canola oil was performed and results showed that heating caused the degradation of all-*trans* when exposed to a temperature of 25-100 °C. By increasing the temperature, the formation of 13-*cis* and 13'-*cis* and the degradation of 9'-*cis* would also be promoted. The degradation of all-*trans* and 13-*cis* and 13'-*cis* FUCO was synergistically promoted when exposed to both air and light [47].

Linearity. Method linearity was observed over the concentrations range of 1.0 to 40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ at 450 nm, with significantly high coefficient correlation values ($r=0.9994$) for FUCO. The validity of the assay was verified by means of ANOVA, which demonstrated significant linear regression ($F_{\text{calculated}} < F_{\text{critical}} = 4.23$; $p < 0.05$) and non-significant linearity deviation ($p > 0.05$), shown in Table 3.

LOD and LOQ. LOD with a signal-to-noise ratio of 3:1 was found to be 0.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and LOQ with a signal-to-noise ratio of 10:1 was found to be 0.10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. These results indicate the adequate sensitivity of the method.

Precision. Precision evaluated as the repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) of the method was determined by calculating the RSD for six determinations at a concentration of 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The experimental values obtained are presented in Table 3. The results indicate low RSD obtained for the repeatability and intermediate precision and showed the good precision of the method in both samples.

Accuracy. Determination of accuracy allows estimating the extent to which systematic errors affect the analytical method [40]. The accuracy of the method to quantify FUCO was calculated by percentage of recovery. The mean values were found to be 103.25% (RSD= 0.92%). These results showing satisfactory accuracy of the proposed method.

Table 3. Validation parameters of the stability-indicating HPLC-DAD method.

Parameters	Fucoxanthin
Retention time of standard (min)	3.01
Retention time of fucoxanthin (min)	3.14
Linearity	
Working range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.0 – 40.0
Equation	$y = 66,503x + 16,853$
Coefficient correlation	0.9994
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.03
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.10
Repeatability (RSD, %)	0.46
Accuracy (%)	103.25
Intermediate precision (RSD, %)	0.69

Robustness. The robustness refers to the signal drug's ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters. In order to evaluate the simultaneous variations of the factors in the responses considered, a multivariate approach using experimental design is recommended [40]. A response surface Box-

Behnken design was applied with focus on the pH of the mobile phase, wavelength, and column temperature. According to the ANOVA of the regression model, both linear and quadratic terms were significant, with $p < 0.05$ and showed a good correlation ($r > 0.96$). There were no significant interaction effects and no evidence of inadequacy was detected by the lack-of-fit test ($p > 0.05$). These results indicated that the stability indicating the HPLC-DAD method was robust since the variations applied to the experimental parameters did not produce any statistically significant effects.

3.4 Kinetic degradation

Considering preliminary stability tests, the degradation kinetics of FUCO was performed under basic conditions. FUCO degradation shows a first-order kinetics ($r = 0.9918$) under the experimental conditions applied. This reaction consider that the reaction velocity is directly proportional to the drug concentration. With this information, through mathematical calculations, a constant value of the decomposition of FUCO was $k = 0.0363 \text{ min}^{-1}$, the $t_{1/2}$ and $t_{90\%}$ were 19.08 and 2.92 min, respectively. The kinetics reactions were useful to determine the concentration changes as a function of time and the kinetics run parameters. These data, applied to decomposition speed and probable reaction mechanisms involved, allow discussing the parameters related to formulation, stabilization, and administration of drugs [48].

3.5 Analysis using HPLC-DAD method of *fucoxanthin* in powder

For the HPLC-DAD analysis, the same chromatographic conditions were used, as described in item 2.3. In Figure 8 is showed the HPLC-DAD chromatogram and UV absorption spectra of reference standard and FUCO in powder (line).

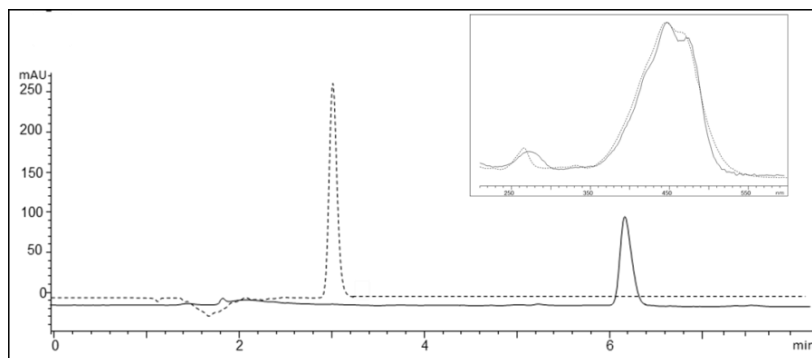


Figure 8. HPLC-DAD chromatogram and UV absorption spectra ($30.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) of reference standard (trace) and FUCO in powder (line).

Figure 8 shows that the retention time for reference standard was 3.0 min and the retention time of FUCO in powder was 6.1 min. The maximum absorption wavelengths of both standard and FUCO in powder were similar. This peak, with retention time of 6.1 min, is believed to be *cis* isomer of FUCO, as suggested by previous studies [2,32]. Different retention times between reference standard and FUCO in powder may be due to the polarity. As reversed phase HPLC system was used, the more polar, reference standard, elute before the 9'-*cis* fucoxanthin.

It was also observed, during the analyses that the color of FUCO in powder was less intense. *Cis* isomerization of double bond causes a slight loss in color, small hypsochromic shift and hypochromic effect, accompanied by the appearance of a *cis* peak in or near the ultraviolet region. Moreover, the intensity of the *cis* band is greater as the *cis* double bond is nearer the center of the molecule [3].

Table 4 summarizes six degradations of FUCO in powder analyzed by HPLC-DAD. In the chromatograms, no additional peak was detected during the analyses. FUCO in oil, when compared with FUCO in powder, showed greater stability. Usually, *cis* isomers are thermodynamically less stable.

Table 4. Summary of forced degradation results of FUCO in powder subjected to degradation under acidic (HCl 0.01 M), basic (NaOH 0.01 M), photolytic (UV-A and UV-C radiation), oxidative (H₂O₂ 0.3%), and thermal (65 °C) conditions.

Stress Condition	Time (min)	Degradation	Purity factor
FUCO in powder	-	-	99.9%
Acidic	60	85.7%	89.0%
Alkaline	60	84.5%	73.7%
Oxidation	60	75.5%	83.4%
UV-A radiation	60	43.5%	80.6%
UV-C radiation	30	90.9%	81.4%
Temperature	90	35.6%	99.8%

Conclusion

The purified FUCO in oil was identified as *all-trans* fucoxanthin and FUCO in powder was identified as 9'-*cis* fucoxanthin. An HPLC-DAD method has been developed for detection and quantification of FUCO. The method was validated according to current ICH guidelines and demonstrated specificity, linearity precision, accuracy, and robustness within the validated range. Furthermore, response surface and factorial designs was successfully used to test the robustness of the HPLC procedures. In forced degradation studies, *all-trans* and 9'-*cis* fucoxanthin differ substantially in their stability. The degradation kinetics of FUCO was determined, allowing kinetic parameters of basic degradation, such as rate constants (k) $t_{1/2}$ and $t_{90\%}$ to be calculated. The method is advantageous, because, besides being fast, good resolution, efficient it can be used for quantification of FUCO and its isomers. These results suggested that method can be used for the quality control of FUCO and the results will be employed of future studies in our research group for the development of nanoparticles.

References

- (1) Christaki E, Bonos E, Giannenas I and Florou- Paneri P. Functional properties of carotenoids originating from algae. J. Sci. Food. Agric, 2013; 93:5-11.

- (2) Crupi P, Toci AT, Mangini S, Wrubl F, Rodolfi L, Tredici MR and Antonacci D. Determination of fucoxanthin isomers in microalgae (*Isochrysis* sp.) by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector multistage mass spectrometry coupled with positive electrospray ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 2013; 27:1027-1035.
- (3) Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in foods. 1.ed. Washington, DC: ILSI press.2001.
- (4) Bolhassani A, Khavari A and Bathaie, SZ. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014; 1845:20-30.
- (5) Meinke MC, Friedrich A, Tscherch K, Haag SF, Darvin ME, Vollert H and Rohn J. Influence of dietary carotenoids on radical scavenging capacity of the skin and skin lipids. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 2013; 84:365-373.
- (6) Fiedor J and Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 2014; 6:466-488.
- (7) Gammone MA, Riccioni G and D'Orazio N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? *Food Nutr. Res*, 2015; 59:26762.
- (8) Miyashita K, Nishikawa S, Beppu F, Tsukui T, Abe M and Hosokawa M. The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. *J. Sci. Food. Agric*, 2011; 91:1166-1174.
- (9) Kim SM, Jung YJ, Kwon ON, Cha KH, Um BH, Chung D and Pan CH. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 2012; 166:1843-1855.
- (10) Shimoda H, Tanaka J, Shan SJ and Maoka T. Anti-pigmentary activity of fucoxanthin and its influence on skin mRNA expression of melanogenic molecules. *J. Pharm. Pharmacol*, 2010; 62:1137-1145.
- (11) Englert G, Bjørnland T and Liaaen-Jensen S. 1D and 2D NMR study of some allenic carotenoids of the fucoxanthin series. *Magn. Reson. Chem*, 1990; 28:519-528.
- (12) Kumar SR, Hosokawa M and Miyashita K. Fucoxanthin: A marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms. *Mar. drugs*, 2013; 11:5130-5147.
- (13) Zhang H, Tang Y, Zhang Y, Zhang S, Qu J, Wang X and Liu Z. Fucoxanthin: A promising medicinal and nutritional ingredient. *J. Evidence Based Complementary Altern. Med*, 2015; 2015.
- (14) Yan X, Chuda Y, Suzuki M and Nagata N. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis* a common Edible Seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 1999; 63:605-607.
- (15) Hosokawa M, Kudo M, Maeda H, Kohno H, Tanaka T and Miyashita K. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR γ ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj*, 2004; 1675:113-119.
- (16) Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K and Miyashita K. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2005; 332:392-397.
- (17) Martin LJ. Fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol in cancer prevention and treatment. *Mar. drugs*, 2015; 13:4784-4798.

- (18) Liu CL, Huang YS, Hosokawa M, Miyashita K and Hu ML. Inhibition of proliferation of a hepatoma cell line by FUCO in relation to cell cycle arrest and enhanced gap junctional intercellular communication. *Chem. Biol. Interact*, 2009; 182:165–172.
- (19) Rokkaku T, Kimura R, Ishikawa C, Yasumoto T, Senba M, Kanaya F and Mori N. Anticancer effects of marine carotenoids, fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on osteosarcoma. *Int. J. Oncol*, 2013; 43:1176–1186.
- (20) Chung TW, Choi HJ, Lee JY, Jeong HS, Kim CH, Joo M and Ha KT. Marine algal fucoxanthin inhibits the metastatic potential of cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2013; 439:580-585.
- (21) Ganesan P, Matsubara K, Sugawara T and Hirata T. Marine algal carotenoids inhibit angiogenesis by down-regulating FGF-2-mediated intracellular signals in vascular endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem*, 2013; 380:1-9.
- (22) Adams RP. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured, Carol Stream, IL, USA. 2001.
- (23) International Conference on Harmonization. Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A (R2). 2003.
- (24) International Conference on Harmonization. Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005
- (25) USP 39. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 39. ed. Rockville: United States. Pharmacopeial Convention, 2016.
- (26) Van Leeuwe MA, Villerius LA, Roggeveld J, Visser RJW and Stefels, J. An optimized method for automated analysis of algal pigments by HPLC. *Mar. Chem*, 2006; 102:267-275.
- (27) Xia S, Wang K, Wan L, Li A, Hu Q and Zhang C. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Mar. drugs*, 2013; 11:2667-2681.
- (28) Vieira FA, Guilherme RJ, Neves MC, Abreu H, Rodrigues ER, Maraschin M and Ventura SP. Single-step extraction of carotenoids from brown macroalgae using non-ionic surfactants. *Sep. Purif. Technol*, 2017; 172:268-276.
- (29) Zhang Y, Fang H, Xie Q, Sun J, Liu R, Hong Z, Yi R and Wu H. Comparative Evaluation of the Radical-Scavenging Activities of Fucoxanthin and Its Stereoisomers. *Molecules*, 2014; 19:2100-2113.
- (30) Nakazawa Y, Sashima T, Hosokawa M and Miyashita K. Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines. *J. Funct. Foods*, 2009; 1:88-97.
- (31) Maoka T, Fujiwara Y, Hashimoto K and Akimoto, N. Rapid Identification of Carotenoids in a Combination of Liquid Chromatography/UV-Visible Absorption Spectrometry by Photodiode-Array Detector and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry (LC/PAD/APCI-MS). *J. Oleo Sci*, 2002; 51:1-9.
- (32) Haugan JA, Englert G, Glinz E and Liaacn-Jensen S. Algal carotenoids. 48. Structural assignments of geometrical isomers of fucoxanthin. *Acta Chem. Scand*, 1992; 46:389-395.
- (33) Haugan JA and Liaaen-Jensen S. Isolation and characterisation of four allenic (6' S)-isomers of fucoxanthin. *Tetrahedron Lett*, 1994; 35:2245-2248.

- (34) Breemen RB van. Electrospray liquid chromatography-mass spectrometry of carotenoids. *Anal. Chem*, 1995; 67:2004-2009.
- (35) Teutenberg T, Tuerk, J, Holzhauser M and Giegold S. Temperature stability of reversed phase and normal phase stationary phases under aqueous conditions. *J. Sep. Sci*, 2007; 30:1101-1114.
- (36) Muthuirulappan S and Francis SP. Anti-cancer mechanism and possibility of nano-suspension formulations for a marine algae product fucoxanthin. *Asian. Pacifi. J. Cancer. Prev*, 2013; 14:2213-2216.
- (37) Yip WH, Joe LS, Mustapha WAW, Maskat MY, Said M (2014) Characterization and Stability of Pigments Extracted from *Sargas sumbinderi* Obtained from Semporna, Sabah. *Sains Malays* 43:1345-1354
- (38) Hii SL, Choong PY, Woo KK, Wong CL and Wong A. Stability studies of FUCO from *Sargas sumbinderi*. *Aust. J. Basic & Appl. Sci*, 2010; 4:4580–4584
- (39) Taverniers I, De Loose M and Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC, Trends Anal. Chem*, 2004; 23:535-552.
- (40) Rambla-Alegre M, Esteve-Romero J and Carda-Broch S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *J. Chromatogr. A*, 2012; 1232:101-109.
- (41) Thompson M, Ellison SL and Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*, 2002; 74:835-855.
- (42) Mínguez-Mosquera MI, Hornero-Méndez D and Pérez-Gálvez A. Carotenoids and provitamin A in functional foods, in: Hurst, W.J. (1.ed) *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*, CRC Press, 2002.101-157.
- (43) Sugimura R, Suda M, Sho A, Takahashi T, Sashima T, Abe M and Miyashita K. Stability of fucoxanthin in dried *Undaria pinnatifida* (Wakame) and baked products (scones) containing wakame powder. *Food Sci. Technol. Res*, 2012; 18:687-693.
- (44) Kawee-ai A, Kuntiya A and Kim SM. Anticholinesterase and antioxidant activities of fucoxanthin purified from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Nat. Prod. Commun*, 2013; 8:1381-1386.
- (45) Tanaka T, Shnimizu M and Moriwaki H. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules*, 2012; 17:3202-3242.
- (46) Yahia EM and Ornelas-Paz JDJ. Chemistry, stability and biological actions of carotenoids. *Fruit Veg Phytochem*, 2010; 1:177-222.
- (47) Zhao D, Kim SM, Pan CH and Chung D. Effects of heating, aerial exposure and illumination on stability of fucoxanthin in canola oil. *Food chem*, 2014; 145:505-513.
- (48) Watson GD. *Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemist.s* 2nd ed. Churchill Livingstone: London. 2005.

O texto completo dos Capítulos II, III, IV e V que no texto completo da Tese defendida ocupam o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 83 – 194, foram suprimidos por tratar-se de manuscritos em preparação para publicação em periódico científico.

9. DISCUSSÃO GERAL

Face aos resultados descritos na literatura sobre a relevância e o interesse na funcionalidade de produtos marinhos, devido ao fato de haver evidências epidemiológicas entre o consumo de alimentos marinhos e a redução do risco de doenças crônicas, tais como o câncer. Neste contexto, o isolamento e a investigação de novos bioativos, como o carotenoide marinho FUCO estão em evidência (FOTUHI, MOHASSEL e YAFFE, 2009; GAMMONE e D'ORAZIO, 2015).

Para tanto, o presente trabalho visou o desenvolvimento de uma formulação de NL inovadoras com matérias-primas da Amazônia brasileira, a manteiga de bacuri e o óleo de tucumã, contendo FUCO incorporada em um veículo semissólido para aplicação cutânea. Além disso, a validação de metodologia analítica indicativa de estabilidade por CLAE para o controle de qualidade e estudo de estabilidade da mesma foram realizados. Até o presente momento, não há relatos na literatura de uma formulação de nanopartículas contendo a combinação de manteiga de bacuri e de óleo de tucumã pela técnica de homogeneização de alto cisalhamento.

Na literatura, foi descrito o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, como as nanoemulsões (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015), o nanogel (RAVI e BASKARAN, 2015) e as microesferas (QUAN et al., 2013) para a encapsulação da FUCO. Em um destes estudos, a FUCO foi incorporada em nanogéis híbridos de quitosana-glicolípida, preparados pelo método de geleificação iônica, para melhorar a estabilidade e a biodisponibilidade (RAVI e BASKARAN, 2015). Da mesma forma, Salvia-Trujillo e colaboradores (2015) estudaram o impacto de 3 tipos de carreadores lipídicos sobre a biodisponibilidade da FUCO em nanoemulsões para uso em modelo gastrointestinal *in vitro*. Porém, diferentemente da descrição na literatura, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia de preparo de NL simples, de fácil escalonamento e que não necessitasse o uso de solventes orgânicos para uso tópico. Ressalta-se que a manteiga de bacuri e o óleo de tucumã, além de serem utilizados como matéria-prima para a preparação das NL, possuem efeitos farmacológicos.

Inicialmente, a FUCO matéria-prima foi adquirida em duas apresentações, incorporada em um óleo e na forma de pó. Deste modo, no **Capítulo I**, foi realizada a caracterização das duas matérias-primas visando seu uso em estudos futuros por EM e RMN ¹H. A EM é uma técnica analítica que permite que substâncias químicas possam ser detectadas de acordo com suas razões massa-carga (*m/z*), fornecendo

o valor do seu íon molecular e/ou seus fragmentos moleculares (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). A FUCO possui massa molecular de 658,92 g/mol e os resultados demonstram que as duas matérias-primas da FUCO possuem a mesma fórmula molecular, $C_{42}H_{58}O_6$, com íon molecular principal m/z 659 $[M+H]^+$ idênticos, porém com diferentes fragmentações. Com a interpretação dos espectros de RMN 1H e COSY, foi possível fazer uma comparação detalhada focando na identificação dos prótons olefínicos. Conclui-se que a FUCO em óleo e em pó foram identificadas como a forma total-*trans* FUCO e 9'-*cis* FUCO, respectivamente.

Em continuidade, foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE indicativo de estabilidade para quantificação da total-*trans* e 9'-*cis* FUCO. A capacidade do método de separar a FUCO e seus produtos de degradação, formados em condições de estresse, garantem a validação de um método cromatográfico indicativo de estabilidade, extremamente útil para o controle de qualidade (MAGGIO, VIGNADUZZO e KAUFMAN, 2013). Na análise e quantificação de carotenoides, o principal problema é devido a sua instabilidade, sendo assim, devem ser tomadas precauções para evitar perdas de teor e formação de produtos de degradação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Para o desenvolvimento do método foi realizado um estudo da molécula da FUCO, levando em consideração sua polaridade, solubilidade e pKa. Da mesma forma, várias condições experimentais foram testadas e otimizadas, modificando a temperatura da coluna, a vazão, a proporção de acetonitrila na fase móvel e, por fim, foram testados diferentes valores de pH.

De acordo com os requisitos da Farmacopeia Americana (USP) (2017) e ICH (2005), testes de adequabilidade do sistema são parte integrante de métodos, sendo uma etapa inicial a ser estabelecida para que todo o sistema selecionado para o desenvolvimento do processo de análise esteja apto a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis. Portanto, os parâmetros de adequabilidade do sistema investigados foram: eficiência da coluna, tempo de retenção, fator de cauda, fator de retenção e resolução. Foi realizada a comparação de diferentes valores de pH, 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0; com o pH 7,0 a eficiência da coluna produziu resultados mais satisfatórios. A resolução e fator de cauda não foram afetados com a mudança de pH. Com base em estudos anteriores desenvolvidos por Muthuirulappan e Francis (2013) e Yip e colaboradores (2014), a FUCO

mostrou-se mais estável em pHs de 5,0-7,0.

Deste modo, foi desenvolvido e validado um método indicativo de estabilidade por CLAE com a utilização de coluna cromatográfica C18, com detector de arranjo de diodos (DAD) no comprimento de onda de 450 nm e fase móvel composta por acetonitrila e água pH 7,0 (9.5:0,5 v/v). A determinação qualitativa e quantitativa da FUCO e seu isômero procederam-se de forma rápida, com 8 minutos de análise, eficiente e com resolução adequada. O método foi validado segundo os Guias Oficiais (BRASIL, 2003; ICH, 2005), avaliando os parâmetros especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Para a avaliação da especificidade, foram realizados estudos de degradação forçada. A total-*trans* FUCO foi exposta a condições fotolíticas, oxidativa, térmica, ácida e básica. Os meios oxidativo e sob irradiação com raios ultravioletas C (UVC) foram os principais aceleradores de degradação. Houve surgimento de produtos de degradação durante o estudo, porém esses picos foram detectados com boa resolução utilizando as condições cromatográficas otimizadas. Como outros carotenoides, a FUCO pode ser degradada quando exposta ao calor, luz, oxigênio e outras moléculas pró-oxidantes (MÍNGUEZ-MOSQUERA et al., 2002). A formação de alguns isômeros *cis* pode ocorrer devido às condições de estresse as quais a molécula é submetida. Geralmente, a FUCO resulta em um pico principal composto de sua forma total-*trans*, juntamente com os seus isômeros que são gerados através da quebra de várias ligações duplas carbono-carbono na cadeia de polieno (SUGIMURA et al., 2012; ZHANG et al., 2015).

A linearidade do método foi comprovada através do método dos mínimos quadrados e da ANOVA, em que o método proposto apresentou regressão linear significativa ($p < 0,05$) na faixa de concentração estudada, de 1,0-40,0 $\mu\text{g/mL}$, com $r = 0,9994$ e o desvio da linearidade mostrou-se não significativo ($p > 0,05$). A precisão do método foi comprovada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária, apresentando valores de desvio padrão relativo (DPR) inferiores a 0,7%. A exatidão apresentou valor de 103,25%, que está dentro do recomendado. A robustez do método foi avaliada por desenho experimental Box-Behnken através da modificação da temperatura da coluna, pH e comprimento de onda. De acordo com os resultados obtidos, as modificações nos fatores estudados não interferiram na quantificação da

FUCO, demonstrando que o método analítico é robusto. Em conclusão, demonstrou-se que o método proposto cumpre os requisitos de validação, estando de acordo com os parâmetros de qualidade preconizados.

O isômero 9'-*cis* da FUCO foi analisado com as condições cromatográficas anteriormente descritas e exposto sob as mesmas condições de degradação forçada. Os resultados demonstraram que o isômero 9'-*cis* apresenta um tempo de retenção em 6,1 minutos, diferindo do padrão e da forma total-*trans* que apresenta o tempo de retenção em 3,0 minutos. No estudo de degradação forçada, o isômero 9'-*cis* mostrou-se menos estável que a forma total-*trans* e não houve a formação de nenhum pico de degradação.

Posteriormente, no **Capítulo II** visou-se o desenvolvimento de uma formulação de NL inovadoras contendo uma combinação de manteiga de bacuri e óleo de tucumã pelo método de homogeneização de alto cisalhamento. Sistemas de liberação modificados, como os lipossomas e nanopartículas, são métodos utilizados para melhorar a penetração cutânea de fármacos e aumentar o efeito farmacológico, minimizar efeitos colaterais, bem como proteger a substância ativa (WELSS, BASKETTER e SCHRÖDER, 2004; MOSER et al., 2001). Visando o uso tópico, optou-se pela preparação de NL, pois em outras estratégias como as ciclodextrinas, há o uso de solventes orgânicos que interferem na permeabilidade da pele. Do mesmo modo, as NL apresentam cerca de 10 a 100 vezes menos toxicidade do que as partículas poliméricas (MARCATO, 2009). Como relatado por Almeida Borges e colaboradores (2013), em formulações para uso tópico, a fase aquosa afeta a permeabilidade da pele, porque a hidratação do estrato córneo é alterada e existe quebra da matriz de lipoproteína, resultando numa diminuição da resistência da substância ativa à difusão, promovendo um aumento da permeação.

As técnicas para preparação de NL incluem principalmente homogeneização a alta pressão, microemulsificação, evaporação de solvente e inversão de fase. A seleção do método mais adequado depende das propriedades dos componentes da formulação, avaliando sua estabilidade a temperaturas elevadas e solubilidade (SVILENOV e TZACHEV, 2014). Para objetivar a preparação das NL inovadoras por um método simples e rápido, que não utilize solvente orgânico, optou-se pelo método de homogeneização de alto cisalhamento. Primeiramente, foram produzidas NL sem a incorporação da FUCO, apenas com a combinação de manteiga de bacuri

e de óleo de tucumã, visto que essas duas matérias-primas oriundas da Amazônia possuem atividades farmacológicas. Foram realizados diversos ensaios pilotos para a produção das NL e, por fim, houve a produção de formulações variando a proporção de manteiga de bacuri e do óleo de tucumã. As concentrações dos tensoativos na fase oleosa e aquosa se mantiveram constantes. Sabe-se que a combinação de tensoativos, com caráter hidrofílico e lipofílico, geralmente tende a produzir partículas de tamanhos menores e mais estáveis (OLBRICH e MULLER, 1999).

O tamanho de partícula das NL pode ser afetado por vários parâmetros, como a composição da formulação, o método de produção e as condições estabelecidas para produção, como tempo de preparo e temperatura. Tensoativos ou lipídeos em altas concentrações favorecem a formação de partículas menores, porém, a diminuição destes significa aumento do tamanho das partículas, principalmente durante o período de estocagem. Do mesmo modo, a temperatura escolhida durante o processo de obtenção de NL interfere diretamente no tamanho das partículas. Baixas temperaturas tendem à formação de partículas maiores (LIPPACHER, MULLER e MADER, 2002; UNER, 2006).

Como passo inicial para a caracterização das NL inovadoras produzidas, o aspecto visual foi analisado, a fim de confirmar a presença de um sistema homogêneo. Todas as formulações apresentaram aspecto macroscópico homogêneo, com coloração amarela a alaranjada. A medida do diâmetro das partículas foi realizada por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e difração de laser. A difração de laser, apesar de ser utilizada para a caracterização de tamanho de partícula, tem seu uso voltado do para verificar a presença de partículas de tamanho maiores além de partículas menores, visto que existem outros métodos mais adequados para caracterizar partículas pequenas isoladas como, por exemplo, o DLS (KECK e MULLER, 2008). Por DLS, o diâmetro médio de partícula foi menor que 255 nm. O pdl foi menor que 0,3, indicando homogeneidade na distribuição das partículas. O fator SPAN foi calculado e expressa a distribuição em relação ao diâmetro médio, isto é, a homogeneidade da população. Valores de SPAN próximos de 1,0 indicam uma estreita distribuição de tamanhos. O fator SPAN das formulações variou entre 0,3 e 0,7. Estes resultados demonstram que o método de homogeneização de alto cisalhamento foi adequado para o preparo das NL com

manteiga de bacuri e óleo de tucumã, produzindo partículas com tamanho desejado para aplicação cutânea. A distribuição de tamanho das partículas é uma característica relevante, pois pode influenciar na farmacocinética, na biodistribuição e na segurança de um produto (DESAI, PATLOLLA e SINGH 2010).

Os valores de potencial zeta são adequados para manter o sistema sem agregação e precipitação, devido à repulsão eletrostática que as mesmas apresentam, resultante da densidade de carga da superfície. Portanto, é um parâmetro fundamental que afeta diretamente a estabilidade das NL e a interação das partículas com a superfície das células *in vivo* (QI et al, 2004). As NL inovadoras apresentaram uma carga negativa superficial, e os valores de potencial zeta ficaram entre -11 mV e -24 mV. Os valores negativos estão relacionados à natureza química dos componentes da formulação na interface partícula/água. Em adição, a presença de monooleato de sorbitano e o revestimento com polissorbato 80 determinaram um valor negativo (MOSQUEIRA et al., 2000). As médias das medidas do pH foram entre 5,44 e 5,64. Todas as formulações foram ácidas, mas os valores de pH, ainda assim, foram apropriados para uma aplicação no estrato córneo, que não apresenta alteração fisiológica quando submetido a um pH na faixa de 3,50 a 8,50 (SZNITOWSKA, JANICKI e BACZEK, 2001).

Um dos maiores problemas encontrados no desenvolvimento das NL é a sua instabilidade por longos períodos de tempo. Isto se dá porque podem ocorrer transições polimórficas, uma vez que os lipídeos sólidos possuem estrutura cristalina, levando à formação de cristais perfeitos e expulsão da substância ativa. A preservação do arranjo de lipídeos durante a estocagem até a administração das NL leva a uma liberação controlada da substância ativa encapsulada, pois no geral, esta situa-se no espaço entre as cadeias dos lipídeos (SOUTO e MULLER, 2008; HELGASON et al., 2009; SWATHI et al., 2010). A combinação de tensoativos provavelmente permitirá a formação de um filme interfacial coeso ao redor das partículas, constituindo uma camada estabilizante altamente resistente, permitindo que as formulações permaneçam estáveis ao longo do tempo de armazenamento (KRUGLYAKOV, 2000). A fim de investigar a estabilidade, as seis formulações produzidas foram deixadas em temperatura ambiente por dois meses e avaliou-se quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, pH, MET e DSC. Os resultados estabeleceram a adequada compatibilidade de compostos, pois todas as

formulações se mantiveram estáveis durante o período.

A partir dos resultados obtidos na caracterização da FUCO, a total-*trans* FUCO apresentou maior estabilidade que a 9'-*cis* FUCO. Geralmente, os isômeros *cis* são termodinamicamente menos estáveis. Além disso, a correta identificação dos isômeros é um ponto fundamental, uma vez que os isômeros diferem substancialmente em sua atividade.

Para o desenvolvimento das NL inovadoras contendo manteiga de bacuri e óleo de tucumã, a FUCO foi incorporada na formulação que apresentou os melhores resultados no estudo de estabilidade. A composição selecionada foi com 5% de manteiga de bacuri e 4% de óleo de tucumã. Os sistemas nanoestruturados, baseados em lipídeos, estão entre as tecnologias de encapsulação mais promissoras e têm se mostrado adequados para a encapsulação de compostos lipofílicos, como a FUCO (MOZAFARI et al., 2006).

Nesse contexto, no **Capítulo III** estão descritos os resultados da incorporação da FUCO nas NL inovadoras. Ao analisar macroscopicamente, a formulação de NL-FUCO apresentou-se homogênea com coloração laranja. A distribuição do tamanho mostrou-se na escala manométrica, com valor de 243 nm, com distribuição monomodal e pdl de 0,22. Com a adição da FUCO, o tamanho de partícula aumentou de 212,3 nm para 243 nm; os valores de pdl aumentaram de 0,18 a 0,22. Os valores de pdl foram inferiores a 0,3, sugerindo que o método de preparação produziu NL com distribuição de tamanho controlado. Valores similares de tamanho médio das partículas foram obtidos por Khoee e Yaghoobian (2009) em pesquisas para obtenção de nanopartículas para uso tópico, em que o tamanho variou entre 137 e 296 nm. Do mesmo modo, Taveira e colaboradores (2009) desenvolveram nanopartículas contendo doxorubicina com diâmetro médio de 175 e 278 nm, apresentando tamanho adequado para o tratamento tópico do câncer de pele.

A formulação de NL-FUCO foi carregada negativamente, e o potencial zeta encontrado foi de -44,9 mV. Com a adição da FUCO, o potencial zeta aumentou e, conseqüentemente, valores de potenciais zeta elevados contribuem para a estabilidade físico-química da formulação.

Visando confiabilidade na quantificação de FUCO encapsulada nas NL inovadoras, o método analítico foi validado. Os métodos foram validados segundo os Guias Oficiais (BRASIL, 2003; ICH, 2005) e os resultados demonstraram que o

método utilizado foi linear, preciso, exato, específico e reprodutível para a faixa de análise utilizada (1,0 a 40,0 µg/mL).

A taxa de encapsulação foi determinada pela técnica de ultrafiltração-centrifugação, na qual uma membrana de 100 kDa é utilizada, as NL inovadoras com FUCO encapsulada permanecem na parte superior do tubo, enquanto a fase aquosa com a FUCO na sua forma livre move-se para a parte inferior (PUGLIA et al., 2008). A taxa de encapsulação encontrada foi alta, de 98,9%, esse resultado era esperado em razão da natureza lipofílica da FUCO. Ali e colaboradores (2010) encontraram valores de 99,9% em nanopartículas lipídicas sólidas de sinvastatina, outro fármaco lipofílico. A concentração de FUCO nas suspensões ficou próxima da teórica, pois o teor encontrado foi de 103%.

Visando o uso tópico, as suspensões de NL necessitam ser incorporadas em formulações semissólidas a fim de se obter consistência adequada para a aplicação. Então, na etapa seguinte as NL-FUCO foram incorporadas em um hidrogel de Carbopol 940®. Esta preparação é usualmente utilizada em bases para uso tópico, devido a sua habilidade de proporcionar alta viscosidade em baixas concentrações, sua compatibilidade com diversas substâncias, sendo de fácil aquisição e apresenta fácil transposição para a escala industrial. Adicionalmente, estudos comprovam a boa estabilidade física de formulações de hidrogel contendo NL (SHAHGALDIAN et al., 2003; SOUTO et al., 2004). Uma vez que o uso de parabens é mal aceita pelos consumidores, o Sharomix CPP® foi utilizado como conservante na formulação. Sharomix CPP® é um composto de caprililglicol e fenilpropanol, criando assim, uma mistura de amplo espectro altamente eficiente.

A formulação apresentou-se homogênea em relação a cor e aspecto, mantendo as características específicas de um gel. O valor de pH obtido, de 5,95, é compatível com a aplicação cutânea e similar aos valores relatados na literatura para estes sistemas. O diâmetro médio encontrado na formulação das NL-FUCO incorporadas ao hidrogel foi de 220,1 nm e pdl de 0,22. Após a incorporação, o diâmetro médio das partículas diminuiu e o pdl manteve-se estável, demonstrado a viabilidade da incorporação das nanoestruturas no hidrogel. Da mesma forma, o diâmetro mostrou-se adequado para aplicação tópica, pois segundo Verma e colaboradores (2003) partículas com diâmetro médio em torno de 300 nm são capazes de liberar seu conteúdo nas camadas da pele.

Para assegurar a qualidade da preparação semissólida produzida contendo FUCO, além das propriedades físico-químicas, é necessário quantificá-la. Foi utilizado o método anteriormente desenvolvido por CLAE, e o teor apresentou-se adequado, em torno de 100%.

O estudo de fotoestabilidade, realizado em raios ultravioletas A (UVA), demonstrou que as NL inovadoras protegeram a FUCO, em 240 minutos as NL-FUCO e as NL-FUCO incorporadas em gel degradaram cerca de 11%, enquanto a FUCO na sua forma livre degradou 27%. Puglia e colaboradores (2008) relatam que as nanopartículas obtidas a partir de lipídios são capazes de melhorar a estabilidade química de compostos sensíveis à luz, oxidação e hidrólise.

Previamente ao ensaio de permeação cutânea *in vitro*, o estudo de dissolução das NL-FUCO foi realizado. Este método é uma forma para avaliar a liberação do fármaco em sistemas nanoestruturados e prever como esses sistemas se comportarão frente a meios biológicos, como a pele (BABY et al., 2009). Após 10 minutos, a concentração da FUCO livre foi de 98,76%. Entretanto, após 4 horas, observa-se que a NL-FUCO liberou 81,50%. Estes resultados demonstraram a capacidade das NL em controlar a liberação da FUCO. Estudos de permeação cutânea *in vitro* são empregados para a avaliação da segurança, eficácia e para a otimização dos processos de desenvolvimento de produtos para uso tópico. Do mesmo modo, possibilita também prever e correlacionar dados obtidos a partir de experimentos *in vitro* (BETTONI, 2009). Para a realização do estudo de permeação cutânea foram utilizadas células de difusão de Franz. Estas células são constituídas por um compartimento receptor e um doador o qual é separado por uma membrana, que pode ser uma membrana sintética, de origem humana ou animal. Entretanto, a disponibilidade da pele humana, é limitada e a utilização de pele animal é uma alternativa para a realização do estudo. Entre os animais, a pele de orelha de porco é a mais semelhante à pele humana, em características como o arranjo das fibras de colágeno na derme, o índice de lipídios e a espessura do estrato córneo (SARVEIYA et al., 2004; GODIN et al., 2007). Com base nos resultados, a FUCO não foi encontrada no compartimento receptor após 8 horas de estudo, evitando assim, possíveis efeitos sistêmicos. O hidrogel contendo NL-FUCO reteve uma maior quantidade de FUCO na epiderme e na derme, quando comparado à FUCO na sua forma livre. Junyaprasert e colaboradores (2009) desenvolveram NL com coenzima

Q10 pelo método de homogeneização a alta pressão. Os autores evidenciaram um aumento significativo do efeito oclusivo e da permeação da quantidade de fármaco com o uso do NL, em comparação com a nanoemulsão.

As NL tem se tornado muito atraentes para aplicações sobre a pele, inclusive peles danificadas ou inflamadas, principalmente por sua composição baseada em lipídios biocompatíveis (WISSING e MULLER, 2003). Em muitas condições clínicas, como o câncer, a integridade do estrato córneo é comprometida e sua remoção faz parte de alguns protocolos *in vitro* (SAIJA et al., 1998). Quando o estrato córneo foi removido, a penetração das NL-FUCO na epiderme e na derme aumentou, após 8 horas de experimento. Jain e colaboradores (2014) ressaltam que um sistema carreador efetivo para o tratamento tópico deve ser capaz de transportar o fármaco até as camadas mais externas da pele, apresentando localização transdérmica mínima e ausência de absorção sistêmica. Os resultados encontrados no estudo de permeação cutânea *in vitro* demonstram que a formulação desenvolvida apresenta-se como um sistema carreador promissor para a FUCO.

A carência de informações e regulamentações a respeito da avaliação toxicológica de nanopartículas expõe a necessidade de pesquisa nesta área. Centros internacionais de pesquisa e validação como a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2010) recomendam a utilização de métodos alternativos a animais para avaliação toxicológica. O **Capítulo IV** apresenta os resultados da avaliação toxicológica *in vitro* da FUCO e das NL-FUCO realizados com células 3T3 através dos ensaios de citotoxicidade por MTT, vermelho neutro e o método de exclusão com azul de Tripán. Concomitantemente, foram avaliadas as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e o potencial de membrana mitocondrial.

As células 3T3 têm origem de culturas de embrião inteiras, são capazes de dividir-se indefinidamente e são altamente sensíveis à inibição após a confluência da divisão celular (SAKAI, 2007). Huang e colaboradores (2017) realizaram um estudo com o objetivo de verificar se as células 3T3 são capazes de prever a toxicidade. Para isto, investigaram 120 resultados de citotoxicidade e compararam com estudos de toxicidade aguda realizados em camundongos. O resultado demonstrou que as células 3T3 são capazes de prever com relativa certeza a toxicidade em camundongos, permitindo a redução do uso de roedores.

A citotoxicidade do total-*trans* e 9'-*cis* FUCO em células 3T3 foi determinada por meio de ensaio MTT e NR. Nas concentrações estudadas, os dois testes apresentaram resultados diferentes. Com o mesmo propósito, no entanto, utilizando mecanismos diferentes, o MTT e o NR são complementares e, estes ensaios podem servir como uma abordagem confiável para a triagem de estudos de toxicidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Nogueira e colaboradores (2011), que relataram uma diferença significativa na citotoxicidade de cinco surfactantes à base de lisina por MTT e NR. A medição celular de espécies reativas mostrou um aumento significativo na produção de ROS e RNS na total-*trans* FUCO, após as 24 h de incubação. A 9'-*cis* FUCO apresentou um aumento significativo nas espécies reativas nas concentrações de 80 e 100 µg/mL. Apesar dos efeitos deletérios de ROS e RNS, estes subprodutos, são necessários para o processo de maturação das estruturas celulares e podem atuar na defesa do organismo (STORZ, 2005; GENESTRA, 2007). Na avaliação do potencial de membrana, a total-*trans* FUCO exibiu um aumento significativo após 24 h de incubação. Ao contrário, a 9'-*cis* FUCO não apresentou aumento no potencial de membrana. Quando ocorre perda significativa no potencial de membrana, há comprometimento na fosforilação oxidativa que restringe a energia celular com posterior liberação de fatores apoptóticos ocasionando a morte celular (SILVA et al., 2013).

Na literatura, a maior parte dos estudos toxicológicos com nanopartículas disponíveis estão baseados em ensaios *in vitro*. Isso ocorre por serem testes mais rápidos, com custo mais baixo e pela facilidade de serem executados (MARQUIS et al., 2009). Outro fator é que permitem elucidar o mecanismo de interação das nanopartículas com as células (HUANG, WU e ARONSTAM, 2010). Existe, ainda, um controle maior nas culturas celulares humanas e de animais e, com isso, gerar resultados mais reprodutíveis que estudos *in vivo*, entretanto é necessária uma padronização rígida desses ensaios para maximizar a reprodutibilidade (ARORA, RAJWADE e PAKNIKAR, 2012). Deste modo, Kroll e colaboradores (2012) avaliaram quatro ensaios *in vitro* para estresse oxidativo, viabilidade celular, morte celular e produção de citocinas inflamatórias utilizando 24 nanopartículas já caracterizadas. Os resultados variaram dependendo do ensaio utilizado e os autores ainda sugerem que cada ensaio *in vitro* deve ser avaliado para cada tipo de nanopartículas.

Para as NL-FUCO, os ensaios de MTT e NR não foram conclusivos. Para avaliar a citotoxicidade, foi utilizado o método de exclusão com azul de Tripán. Este método é utilizado para avaliar a integridade da membrana celular, pois quando ocorre morte celular ocorrem mudanças da permeabilidade da membrana. Na célula morta, não viável, este corante se difunde rapidamente para dentro do citoplasma (STROBER, 2015). Após 24 h, NL-FUCO mostrou citotoxicidade significativa nas concentrações de 80 e 100 µg/mL. Portanto, concentrações de NL-FUCO menores que 80 µg/mL podem ser consideradas biocompatíveis com células 3T3. Na avaliação celular de espécies reativas, os resultados foram similares à total-*trans* FUCO, pois as NL e as NL-FUCO apresentaram um aumento significativo na produção de ROS e RNS, demonstrando assim uma capacidade pró-oxidante significativa. Na avaliação do potencial de membrana, as NL-FUCO apresentaram um aumento significativo, ocasionando a hiperpolarização da membrana mitocondrial e impulsionando a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (BAGGALEY, ELLIOTT e BRUCE, 2008). Estudos de segurança são uma parte crítica do desenvolvimento de nanopartículas e o atual estudo mostrou que as NL-FUCO são biocompatíveis com células 3T3 até a concentração de 80 µg/mL. No entanto, estudos são necessários para elucidar a toxicidade *in vivo* destas NL.

No **Capítulo V** estão apresentados os resultados obtidos na *Università Degli Studi di Pavia* (Pavia/Itália). A quitosana é um polissacarídeo natural formado de copolímeros de *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina em proporções variáveis, obtida pela desacetilação da quitina. A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza e é encontrada na carapaça de crustáceos, insetos, moluscos e parede celular de alguns fungos. Além de ser um polímero biocompatível, biodegradável e atóxico, a quitosana apresenta características antimicrobianas, biodegradáveis, biocompatíveis e mucoadesivas. A propriedade mucoadesiva é devido às cargas positivas em pH fisiológico, assim a quitosana tem a capacidade de aderir a superfícies carregadas negativamente como pele e as mucosas, aumentando a retenção do fármaco no local de aplicação, melhorando desta forma a biodisponibilidade. Além disso, a quitosana tem a capacidade de induzir uma abertura temporária das junções epiteliais (BERGER et al., 2004; RINAUDO, 2006; NAGPAL, SINGH e MISHRA, 2010).

Nanopartículas têm sido recobertas com quitosana para associar as

vantagens destes sistemas e as propriedades biológicas da quitosana. Sandri e colaboradores (2010) desenvolveram NL contendo ciclosporina A associada com quitosana, para aplicação ocular. As NL associadas com quitosana foram biocompatíveis, aumentaram a permeação/penetração de ciclosporina A juntamente com um possível mecanismo de internalização/captação das nanopartículas *in vitro* (cultura de células) e *ex vivo* (córnea de porco). Do mesmo modo, Viera e colaboradores (2018) desenvolveram NL carregadas com rifampicina e revestidas de quitosana. O revestimento com quitosana aumentou as propriedades de mucoadesão, promovendo uma absorção mais eficaz após a administração pulmonar.

As NL-FUCO e as NL-FUCO revestidas com quitosana foram preparadas por meio de homogeneização de alto cisalhamento, como anteriormente descrito, e logo após foram caracterizadas. O revestimento com quitosana aumentou significativamente o tamanho das NL, o que pode ser explicado pela interação de lipídios e tensoativos e também pelo revestimento, que pode ter causado um rearranjo diferente nas NL (VIEIRA et al., 2018). Além disso, a variação no potencial zeta era esperada, pois o revestimento de quitosana modifica a carga superficial devido às interações eletrostáticas (HU, SUN e WU, 2013). A MET confirmou a presença do revestimento de quitosana na superfície das NL e evidenciou as diferenças na estrutura. O teor e a eficiência de encapsulação não foram alterados com o revestimento de quitosana, corroborando com estudos anteriores (LIU et al., 2016; SANDRI et al., 2010).

Para o estudo de bioadesão *in vitro* foi empregado um método simples com membrana de casca de ovo. A membrana da casca do ovo é constituída por colágeno, ácido glutâmico, ácido urônico, ácido siálico e é rica em aminoácidos, em particular prolina e glicina (PILLAI et al., 2015). Parodi e colaboradores (1999) avaliaram a mucoadesão de comprimidos bucoaderentes utilizando membrana de casca de ovo e compararam com uma membrana sintética de polipropileno. Os resultados demonstraram uma boa correlação e ainda, a membrana de casca de ovo forneceu valores mais confiáveis nos parâmetros de mucoadesão. Quando as NL e NL-FUCO foram avaliadas, o revestimento de quitosana aumentou significativamente a bioadesão. A carga superficial positiva das nanopartículas revestidas com quitosana é a responsável pela interação com o substrato biológico

e, conseqüentemente, pela articulação bioadesiva (SAPORITO et al., 2018).

O estudo de proliferação *in vitro* com fibroblastos dérmicos humanos evidenciou que as NL-FUCO mantiveram as propriedades de proliferação da quitosana e das NL em relação aos fibroblastos. Além disso, no microscópio confocal de varredura a laser (CLMS) evidenciou a internalização das NL em fibroblastos. Considerando a aplicação tópicã, os resultados evidenciam que as NL-FUCO revestidas com quitosana são uma abordagem promissora para preservar a integridade da pele.

10. CONCLUSÕES

- A fim de identificar as duas apresentações da FUCO, estas foram caracterizadas por EM, RMN ¹H e COSY. Estes testes foram realizados de forma satisfatória, permitindo adequada caracterização. A FUCO em óleo e em pó foram identificadas como total-*trans* FUCO e 9'-*cis* FUCO, respectivamente;
- O método indicativo de estabilidade desenvolvido e validado por CLAE mostrou-se rápido, específico, linear, preciso, exato e robusto na faixa de concentração proposta. Assim, sendo adequado para a determinação quantitativa da FUCO e seu isômero;
- A robustez, quando avaliada através do planejamento fatorial Box-Behnken, permitiu uma análise mais ampla da influência dos parâmetros analíticos na quantificação da FUCO;
- Na avaliação da estabilidade, a total-*trans* FUCO demonstrou maior estabilidade que seu isômero, 9'-*cis*;
- As NL inovadoras contendo uma combinação de manteiga de bacuri e de óleo de tucumã, utilizando homogeneização de alto cisalhamento, mostraram-se alternativa promissora, especialmente por suas propriedades benéficas para aplicação tópica;
- A caracterização físico-química das NL inovadoras mostrou resultados satisfatórios quando preparadas com diferentes concentrações da manteiga de bacuri e do óleo de tucumã;
- No estudo de estabilidade, as NL inovadoras contendo diferentes proporções de manteiga de bacuri e óleo de tucumã mantiveram-se homogêneas e estáveis quando armazenadas em temperatura ambiente, durante dois meses;
- A formulação de NL inovadora que apresentou os melhores resultados foi a composta com 5% de manteiga de bacuri e 4% de óleo de tucumã;
- A incorporação da FUCO nas NL inovadoras apresentou valores de diâmetro de partícula, pdl, potencial zeta e pH de acordo com as características de um sistema nanométrico e com características próprias para uso tópico;
- O método por CLAE demonstrou ser linear, preciso e exato, ou seja, adequado para o controle de qualidade e quantificação da FUCO nas NL inovadoras;
- A incorporação da FUCO nas NL conferiu maior fotoestabilidade frente à luz UVA, quando comparadas com a forma livre;

- A estrutura das NL-FUCO foi mantida após a incorporação em hidrogel, mostrando-se homogênea em relação à cor e aspecto, com tamanho nanométrico e valores de pH compatível com a aplicação cutânea;
- As NL-FUCO mostraram-se estáveis durante 45 dias nas temperaturas de armazenagem em 6 °C, 25 °C e 40 °C, de acordo com os valores de tamanho de partícula, potencial zeta e teor;
- No estudo de dissolução, as NL-FUCO apresentaram um fluxo de liberação sustentada, o que demonstra a capacidade das NL em controlar a liberação da FUCO;
- Através dos estudos de permeação cutânea *in vitro* foi possível quantificar a FUCO nas diferentes camadas da pele e demonstrou a capacidade das NL em modificar a permeação da FUCO encapsulada;
- Quando o estrato córneo foi removido, as concentrações da FUCO aumentaram na epiderme e na derme;
- Na avaliação toxicológica *in vitro*, as concentrações de NL-FUCO menores que 80 µg/mL podem ser consideradas biocompatíveis em células 3T3;
- Na avaliação celular de espécies reativas, houve aumento significativo na produção de ROS e RNS, sugerindo que a FUCO possui capacidade pró-oxidante significativa;
- Na avaliação do potencial de membrana, a FUCO induziu um aumento, o que hiperpolariza a membrana mitocondrial e impulsiona a síntese de ATP;
- O revestimento com quitosana aumentou o tamanho das NL, entretanto os valores se mostraram adequados para sistemas nanométricos. Com a análise do potencial zeta e a da MET pode-se confirmar a presença da quitosana;
- No estudo de bioadesão *in vitro*, o revestimento de quitosana aumentou significativamente a bioadesão das NL;
- O estudo de proliferação *in vitro* com fibroblastos evidenciou que as NL-FUCO mantiveram as propriedades de proliferação da quitosana.

11. REFERÊNCIAS

ACUNA, U.M.; JANCOVSKI, N.; KENNELLY, E.J. Polyisoprenylated benzophenones from clusiaceae: potential drugs and lead compounds. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 9, n. 16, p. 1560-1580, 2009.

ALI, H.; SHIRODE, A.B.; SYLVESTER, P.W.; NAZZAL, S. Preparation, characterization and anticancer effects of simvastatin-tocotrienol lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 389, n. 1, p. 223-231, 2010.

ALMEIDA BORGES, V.R.; SIMON, A.; SENA, A.R.C.; CABRAL, L.M.; SOUSA, V.P. Nanoemulsion containing dapsone for topical administration: a study of in vitro release and epidermal permeation. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 535-544, 2013.

ALMEIDA, A.J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced drug delivery reviews*, v. 59, n. 6, p. 478-490, 2007.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 99, p. 53-62, 2004.

ALVES, R.E.; DE BRITO, E.S.; RUFINO, M.S.M.; SAMPAIO, C.G. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study with acerola. *Acta Horticulturae*, 2008.

AMAN, R.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of β carotene and lutein in isolated spinach Chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 24, p. 9512–9518, 2005.

ARORA, S.; RAJWADE, J.M.; PAKNIKAR, K.M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 258, n. 2, p. 151-65, 2012.

ASAI, A.; YONEKURA, L.; NAGÃO, A. Low bioavailability of dietary epoxyxanthophylls in humans. *British journal of nutrition*, v. 100, n. 02, p. 273-277,

2008.

BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V. Influence of urea, isopropanol, and propylene glycol on rutin in vitro release from cosmetic semisolid systems estimated by factorial design. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 35, p. 272-282, 2009.

BAGGALEY, E.M.; ELLIOTT, A.C.; BRUCE, J.I. Oxidant-induced inhibition of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in pancreatic acinar cells: role of the mitochondria. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 295, n. 5, p. C1247-C1260, 2008.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. Cellular and Molecular. *Life Sciences*, v. 60, n. 1, p. 21-37, 2003.

BENSON, H.A.E.; WATKINSON, A.H. *Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*. New Delhi, India: John Wiley & Sons, 2012.

BEPPU, F.; NIWANO, Y.; SATO, E.; KOHNO, M.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K. *In vitro* and *in vivo* evaluation of mutagenicity of fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol. *The Journal of toxicological sciences*, v. 34, n. 6, p. 693-698, 2009b.

BEPPU, F.; NIWANO, Y.; TSUKUI, T.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K. Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice. *The Journal Toxicological Sciences*, v. 34, n. 5, p. 501-510, 2009a.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT. O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, n. 1, p. 19-34, 2004.

BERTRAM, J.S.; VINE, A.L. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1740, n. 2, p. 170-178, 2005.

- BETTONI, C.C.; FELIPPI, C.C.; ANDRADE, C. RAFFIN, R.P.; JAGER, A.; GUTERRES, S.S.; COSTA, T.D. Isotretinoin-Loaded Nanocapsules: Stability and Cutaneous Penetration by Tape Stripping in Human and Pig Skin. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 8, n. 2, p. 258-271, 2012.
- BOLZINGER, M.A; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through the skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.
- BONIFÁCIO, B.V.; SILVA, P.B.; RAMOS, M.A.S.; NEGRI, K.M.S.; BAUAB, T.M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 1-15, 2014.
- BOON, C.S.; MCCLEMENTS, D.J.; WEISS, J.; DECKER, E.A. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 50, n. 6, p. 515-532, 2010.
- BORA, P.S.; NARAIN, N.; ROCHA, R.V.M.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, A.C.; DE AZEVEDO MOREIRA, R. Characterization of the oil and protein fractions of Tucumã (*Astrocaryum Vulgare* Mart.) fruit pulp and seed kernel. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, v. 3, n. 2, p. 111-116, 2001.
- BOUABIDI, A.; ROZET, E.; FILLET, M.; ZIEMONS, E.; CHAPUZET, E.; MERTENS, B.; KLINKENBERG, R.; CECCATO, A.; TALBI, M.; STREEL, B.; BOUKLOUSE, A.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 19, p. 3180-3192, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília/DF, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro/RJ,

2017. <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 10.10.2018

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CARAMELLA, C.; FERRARI, F.; BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; SANDRI, G. Chitosan and its derivatives as drug penetration enhancers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 20, n. 1, p. 5-13, 2010

CHINEMBIRI, T.N.; DU PLESSIS, L.H.; GERBER, M.; HAMMAN, J. H.; DU PLESSIS, J. Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment. *Molecules*, v. 19, n. 8, p. 11679-11721, 2014.

CHUNG, T.W.; CHOI, H.J.; LEE, J.Y.; JEONG, H.S.; KIM, C.H.; JOO, M.H. Marine algal fucoxanthin inhibits the metastatic potential of cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 439, n. 4, p. 580-585, 2013.

CRUPI, P.; TOCI, A.T.; MANGINI, S.; WRUBL, F.; RODOLFI, L.; TREDICI, M.R.; ANTONACCI, D. Determination of fucoxanthin isomers in microalgae (*Isochrysis* sp.) by high- performance liquid chromatography coupled with diode- array detector multistage mass spectrometry coupled with positive electrospray ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 27, n. 9, p. 1027-1035, 2013.

D'ORAZIO, N.; GEMELLO, E.; GAMMONE, M.A.; DE GIROLAMO, M.; FICONERI, C.; RICCIONI, G. Fucoxanthin: A treasure from the sea. *Marine Drugs*, v. 10, n. 3, p. 604–616, 2012.

DAS, S.K.; HASHIMOTO, T.; SHIMIZU, K.; YOSHIDA, T.; SAKAI, T.; SOWA, Y.; KOMOTO, A.; KANAZAWA, K. Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21 WAF1/Cip1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1726, n. 3, p. 328-335, 2005.

DEGIM, T.I. New tools and approaches for predicting skin permeability. *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 11, p. 11-12, 2006.

DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55, n. 13, p. 5062-5072, 2007.

DESAI, P.; PATLOLLA, R.R.; SINGH, M. Interaction of nanoparticles and cell penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. *Molecular Membrane Biology*, v. 27, n. 7, p. 247-259, 2010.

DIDEROT, N.T.; SILVERE, N.; ETIENNE, T. Xanthones as therapeutic agents: chemistry and pharmacology. *Advances in Phytomedicine*, v. 2, p. 273-298, 2006.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E.B.; SILVA, A.M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers—a systematic review of in vitro data. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 87, n. 1, p. 1-18, 2014.

ENGLERT, G.; BJØRNLAND, T.; LIAAEN-JENSEN, S. 1D and 2D NMR study of some allenic carotenoids of the fucoxanthin series. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 28, n. 6, p. 519-528, 1990.

ERB, P.; JI, J.; WERNLI, M.; KUMP, E.; BÜCHNER, S. A. Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation. *Immunology letters*, v. 100, n. 1, p. 68-72, 2005.

FOTUHI, M.; MOHASSEL, P.; YAFFE, K. Fish consumption, long-chain omega-3 fatty acids and risk of cognitive decline or Alzheimer disease: a complex association. *Nature Clinical Practice Neurology*, v. 5, n. 3, p. 140-152, 2009.

FRANCESKO, A.; TZANOV, T. Chitin, chitosan and derivatives for wound healing and tissue engineering. In: *Biofunctionalization of Polymers and their Applications*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 1-27.

GAGEZ, A.L.; THIERY, V.; PASQUET, V.; CADORET, J.P.; PICOT, L. Epoxycarotenoids and cancer. *Current Bioactive compounds*, v. 8, n. 2, p. 109-141, 2012.

GAMMONE, M. A.; RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? *Food & nutrition research*, v. 59, 2015.

GAMMONE, M.A.; D'ORAZIO, N. Anti-Obesity Activity of the Marine Carotenoid Fucoxanthin. *Marine drugs*, v. 13, n. 4, p. 2196-2214, 2015.

GANDHI, R.; PILLAI, O.; THILAGAVATHI, R.; GOPALAKRISHNAN, B.; LAL KAUL, C.; PANCHAGNULA, R. Characterization of azithromycin hydrates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, n. 3, p. 175-184, 2002.

GENESTRA, M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Review Cell Signal*, v. 19, p. 1807-1819, 2007.

GIL, E.S. *Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos*. São Paulo: Pharmabooks, 2010. p. 48.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 1152–1161, 2007.

GRABOVAC, V.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 11, p. 1713-1723, 2005.

HAJJ ALI, H.; MICHAUX, F.; NTSAMA, B.; SANDRINE, I.; DURAND, P.; JASNIEWSKI, J.; LINDER, M. Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: Influence of nanoparticles size on drug loading. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2015.

HELGASON, T.; AWAD, T.S.; KRISTBERGSSON, K.; MCCLEMENTS, D.J.; WEISS, J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 334, n. 1, p. 75-81, 2009.

HEO, S.J.; JEON, Y.J. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 95, n. 2, p. 101-107, 2009.

HIL, S.L.; CHOONG, P.Y.; WOO, K.K.; WONG, C.L. Stability studies of fucoxanthin from *Sargassum binderi*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 4, n. 10, p. 4580–4584, 2010.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007.

HU, L.; SUN, Y.; WU, Y. Advances in chitosan-based drug delivery vehicles. *Nanoscale*, v. 5, n. 8, p. 3103-3111, 2013.

HUANG, T.; YAN, L.; ZHENG, S.; WANG, Y.; WANG, X.; FAN, L.; LI, C.; ZHAO, Y.; MARTYNIUK, C.J. Discriminating modes of toxic action in mice using toxicity in BALB/c mouse fibroblast (3T3) cells. *Chemosphere*, v. 188, p. 73-80, 2017.

HUANG, Y.W.; WU, C.; ARONSTAM, R.S. Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from in vitro Studies. *Materials*, v. 3, p. 4842-4859, 2010.

ICH. *Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical methods text and methodology Q2 (R1)*. In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

ISHIKAWA, C.; TAFUKU, S.; KADEKARU, T.; SAWADA, S.; TOMITA, M.; OKUDAIRA, T.; NAKAZATO, T.; TODA, T.; UCHIHARA, J.N.; TAIRA, N. Antiadult T-cell leukemia effects of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. *International journal of cancer*, v. 123, n. 11, p. 2702-2712, 2008.

JAIN, A.K.; JAIN, A.; NEERAJ, K.G.; AGARWALA, A.; JAIN, A.; JAIN, S.A.; TYAGIC, R.K.; JAIN, R.K.; AGRAWALE, H.; AGRAWALA, G.P. Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: An effective approach for acne treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 121, p. 222–229, 2014.

JOHNSON, G.L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, v. 298, n. 5600, p. 1911-1912, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004.

JUNYAPRASERT, V.B.; TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; BOONME, P.; MULLER, R. H. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: Stability, rheology and in vitro skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 377, n. 1–2, p. 207–214, 2009.

KANAZAWA, K.; OZAKI, Y.; HASHIMOTO, T.; MATSUSHITA, S.; HIRANO, M.; OKADA, T.; NAKATSUKA, M. Commercial-scale preparation of biofunctional fucoxanthin from waste parts of brown sea algae *Laminaria japonica*. *Food science and technology research*, v. 14, n. 6, p. 573-573, 2008.

KECK, C.M.; MULLER, R.H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry—90% of the published measurements are false. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 355, p. 150–163, 2008.

KHOEE, S.; YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *European Journal Medicine Chemistry*, v. 44, n. 6, p. 2392-2399, 2009.

KIM, K.N.; AHN, G.; HEO, S.J.; KANG, S.M.; KANG, M.C.; YANG, H.M.; KIM, D.; ROH, S.W.; KIM, S.K.; JEON, B.T. Inhibition of tumor growth *in vitro* and *in vivo* by fucoxanthin against melanoma B16F10 cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 35, n. 1, p. 39-46, 2013.

KIM, K.N.; HEO, S.J.; KANG, S.M.; AHN, G.; JEON, Y.J. Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway. *Toxicology in vitro*, v. 24, n. 6, p. 1648-1654, 2010.

KIM, S.M.; JUNG, Y.J.; KWON, O.N.; CHA, K.H.; UM, B.H.; CHUNG, D.; PAN, C.H. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, n. 7, p. 1843–1855, 2012.

- KODAMA, D.H.; GONÇALVES, A.E.D.S.S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations. *Food Science and Technology (Campinas)*, v. 30, n. 4, p. 1077-1082, 2010.
- KOTAKE-NARA, E.; KUSHIRO, M.; ZHANG, H.; SUGAWARA, T.; MIYASHITA, K.; NAGAO, A. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *The Journal of nutrition*, v. 131, n. 12, p. 3303-3306, 2001.
- KROLL, A.; PILLUKAT, M.H.; HAHN, D.; SCHNEKENBURGER, J. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Archives of toxicology*, v. 86, n. 7, p. 1123-1136, 2012.
- KRUGLYAKOV, P.M. *Hydrophile-lipophile balance of surfactants and solid particles: physicochemical aspects and applications*. Amsterdam: Elsevier, 2000. p. 102-110.
- KULKARNI, V.S. *Handbook of Non-invasive Drug delivery Systems*. Elsevier Inc., 2010.
- KUMAR, S.; SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, S.K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: ethnobotanical and therapeutic importance. *Fitoterapia*, v. 89, p. 86-125, 2013.
- KUMAR, S.R.; MASASHI, H.; KAZUO, M. Fucoxanthin: A marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms. *Marine drugs*, v. 11, n. 12, p. 5130–5147, 2013.
- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; LINKKANIG, J. L. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010.
- LADEMANN, J.; SCHANZER, S.; MEINKE, M.; STERRY, W.; DARVIN, M.E. Interaction between carotenoids and free radicals in human skin. *Skin pharmacology and physiology*, v. 24, n. 5, p. 238-244, 2011.
- LANE, M.E. Skin penetration enhancers. *International journal of pharmaceutics*, v. 447, n. 1, p. 12-21, 2013.

LIEBERMANN, D.; TRONT, J.S.; SHA, X.; MUKHERJEE, K.; MOHAMED-HADLEY, A.; HOFFMAN, B. Gadd45 stress sensors in malignancy and leukemia. *Critical Reviews in Oncogenesis*, v. 16, n. 1-2, 2011.

LIPPACHER, A.; MULLER, R.H.; MADER, K. Semisolid SLN dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 53, n. 2, p. 155-160, 2002.

LIU, C.L.; HUANG, Y.S.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K.; HU, M.L. Inhibition of proliferation of a hepatoma cell line by fucoxanthin in relation to cell cycle arrest and enhanced gap junctional intercellular communication. *Chemico-biological interactions*, v. 182, n. 2, p. 165-172, 2009.

LIU, D.; LI, J.; PAN, H.; HE, F.; LIU, Z.; WU, Q. Potential advantages of a novel chitosanN-acetylcysteine surface modified nanostructured lipid carrier on the performance of ophthalmic delivery of curcumin. *Scientific reports*, v. 6, p. 28796, 2016.

LUSTOSA, A.K.M.; ARCANJO, D.D.; RIBEIRO, R.G.; RODRIGUES, K.A.F.; PASSOS, F.F.B.; PIAUILINO, C.A.; CARVALHO, F.A.A. Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, n. 1, p. 77-82, 2016.

MAEDA, H.; HOSOKAWA, M.; SASHIMA, T.; MIYASHITA, K. Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 19, p. 7701-7706, 2007.

MAEDA, H.; HOSOKAWA, M.; SASHIMA, T.; MIYASHITA, K. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Molecular medicine reports*, v. 2, n. 6, p. 897-902, 2009.

MAGGIO, R.M.; VIGNADUZZO, S.E.; KAUFMAN, T.S. Practical and regulatory

considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 49, p. 57-70, 2013.

MANDAWGADE, S.D.; PATRAVALE, V.B. Development of SLNs from natural lipids: application to topical delivery of tretinoin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 363, n. 1, p. 132-138, 2008.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 6, p. 01-37, 2009.

MARQUIS, B.J.; LOVE, S.A.; BRAUN, K.L.; HAYNES, L.C. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst*, v. 134, n. 3, p. 425-39, 2009.

MARTIN, L.J. Fucoxanthin and Its Metabolite Fucoxanthinol in Cancer Prevention and Treatment. *Marine drugs*, v. 13, n. 8, p. 4784-4798, 2015.

MCNULTY, H.; JACOB, R.F.; MASON, R.P. Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *American Journal of Cardiology*, v. 101, n. 10, p. 20D–29D, 2008.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced drug delivery reviews*, v. 47, n. 2, p. 165-196, 2001.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; Carotenoids and provitamin A in functional foods, in: HURST, W.J. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. Boca Raton, FL: CRC Press: 2002. p. 101-157.

MIYASHITA, K.; NISHIKAWA, S.; BEPPU, F.; TSUKUI, T.; ABE, M.; HOSOKAWA, M. The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 7, p. 1166-1174, 2011.

MOLASSIOTIS, A.; FERNADEZ-ORTEGA, P.; PUD, D.; OZDEN, G.; SCOTT, J. A.; PANTELI, V.; MARGULIES, A.; BROWALL, M.; MAGRI, M.; SELVEKEROVA, S. Use

of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. *Annals of oncology*, v. 16, n. 4, p. 655-663, 2005.

MORAIS, L.R.B.; GUTJAHR, E. *Química de oleaginosas: Valorização da biodiversidade amazônica*. Brasília: Agência de Cooperação Técnica Alemã (GTZ), 2009. 83 p.

MOSER, K.; KRIWET, K.; FROEHLICH, C.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Permeation enhancement of a highly lipophilic drug using supersaturated systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 90, n. 5, p. 607-616, 2001.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO- ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly (D, L- lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

MOZAFARI, M.R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L.; AWATI, A.; OMRI, A.; SUNTRES, Z.E.; SINGH, H.J. Recent trends in the lipid based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science Food and Agriculture*, v. 86, n. 13, p. 2038-2045, 2006.

MULLER, R.H.; MAÉDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *European journal of pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MULLER, R.H.; PARDEIKE, J. Coenzyme Q10-loaded NLCs: preparation, occlusive properties and penetration enhancement. *Pharmaceutical Technology Europe*, v. 19, p. 46-49, 2007.

MULLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced drug delivery reviews*, v. 54, p. S131-S155, 2002.

MURAKAMI, C.; TAKEMURA, M.; SUGIYAMA, Y.; KAMISUKI, S.; ASAHARA, H.; KAWASAKI, M.; ISHIDOH, T.; LINN, S.; YOSHIDA, S.; SUGAWARA, F. Vitamin A-

related compounds, all-*trans* retinal and retinoic acids, selectively inhibit activities of mammalian replicative DNA polymerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, v. 1574, n. 1, p. 85-92, 2002.

MUTHUIRULAPPAN, S.; FRANCIS, S.P. Anti-cancer mechanism and possibility of nano-suspension formulation for a marine algae product fucoxanthin. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 14, n. 4, p. 2213-2216, 2013.

NAGPAL, K.; SINGH, S.K.; MISHRA, D.N. Chitosan nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010.

NAKAZAWA, Y.; SASHIMA, T.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K. Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines. *Journal of Functional Foods*, v. 1, n. 1, p. 88-97, 2009.

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.

NISHINO, H. Cancer chemoprevention by natural carotenoids and their related compounds. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 59, n. S22, p. 231-235, 1995.

NOGUEIRA, D.R.; MITJANS, M.; INFANTE, M.R.; VINARDELL, M.P. Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. *International journal of pharmaceutics*, v. 420, n. 1, p. 51-58, 2011.

OECD. *Organisation for Economic Co-operation and Development*. N. 129. Guidance Document On Using Cytotoxicity Tests To Estimate Starting Doses For Acute Oral Systemic Toxicity Tests. 2010.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.

OLBRICH, C.; MULLER, R.H. Enzymatic degradation of SLN—effect of surfactant and surfactant mixtures. *International journal of pharmaceutics*, v. 180, n. 1, p. 31-39, 1999.

OLIVEIRA, A.N.; do AMARAL, I.L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil1. *Acta Amazonica*, v. 34, n. 1, p. 21-34, 2004.

OSTROWSKI, A. D.; MARTIN, T. L.; CONTI, J.; HURT, B.; HARTHORN, H. Nanotoxicology: characterizing the scientific literature, 2000–2007. *Journal of Nanoparticle Research*. v. 11, n.2, p. 251–257, 2009.

PARODI, B.; RUSSO, E.; GATTI, P.; BIGNARDI, G. Development and *in vitro* evaluation of buccoadhesive tablets using a new model substrate for bioadhesion measures: the eggshell membrane. *Drug development and industrial pharmacy*, v. 25, n. 3, p. 289-295, 1999.

PILLAI, M.M.; AKSHAYA, T.R.; ELAKKIYA, V.; GOPINATHAN, J.; SAHANAND, K.S.; RAI, B.D.; SELVAKUMAR, R. Egg shell membrane—a potential natural scaffold for human meniscal tissue engineering: an *in vitro* study. *RSC Advances*, v. 5, n. 93, p. 76019-76025, 2015.

PIMENTEL, V.P.; VIEIRA, V.A.M.; MITIDIERI, T.L.; OLIVEIRA, F.F.S.; PIERONI, J.P. *Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança?* Revista do BNDES, Rio de Janeiro, n. 43, p. 41-89, 2015.

PUGLIA, C.; BLASI, P.; RIZZA, L.; SCHOUBBEN, A.; BONINA, F.; ROSSI, C.; RICCI, M. Lipid Nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 357, n. 1, p. 295-304, 2008.

QI, L.; XU, Z.; JIANG, X.; HU, C.; ZOU, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, v.339, n. 16, p. 2693–2700, 2004.

QUAN, J.; KIM, S.M.; PAN, C.H.; CHUNG, D. Characterization of fucoxanthin-loaded microspheres composed of cetyl palmitate-based solid lipid core and fish

gelatin–gum arabic coacervate shell. *Food research international*, v. 50, n. 1, p. 31-37, 2013.

RAVI, H.; BASKARAN, V. Biodegradable chitosan-glycolipid hybrid nanogels: A novel approach to encapsulate fucoxanthin for improved stability and bioavailability. *Food Hydrocolloids*, v. 43, p. 717-725, 2015.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington, DC: ILSI press, 2001.

ROSSI, S.; MARCIELLO, M.; SANDRI, G.; FERRARI, F.; BONFERONI, M.C.; PAPETTI, A.; GRISOLI, P. Wound-dressings based on Chitosans and hyaluronic acid for the release of chlorhexidine diacetate in skin ulcer therapy. *Pharmaceutical development and technology*, v. 12, n. 4, p. 415-422, 2007.

RUFINO, M.S.; ALVES, R E.; DE BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food chemistry*, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUAL, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 175, n. 1, p. 85-94, 1998.

SAKAI, A. BALB/c 3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, v. 14, p. 367-373, 2007.

SALVIA-TRUJILLO, L.; SUN, Q.; UM, B.H.; PARK, Y.; MCCLEMENTS, D.J. *In vitro* and *in vivo* study of fucoxanthin bioavailability from nanoemulsion-based delivery

systems: Impact of lipid carrier type. *Journal of Functional Foods*, v. 17, p. 293-304, 2015.

SANDRI, G.; BONFERONI, M.; GOKCE, E.H; FERRARI, F.; ROSSI, S.; PATRINI, M.; CARAMELLA, C. Chitosan-associated SLN: in vitro and ex vivo characterization of cyclosporine A loaded ophthalmic systems. *Journal of Microencapsulation*, v. 27: p. 735-746, 2010.

SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; MORI, M.; DEL FANTE, C.; CARAMELLA, C. Platelet lysate formulations based on mucoadhesive polymers for the treatment of corneal lesions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, n. 2, p. 189-198, 2011.

SANDRI, G.; MOTTA, S.; BONFERONI, M.C.; BROCCA, P.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; DEL FAVERO, E. Chitosan-coupled solid lipid nanoparticles: tuning nanostructure and mucoadhesion. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 110, p. 13-18, 2017.

SANGEETHA, R.K.; BHASKAR, N.; BASKARAN, V. Comparative effects of beta-carotene and fucoxanthin on retinol deficiency induced oxidative stress in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 331, n. 1-2, p. 59–67, 2009.

SAPORITO, F.; SANDRI, G.; ROSSI, S.; BONFERONI, M.C.; RIVA, F.; MALAVASI, L.; FERRARI, F. Freeze dried chitosan acetate dressings with glycosaminoglycans and tranexamic acid. *Carbohydrate Polymers*, v. 184, p. 408–417, 2017.

SARVEIYA, V.; RISK, S.; BENSON, H.A.E. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. *Journal of Chromatography B*, v. 803, p. 225-231, 2004.

SATOMI, Y.; NISHINO, H. Fucoxanthin, a natural carotenoid, induces G1 arrest and GADD45 gene expression in human cancer cells. *In vivo*, v. 21, n. 2, p. 305-309, 2007.

SATOMI, Y.; NISHINO, H. Implication of mitogen-activated protein kinase in the induction of G1 cell cycle arrest and *gadd45* expression by the carotenoid fucoxanthin in human cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, v. 1790, n. 4, p. 260-266, 2009.

SHAH, K.A.; DATE, A.A.; JOSHI, M.D.; PATRAVALE, V.B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: potential in topical delivery. *International journal of pharmaceuticals*, v. 345, n. 1, p. 163-171, 2007.

SHAHGALDIAN, P.; QUATTROCCHI, L.; GUALBERT, J.; COLEMAN, A.W.; GORELOFF, P. AFM imaging of calixarene based solid lipid nanoparticles in gel matrices. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals*, v. 55, n. 1, p. 107-113, 2003.

SHIMODA, H.; TANAKA, J.; SHAN, S. J.; MAOKA, T. Anti-pigmentary activity of fucoxanthin and its influence on skin mRNA expression of melanogenic molecules. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, n. 9, p. 1137-1145, 2010.

SHO, H. History and characteristics of Okinawan longevity food. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, v. 10, n. 2, p. 159-164, 2001.

SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. I. Preparation and particle size determination. *Pharmaceutical Science Pharmacology*, v. 3, p. 194-197, 1994.

SILVA, A.P.; FILHO, J.C.C.; DA COSTA JÚNIOR, J.S.; PELÁEZ, W.J.; FAILLACE, M.S.; FERRAZ, A.D.B.F.; FREITAS, R.M. Toxicological Study Employing Repeated Doses of Garcinielliptone FC, a Polyisoprenylated-Benzophenone Isolated from Seed of *Platonia Insignis* Mart. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 3, p. 316-330, 2015.

SILVA, D.D.; CARMO, H.; LYNCH, A.; SILVA, E. An insight into the hepatocellular death induced by amphetamines, individually and in combination: the involvement of necrosis and apoptosis. *Archives Toxicology*, v. 87, p. 2165-2185, 2013.

SOUTO, E.B.; ALMEIDA, A.J.; MULLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN®, NLC®) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 3, n. 4, p. 317-331, 2007.

SOUTO, E.B.; MULLER, R.H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC). *International Journal of Cosmetic Science*, v. 30, n. 3, p. 157-165, 2008.

SOUTO, E.B.; WISSING, S.A.; BARBOSA, C.M.; MULLER, R.H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v. 58, n. 1, p. 83-90, 2004.

STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*, v. 10, n. 1-3, p. 1881-1896, 2005.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, v. 111, n. 1, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2015.

SUGIMURA, R.; SUDA, M.; SHO, A.; TAKAHASHI, T.; SASHIMA, T.; ABE, M.; MIYASHITA, K. Stability of fucoxanthin in dried *Undaria pinnatifida* (Wakame) and baked products (scones) containing wakame powder. *Food Science and Technology Research*, v. 18, n. 5, p. 687-693, 2012.

SVILENOV, H.; TZACHEV, C. Solid Lipid Nanoparticles – A Promising Drug Delivery System. In: SVILENOV, H.; TZACHEV, C.; SEIFEALIAN, A.; DE MEL, A.; KALASKAR, D.M. *Nanomedicine*. Manchester: One Central Press (OCP), 2014. p. 187-237.

SWATHI, G.; PRASANTHI, N.L.; MANIKIRAN, S.S.; RAMARAO, N. Solid lipid nanoparticles: Colloidal carrier systems for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, n. 12, v. 1, p. 01-16, 2010.

SZKITOWSKA, M.; JANICKI, S.; BACZEK, A. Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. *Journal of controlled release*, v. 76, n. 3, p. 327-335, 2001.

TAVEIRA, S.F.; DE SANTANA, D.C.; ARAÚJO, L.M.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R.F. Effect of iontophoresis on topical delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles. *Journal of biomedical nanotechnology*, v. 10, n. 7, p. 1382-1390, 2014.

TROMMER, H.; NEUBERT, R.H.H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. *Skin pharmacology and physiology*, v. 19, n. 2, p. 106-121, 2006.

UEKANE, T.M.; NICOLOTTI, L.; GRIGLIONE, A.; BIZZO, H.R.; RUBIOLO, P.; BICCHI, C.; REZENDE, C.M. Studies on the volatile fraction composition of three native Amazonian-Brazilian fruits: Murici, bacuri, and sapodilla. *Food Chemistry*, v. 219, p. 13-22, 2017.

UENOJO, M.; MAROSTICA, M.R.; PASTORE, G.M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

UNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie*, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

URIKURA, I.; SUGAWARA, T.; HIRATA, T. Protective effect of fucoxanthin against UVB-induced skin photoaging in hairless mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 75, n. 4, p. 757-760, 2011.

USP 40. *The United States Pharmacopeia*. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2017. 37 ed.

VERMA, D.D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 258, n. 1-2, p. 141-151, 2003.

VIERA, A.C.C.; CHAVES, L.L.; PINHEIRO, S.; PINTO, S.; PINHEIRO, M.; COSTA LIMA, S.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; REIS, S. Mucoadhesive chitosan-coated solid lipid nanoparticles for better management of tuberculosis. *International journal of pharmaceuticals*, v. 536, n. 1, p. 478-485, 2018.

WANG, J.; CHEN, S.; XU, S.; YU, X.; MA, D.; HU, X.; CAO, X. In vivo induction of apoptosis by fucoxanthin, a marine carotenoid, associated with down-regulating STAT3/EGFR signaling in sarcoma 180 (S180) xenografts-bearing mice. *Marine drugs*, v. 10, n. 9, p. 2055-2068, 2012.

WELSS, T.; BASKETTER, D.A.; SCHRÖDER, K.R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicology in vitro*, v. 18, n. 3, p. 231-243, 2004.

WHO. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. *GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. Available at: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx. Published 2012. Accessed January 2018.

WISSING, S.A.; MULLER, R.H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 56, n. 1, p. 67-72, 2003.

WOO, M.N.; JEON, S.M.; KIM, H.J.; LEE, M.K.; SHIN, S.K.; SHIN, Y.C.; CHOI, M.S. Fucoxanthin supplementation improves plasma and hepatic lipid metabolism and blood glucose concentration in high-fat fed C57BL/6N mice. *Chemico-biological interactions*, v. 186, n. 3, p. 316-322, 2010.

YAHIA, E.M.; ORNELAS-PAZ, J.D.J. Chemistry, stability and biological actions of carotenoids. In: LAURA, A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability*. New Delhi, India: John Wiley & Sons, 2010. p. 177-222.

- YAMAMOTO, K.; ISHIKAWA, C.; KATANO, H.; YASUMOTO, T.; MORI, N.
Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, induce apoptosis of primary effusion lymphomas. *Cancer letters*, v. 300, n. 2, p. 225-234, 2011.
- YIP, W.H.; JOE, L.S.; MUSTAPHA, W.A.W.; MASKAT, M.Y.; SAID, M.
Characterization and Stability of Pigments Extracted from *Sargassum binderi* Obtained from Semporna, Sabah. *Sains Malaysiana*, v. 43, n. 9, p. 1345-1354, 2014.
- YU, R.; HU, X.; XU, S.; JIANG, Z.; YANG, W. Effects of fucoxanthin on proliferation and apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via JAK/STAT signal pathway. *European journal of pharmacology*, v. 657, n. 1, p. 10-19, 2011.
- ZHANG, H.; TANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, S.; QU, J.; WANG, X.; KONG, R.; HAN, C.; LIU, Z. Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, 2015.
- ZHAO, D.; KIM, S.M.; PAN, C.H.; CHUNG, D. Effects of heating, aerial exposure and illumination on stability of fucoxanthin in canola oil. *Food chemistry*, v. 145, p. 505-513, 2014.