

Hugo Da Silva Pinho

Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas contendo quercetina e ómega-3: Avaliação
do seu potencial antioxidante

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2024

Hugo Da Silva Pinho

Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas contendo quercetina e ómega-3: Avaliação
do seu potencial antioxidante

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2024

Hugo Da Silva Pinho

Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas contendo quercetina e ómega-3: Avaliação
do seu potencial antioxidante

Atesto a originalidade do trabalho,

(Hugo Da Silva Pinho)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação da Professora Doutora Carla Martins Lopes e coorientação da Professora Doutora Marlene Lúcio.

Porto, 2024

RESUMO

A nossa pele está constantemente sujeita a agressões provocadas por agentes externos, como por exemplo radiação ultravioleta (UV), microrganismos e produtos químicos oxidantes, o que pode resultar num aumento do stress oxidativo. Este desequilíbrio entre a produção e a eliminação das espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) provoca, ao longo do tempo, danos e, consequentemente, o envelhecimento cutâneo. Uma solução possível para ultrapassar a ação destes agentes e, consequentemente, o fenómeno de stress oxidativo é o recurso a agentes protetores cutâneos, os quais podem proteger a pele da ação dos ROS. A quercetina (Q) e os ácidos gordos ômega-3 (ω_3) são dois compostos bioativos que apresentam efeitos protetores cutâneos bem reportados na literatura científica, incluindo a atividade antioxidante. No entanto, ambos os compostos bioativos apresentam propriedades que limitam os seus efeitos aquando da aplicação tópica, como seja a dificuldade de permeação cutânea e a instabilidade química. Com o objetivo de superar estas limitações foram desenvolvidos, através de uma abordagem da utilização de um sistema de veiculação duplo, hidrogéis (HG) de carbómero enriquecidos com vetores lipídicos nanoestruturados (NLCs, do inglês *Nanostructured Lipid Carriers*) para a administração tópica de Q e/ou ω_3 com o intuito de melhorar a sua estabilidade e a permeação cutânea, permitindo um aumento dos efeitos benéficos cutâneos destes bioativos. Foram preparadas duas formulações de NLCs, ambas com a mesma composição lipídica, mas com diferentes agentes tensioativos (os NLC1, contendo lecitina de soja e Poloxamer 407, e os NLC2, contendo Tween[®] 80 e dioctilsulfossuccinato de sódio (DOSS)). Estes agentes tensioativos demonstraram influenciar o desempenho terapêutico das formulações dos NLCs devido às suas propriedades físico-químicas. Apesar de ambas as formulações de NLCs apresentarem elevada capacidade de carga da Q, as propriedades físico-químicas da formulação dos NLC2 foram consideradas as mais adequadas para aplicação tópica na pele e asseguram uma maior estabilidade coloidal. Adicionalmente, os NLC2 demonstraram uma libertação mais prolongada da Q e ainda apresentaram uma melhor encapsulação e proteção da Q, ao mesmo tempo ainda apresentou melhor permeabilidade do que as outras formulações testadas. O efeito oclusivo dos HGs como sistema de veiculação dos NLCs também tem um impacto positivo na permeação cutânea. Os HGs-NLC2 contendo Q, com ou sem ω_3 , demonstraram ser mais eficazes como formulações antioxidantes e foto-protetoras. Adicionalmente, estas formulações apresentaram um efeito antibacteriano ao reduzir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Estes resultados sugerem que a utilização dos

HGs enriquecidos com NLC2 constituem uma abordagem promissora para a administração cutânea, com potencial para prevenir o envelhecimento da pele e outros processos cutâneos decorrentes dos danos provenientes do stress oxidativo.

Palavras-chave: quercetina; ácidos gordos ômega-3 (ω_3), vetores lipídicos nanoestruturados (NLCs); atividade antioxidante; foto-proteção; atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Our skin is constantly subjected to aggression from external agents, such as ultraviolet (UV) radiation, microorganisms, and oxidizing chemicals, which can result in an increase of oxidative stress. This imbalance between the production and elimination of reactive oxygen species (ROS) cause damage over time and, consequently, leads to skin aging. One possible solution to overcome the effect of these aggressive agents and, consequently, the phenomenon of oxidative stress is to use skin protection agents, which can protect the skin from the action of ROS. Quercetin (Q) and omega-3 fatty acids (ω_3) are bioactive compounds that have well-known skin protective benefits reported in scientific literature, including antioxidant activity. However, both compounds have properties that limit their effects when applied topically, such as their low chemical stability and difficulty in skin permeation). In order to overcome these limitations, carbomer hydrogels (HG) enriched with nanostructured lipid carriers (NLCs) for the topical administration of Q and/or ω_3 were developed using a dual vehicle system approach, with the aim of improving their stability and skin permeation, allowing for an increase in the beneficial cutaneous effects of these bioactive compounds. Two formulations of NLCs were prepared, both with the same lipid composition, but with different surfactants (NLC1, containing soya lecithin and poloxamer 407, and NLC2, containing Tween[®] 80 and dioctyl sodium sulphosuccinate (DOSS)). These surfactants were shown to influence the therapeutic performance of the NLC formulations due to their physico-chemical properties. Although both NLC formulations had a high Q-loading capacity, the physicochemical properties of the NLC2 formulation proved to be the most suitable for topical use on the skin and ensured greater colloidal stability. Additionally, NLC2 demonstrated a more prolonged release of Q, indicating a greater storage capacity while improving its permeability. The occlusive effect of HGs as a vehicle system for NLCs also had a positive impact on skin permeation. HGs-NLC2 loaded with Q, with or without ω_3 , demonstrated to be more effective as antioxidant and photoprotective formulations. Moreover, these formulations showed an antibacterial effect by reducing the growth of *Staphylococcus aureus*. These results suggest that the use of HGs enriched with NLC2 is a promising approach for skin administration, with the potential to prevent skin ageing and other skin processes resulting from oxidative stress damage.

Keywords: quercetin; omega-3 fatty acids (ω_3); nanostructured lipid carriers (NLCs); antioxidant activity; photoprotection; antimicrobial activity

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à Universidade Fernando Pessoa por me proporcionar a oportunidade de realizar esta pesquisa e completar este percurso académico. A todos os docentes que fizeram parte da minha formação, o meu reconhecimento pela partilha de conhecimento, pela orientação e pelo compromisso com o meu crescimento académico.

À Professora Doutora Carla Martins Lopes e à Professora Doutora Marlene Lúcio, agradeço do fundo do coração. A vossa orientação, sabedoria, dedicação e sobretudo paciência foram cruciais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao meu grupo de amigos, expresso a minha sincera gratidão. O vosso apoio constante, as conversas inspiradoras e a amizade que me acompanharam ao longo desta jornada académica são inestimáveis.

À minha família, quero expressar o meu profundo amor e reconhecimento. O vosso apoio incondicional, paciência e encorajamento foram fundamentais para a minha realização académica. A todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para este projeto e para a minha jornada académica, o meu sincero agradecimento.

Cada um de vocês desempenhou um papel importante no meu percurso e na realização desta dissertação. Esta grande aventura chegou ao fim. Obrigado a todos.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
AGRADECIMENTOS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Motivação	3
1.2. Objetivos	3
1.3. Metodologia	4
II. DESENVOLVIMENTO.....	5
2.COMPOSTOS BIOATIVOS	5
2.1. <i>Quercetina</i>	5
2.2. <i>Ácidos gordos ômega-3</i>	7
3. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS	9
III. PARTE EXPERIMENTAL	11
4. MATERIAIS.....	11
5. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DOS NLCS	11
6. CARACTERIZAÇÃO DOS NLCS.....	12
6.1. <i>Tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta</i>	12
6.2. <i>Análise por calorimetria diferencial de varrimento</i>	14
6.3. <i>Eficiência de encapsulação e capacidade de carga</i>	16
7. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DO HIDROGEL ENRIQUECIDO COM NLCS	17
8. AVALIAÇÃO DOS HGS ENRIQUECIDOS COM NLCS	17
8.1. <i>Ensaio de libertação da Q</i>	17
8.2. <i>Ensaio de avaliação da permeação cutânea da Q</i>	18
8.3. <i>Avaliação do efeito oclusivo</i>	18
8.4. <i>Estudo do comportamento reológico</i>	20
8.5. <i>Avaliação in vitro da atividade antioxidante da Q e dos ω_3</i>	21
8.6. <i>Avaliação qualitativa do efeito foto-protetor</i>	22
8.7. <i>Avaliação da atividade antimicrobiana</i>	23
9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25

10. CARACTERIZAÇÃO DOS NLCs.....	25
11. AVALIAÇÃO DOS HGS ENRIQUECIDOS COM NLCs	29
V. CONCLUSÃO.....	37
IV. BIBLIOGRAFIA.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Estrutura química da quercetina</i>	5
Figura 2: Esquema representativo dos NLCs (Lucio et al., 2023).	10
Figura 3: Reação do ABTS com compostos antioxidantes (Munteanu et al., 2021).....	22
Figura 4: Resultados da caracterização físico-química das formulações de NLCs (Lucio et al., 2023). Caracterização da estabilidade dos NLC1 (A, C) e NLC2 (B, D) durante o armazenamento a 4 C. Os dados representam a média e o desvio padrão de 3 medições. As medições de tamanho (barras), PDI (pontos) (A, B) e carga de superfície (Potencial Zeta (mV)) (C, D) são do dia da preparação (T1) e após 4 semanas (T4). As comparações foram efetuadas utilizando o teste ANOVA e o teste de comparação múltipla de Tukey para as seguintes observações emparelhadas (tamanho/PDI em (B) e potencial Zeta em (D)): NLC1 Placebo T1 vs. NLC2 Placebo T1; NLC1 + Q T1 vs. NLC2 + Q T1; NLC1 + ω_3 vs. NLC2 + ω_3 T1; NLC1 + Q + ω_3 T1 vs. NLC2 + Q + ω_3 T1. ns-sem significância estatística; *** p-valor < 0,001; ** p-valor < 0,01; * p-valor < 0,05. Não foi encontrada significância estatística quando T1 e T4 foram comparados dentro de cada formulação de NLC; no entanto, neste caso, para maior clareza, ns não foi apresentado na figura.	26
Figura 5: Resultado dos termogramas dos componentes lipídicos dos NLCs, da quercetina isolada e da quercetina na mistura lipídica fundida (Lucio et al., 2023).	28
Figura 6: Perfil de libertação da Q a partir dos HGs enriquecidos com NLCs ao longo do tempo (Lucio et al., 2023).	29
Figura 7: Perfis de permeação in vitro da Q a partir dos HGs enriquecidos com NLCs (Lucio et al., 2023).02	30
Figura 8: Efeito oclusivo dos HGs contendo NLCs (Lucio et al., 2023).	31
Figura 9: Análise do comportamento reológico dos HGs contendo NLCs (Lucio et al., 2023).	32
Figura 10: Resultados da avaliação da atividade antioxidante dos NLCs pelo método ABTS (A) e pela concentração de MDA (B) (Lucio et al., 2023).	33
Figura 11: Resultados do teste de foto-proteção dos HGs enriquecidos com os NLC2 (Lucio et al., 2023).	35
Figura 12: Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos bioativos, dos HGs enriquecidos com os NLCs e do HG placebo contra <i>S. aureus</i> (Lucio et al., 2023).	36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Defesa contra as espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês reactive oxygen species) nas células.....	6
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS

5-LOX – 5-lipoxigenase

ω_3 – Ácidos gordos ómega-3

1O_2 – Radical oxigénio singuleto

ABTS^{•+} – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico

Cat – Catalase

Chol – Colesterol (do inglês, *cholesterol*)

COX-2 – Ciclo oxigenase 2

DHA – Ácido docosaenoico

DLS – Dispersão de Luz Dinâmica (do inglês, *Dynamic Light Scattering*)

DO – Densidade ótica

DOSS – Dioctilsulfossuccinato de sódio

DPPC – Dipalmitoilfosfatidilcolina (do inglês, *dipalmitoylphosphatidylcholine*)

DSC – Calorimetria diferencial de varrimento (do inglês, *Differential Scanning Calorimetry*)

ELS – Eletroforese de luz dinâmica (do inglês, *Electrophoretic Light Scattering*)

EPA – Ácido eicosapentaenoico

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

H_2O_2 – Peróxido de hidrogénio

HGs – Hidrogeles

HO^\bullet – Radical hidroxilo

HPLC – Cromatografia líquida de alta resolução (do inglês, *High performance liquid chromatography*)

JAK2 – Janus quinase 2 (do inglês, *Janus kinase 2*)

IL – Interleucinas

MAPK – *Mitogen-activated protein kinases*

MDA – Malondialdeído

MMP-1 – Metaloproteinases da matriz 1 (do inglês, *matrix metalloproteinase-1*)

NF- κ B – Fator nuclear de cadeia leve kappa potenciador das células B (do inglês *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NLCs – Vetores lipídicos nanoestruturados (do inglês, *Nanostructured Lipid Carriers*)

O_2^- – Radical superóxido

PDI – Índice de polidispersão (do inglês, *Polydispersity Index*)

PKB – Proteína quinase B (do inglês, *Protein kinase B*)

PKC – Proteína quinase C (do inglês, *Protein kinase C*)

PUFAs – Polyunsaturated fatty acids

Q – Quercetina

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

SDB – Caldo de dextrose Sabouraud (do inglês, *Sabouraud Dextrose Broth*)

STAT3 – *Signal transducer and activator of transcription 3*

SOD – Superóxido dismutase

TBA - Ácido tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric acid*)

TBARS – *Thiobarbituric acid-reactive substance*

TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumor necrosis factor*)

TSB – Caldo de soja trípico (do inglês, *Trypticase Soy Broth*)

UFC – Unidades formadoras de colónias

UV – Ultravioleta

WHO – Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization*)

WVTR – Taxa de transmissão de vapor de água (do inglês, *water vapor transmission rate*)

I. INTRODUÇÃO

A pele é considerado o maior órgão do corpo humano e tem como principal função a proteção contra agressões de agentes externos (e.g., radiação ultravioleta (UV), poluição e microrganismos) ao organismo devido à sua estrutura bastante complexa e estratificada (Papaccio *et al.*, 2022). Para além da sua função de defesa, a pele também apresenta outras funções, como regulação da temperatura corporal, mantém a homeostasia interna e atua como órgão sensorial. Apesar do sistema antioxidante protetor inerente à pele, a exposição constante da pele a um excesso de radiações prejudiciais (e.g. radiações UV) e a outros agentes externos nocivos (e.g., microrganismos e químicos oxidantes) podem aumentar o stress oxidativo cutâneo e induzir facilmente danos e promover o envelhecimento da pele (Liu *et al.*, 2023). O stress oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de radicais livres, nomeadamente espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), e a sua eliminação (Reuter *et al.*, 2010). O stress oxidativo é uma das principais causas de lesões na pele (e.g. fotoenvelhecimento, dermatites e melanomas) (Liu *et al.*, 2023).

Em 2015, a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) declarou, na temática relacionada com envelhecimento e saúde, que é necessário a descoberta de novas estratégias para alcançar o envelhecimento saudável da pele (Pilkington *et al.*, 2021). Estando o envelhecimento da pele interligado com a ineficácia na eliminação de ROS (Brieger *et al.*, 2012), a aplicação tópica de agentes antioxidantes naturais pode ser considerada uma estratégia promissora na redução do stress oxidativo na pele, mantendo as qualidades protetoras da pele contra agentes externos nocivos (Domaszewska-Szostek *et al.*, 2021). Entre os antioxidantes naturais, a quercetina (Q) apresenta um elevado poder antioxidante e alguns estudos científicos revelam o seu efeito antioxidante cutâneo (Fonseca *et al.*, 2023). No caso dos ácidos gordos de ômega-3 (ω_3), este composto bioativo apresenta também reportado efeito antioxidante ao nível celular (Djuricic *et al.*, 2021). Adicionalmente, o ω_3 possui capacidade de reparar a membrana celular (Huang *et al.*, 2018). As atividades reportadas destes dois compostos bioativos tornam-se de elevado interesse para o desenvolvimento de formulações antioxidantes para administração cutânea.

A Q é um composto fenólico que pertence ao grupo dos flavonoides, sendo considerada um flavonol, uma vez que possui uma estrutura 3-hidroxi-flavona. Este composto pode ser encontrado em vários vegetais (e.g., cebolas e alho), frutas (e.g., maçãs, bagas e cerejas) e bebidas derivada de plantas (e.g., chá de ervas e vinho tinto) (Tomou *et al.*, 2023). O efeito da Q contra o stress oxidativo foi largamente estudado ao longo dos anos, sendo este composto caracterizado como um agente antioxidante não enzimático (Boots *et al.*, 2008). Segundo Xu e colaboradores (Xu *et al.*, 2019), a Q tem demonstrado uma atividade significativa na prevenção e no tratamento em doenças da pele.

Os ácidos gordos do ômega-3 utilizados foram o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosaenoico (DHA) que são ácidos gordos polinsaturados (PUFAs, do inglês *polyunsaturated fatty acid*) que se encontram no pescado e nos óleos de peixe. O efeito terapêutico destes ácidos gordos provem da capacidade de modular as vias de sinalização da inflamação que desencadeiam fenómenos de stress oxidativo nas células (Djuricic *et al.*, 2021). Desta forma, o ω_3 tem a capacidade de proteger a membrana celular (Huang *et al.*, 2018). Os PUFAs são considerados compostos essenciais para a função de proteção e de homeostasia da pele. Os PUFAs intervêm na inflamação cutânea, principalmente por um mecanismo de competição com o ácido araquidónico inflamatório e a inibição da produção de eicosanóides pró-inflamatórios. Por outro lado, os PUFAs com origem no óleo de peixe podem ser considerados os reguladores que afetam a síntese e a atividade das citocinas para promover a cicatrização de feridas. Adicionalmente, a ausência destes compostos pode resultar num aumento da perda de água transepidermica e, consequentemente, no comprometimento da sua função de proteção (Huang *et al.*, 2018). O óleo de peixe tem sido amplamente estudado devido ao seu efeito comprovado no melhoramento da gravidade de algumas doenças/condições da pele, como o fotoenvelhecimento, o cancro da pele, a dermatite, as feridas cutâneas, a melanogénese (Huang *et al.*, 2018).

Apesar do interesse destes dois compostos bioativos, a Q e o ω_3 apresentam algumas limitações que condicionam o sucesso da sua atividade aquando da sua administração cutânea, nomeadamente limitada permeação através da pele e instabilidade química, sendo compostos suscetíveis de sofrerem processos de oxidação (Shahparast *et al.*, 2019; Deepika *et al.*, 2022). Deste modo, é necessário encontrar alternativas de veiculação que melhorem a eficácia e aumentem a estabilidade destes bioativos (Lawson, 2023). Neste contexto, a proposta é a utilização dos vetores lipídicos nanoestruturados (NLCs, do

inglês *Nanostructured lipid carriers*), uma vez que sistemas de veiculação permitem encapsular compostos hidrófobos, aumentam a permeação cutânea e protegem os compostos encapsulados de eventuais degradações.

Adicionalmente, os hidrogéis (HGs) podem proporcionar benefícios adicionais aos NLCs para a administração cutânea devido às redes tridimensionais dos polímeros hidrófilos que conseguem intumescer e absorver uma grande quantidade de água ou de fluídos biológicos, melhorando a adesão da formulação à pele e prolongando a liberação dos compostos que veiculam. Desta forma, este trabalho propõe o uso de um duplo sistema de veiculação, desenvolvendo HGs enriquecidos com os NLCs que veiculam os compostos bioativos.

1.1. Motivação

A motivação para a execução deste trabalho resulta de existirem poucos nanossistemas lipídicos reportados na literatura para a coadministração da Q e do ω_3 , (Azizi *et al.*, 2019; Frenzel *et al.* 2015; He *et al.*, 2020; Vaz *et al.*, 2022). Além disso, nenhuma das formulações foi desenvolvida com o intuito de uma aplicação cutânea. A abordagem de desenvolver um sistema de veiculação duplo, ou seja, HGs enriquecidos com os NLCs contendo estes dois compostos bioativos também não tem sido explorado.

1.2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho de investigação foi avaliar o efeito protetor das formulações de NLCs contendo Q e/ou ω_3 , destinadas à aplicação cutânea, e compreender se os compostos bioativos veiculados possuem um efeito superior aos compostos não encapsulados e se a encapsulação simultânea dos dois compostos produz um efeito sinérgico. Para alcançar este objetivo, foi necessário delinear objetivos mais específicos, nomeadamente:

- desenvolvimento e caracterização física de dispersões aquosas de NLCs contendo Q e/ ω_3 ;
- incorporação numa base semissólida (HG) e avaliação das características reológicas da formulação final;

- estudos do potencial terapêutico: avaliação dos perfis cinéticos de libertação; avaliação da permeação cutânea, avaliação da atividade antioxidante, do efeito foto-protetor e da atividade antimicrobiana.

1.3. Metodologia

Na secção “Desenvolvimento” foi conduzida uma revisão narrativa abrangendo diversos artigos científicos relacionados ao tema. As bases de dados consultadas e utilizadas para a pesquisa incluem a PubMed, Google Livros, Google Académico, com a finalidade de identificar as publicações relevantes. Nesta pesquisa foram utilizadas palavras-chave em inglês, tais como “Quercetin”, “Omega-3 Fatty Acids”, “Nanostructured Lipid Carriers (NLCs)”, “Photoprotective”, “Antioxidant Activity”. Os artigos foram selecionados tendo em conta a sua relevância e conteúdo relativo ao tema em estudo. Os artigos selecionados abrangem um período temporal compreendido entre 1970 até aos dias de hoje (2024), já a pesquisa e recolha de dados para a realização do documento limita-se ao período temporal entre 2022 e 2024.

II. DESENVOLVIMENTO

2. Compostos bioativos

2.1. Quercetina

A quercetina (Q), palavra derivada do latim *quercetum*, não é sintetizada no corpo humano (Deepika *et al.*, 2022). A sua fórmula molecular é $C_{15}H_{10}O_7$ e a sua estrutura química é composta por três grupos fenólicos estando presentes cinco grupos hidroxilos (e.g. C_3 do anel C, C_5 e C_7 do anel A e por fim $C_{3'}$ e $C_{4'}$ do anel B) (Tomou *et al.*, 2023). Além disso apresenta uma dupla ligação entre o C_2 e C_3 do anel C e um grupo carbonilo, (Li *et al.*, 2016).

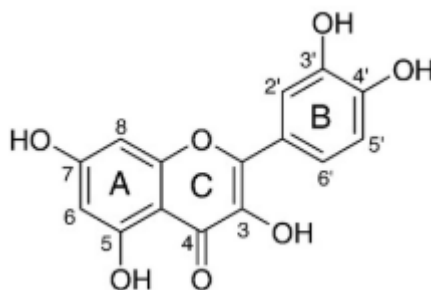


Figura 1 - Estrutura química da quercetina.

A Q é um composto que apresenta várias propriedades farmacológicas descritas, justificando o seu uso em diversas patologias, nomeadamente nos tratamentos oncológicos, reações alérgicas, inflamações, artrites e problemas cardiovasculares (Deepika *et al.*, 2022). A propriedade farmacológica mais relevante da Q relaciona-se com a sua capacidade de eliminação de radicais livres e atividade antioxidante.

Em geral, o organismo dispõe de diferentes níveis de defesa contra o stress oxidativo (Tabela 1).

Tabela 1: Defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) nas células.

Primeira linha de defesa		Segunda linha de defesa	
Antioxidante	Mecanismo de ação	Antioxidante	Mecanismo de ação
Superóxido dismutase (SOD)	$O_2^- \rightarrow H_2O_2$	Ácido ascórbico Ácido úrico	Doa elétrons aos radicais livres
Catalase (Cat)	$2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$	Glutationa Alfa-tocoferol Ubiquinol	
Glutationa peroxidase (GPx)	$H_2O_2 + GSH \rightarrow GSSG + H_2O$	Beta-carotenos Licopenos	Incorporação de radicais livres

O mecanismo antioxidante da Q é principalmente atribuído a vários mecanismos: (i) um efeito regulador da atividade de enzimas antioxidantes do organismo, como a catalase (Cat), superóxido dismutase (SOD) e a glutatona (GSH); (ii) capacidade de recaptação dos ROS; e (iii) um efeito modulador das vias sinalizadoras de transdução celular (Tomou *et al.*, 2023). O efeito regulador enzimático da Q permite a conversão de ROS (e.g., radical superóxido, O_2^- , radical hidroxilo, HO^\bullet , peróxido de hidrogênio, H_2O_2 e radical oxigênio singuleto 1O_2) em espécies não reativas (Tabela 1) (Xu *et al.*, 2019). A Q também apresenta capacidade de neutralizar os ROS diretamente (Liu *et al.*, 2023), sendo considerada um dos compostos flavonoides com melhor atividade antioxidante (Ulusoy *et al.*, 2020). Esta atividade está diretamente associada à sua estrutura molecular (Figura 1): (1) a presença do grupo o-catecol no anel B, que proporciona grande estabilidade ao radical resultante; (2) a conjugação do anel B com o grupo 4-oxo por meio da dupla ligação entre as posições 2 e 3, facilitando a deslocalização da carga eletrônica pelo anel B; e (3) a presença dos grupos 3-OH e 5-OH em conjunto com o grupo 4-oxo, permitindo que a carga eletrônica se desloque entre estes substituintes. A combinação dessas características estruturais promove uma maior deslocalização da carga eletrônica, conferindo maior estabilidade aos radicais gerados (Gomes *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação antioxidante da Q também envolve a modulação de várias vias de sinalização celular através da interação com proteínas quinases e fosfatases (e.g., PI3K/Akt e MAPK, do inglês *Mitogen-activated protein kinases*) que são vias essenciais na regulação de processos celulares como a proliferação, apoptose e inflamação. Ao

bloquear estas vias, que são ativadas por ROS, a Q pode induzir a apoptose em células tumorais, reduzir a proliferação celular, promovendo o sistema de defesa antioxidante e mantendo o equilíbrio oxidativo.

Além disso, a Q modula fatores de transcrição, como o fator nuclear de cadeia leve kappa potenciador das células B (NF- κ B, do inglês *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), que está relacionado com respostas inflamatórias. Ao inibir a ativação do NF- κ B, a Q reduz a expressão de genes pró-inflamatórios. A Q também pode influenciar o fator Nrf2, que regula a resposta antioxidante celular, aumentando a expressão de genes que protegem contra o stress oxidativo. Em resumo, a Q atua como um modulador de sinalização celular, influenciando diretamente as vias de proliferação, inflamação e defesa antioxidante (Chagas *et al.*, 2022).

Especificamente ao nível da pele, as ações moduladoras das vias de sinalização celular apresentadas pela Q são muito importantes. A Q apresenta a capacidade de interagir com a proteína quinase C (PKC, do inglês *Protein kinase C*) e a Janus quinase 2 (JAK2, do inglês *Janus kinase 2*), bloqueando a expressão induzida pela radiação UV das enzimas (e.g. ciclo oxigenase 2 (COX-2) e da metaloproteínases da matriz 1 (MMP-1, do inglês *matrix metalloproteinase-1*)) e evitando a degradação das fibras de colagénio (Domaszewska-Szostek *et al.*, 2021). A PKC é um regulador da via transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3, do inglês *Signal transducer and activator of transcription 3*) que está diretamente envolvida com o processo inflamatório, por sua vez é um regulador das vias de sinalização da quinase proteica de ativação do mitogénio (MAPK) e da proteína quinase B (AKt ou PKB, do inglês *Protein kinase B*) que modula a expressão do colagénio (Domaszewska-Szostek *et al.*, 2021). Nos queratinócitos, a Q diminui a ativação do NF- κ B induzido pela radiação UV, que resulta na supressão das interleucinas 1 β , 6, 8 (IL-1 β , IL-6, IL-8) e do fator de necrose tumoral (TNF- α , do inglês *Tumor necrosis factor*) (Domaszewska-Szostek *et al.*, 2021).

2.2. Ácidos gordos ômega-3

Os ácidos gordos ômega-3 (ω_3) englobam um grupo heterogéneo de ácidos gordos com uma cadeia hidrocarbonada contendo uma ligação dupla entre o C₃ e C₄ a partir da terminação metilo (Cholewski *et al.*, 2018). Estes ácidos gordos são maioritariamente

polinsaturados (com várias ligações duplas) e a sua atividade biológica deve-se essencialmente aos ácidos DHA e EPA (Huang *et al.*, 2018).

Os ω_3 apresentam um papel muito importante contra inflamações e doenças autoimunes (Januszewski *et al.*, 2023). Os compostos do ω_3 apresentam a capacidade de diminuir a produção de eicosanóides pró-inflamatórios e ainda atuam como modeladores da COX-2, NF-Kb e MAPK/ERK (Huang *et al.*, 2018). A inflamação e o stress oxidativo estão interligadas, sendo que o stress oxidativo pode ativar vias pro-inflamatórias e o processo inflamatório gera stress oxidativo no organismo (Djuricic *et al.*, 2021).

Os ω_3 conseguem modular o processo inflamatório pela competição direta com o ácido araquidônico na incorporação na membrana celular e por competição pelos recetores enzimáticos da COX-2 e 5-lipoxigenase (5-LOX), reduzindo o stress oxidativo celular (Chagas *et al.*, 2022).

Uma vez que a membrana celular apresenta na sua composição ácidos gordos, o seu tipo e o teor influenciam a permeabilidade e a flexibilidade membranar (Djuricic *et al.*, 2021). Neste sentido, os ω_3 , ao competirem pela sua inserção na membrana celular, apresentam um efeito reparador da mesma em oposição à sua permeabilização associada à peroxidação lipídica (Huang *et al.*, 2018). Ao nível cutâneo, este efeito modulador da membrana celular, protege os queratinócitos contra danos químicos, enzimáticos e patogénicos, além de proteger a pele de lesões macerativas. Além disso, os ω_3 promovem a regeneração dos tecidos ao estimular a quimiotaxia e a angiogénese, mantendo um ambiente húmido e próximo da temperatura fisiológica, o que ajuda a regular a perda de água pela pele. Devido a essas propriedades de proteção cutânea, o uso de ω_3 cria um ambiente favorável à cicatrização sem a necessidade de recorrer a pensos ou coberturas passivas comumente usadas em curativos (Ferreira *et al.*, 2012).

Concluindo, neste trabalho, a co-encapsulação destes dois compostos bioativos (Q e ω_3) apresenta-se como proposta para potenciar a atividade antioxidante ao nível cutâneo, uma vez que tem sido reportado o efeito sinérgico antioxidante (Shahparast *et al.*, 2019). Além disso, a Q é quimicamente instável e muito suscetível à oxidação, pelo que a co-encapsulação com ω_3 poderá aumentar a sua estabilidade oxidativa.

Desde o advento da investigação sobre o microbioma intestinal e a sua importância fundamental no aparecimento e evolução de algumas doenças (Vamanu *et al.*, 2020), o microbioma da pele, uma comunidade largamente simbiótica de microrganismos

comensais da pele, tem sido considerado como a próxima fronteira na saúde preventiva da pele, tendo sido estabelecidas ligações pertinentes entre o microbioma e a reparação cutânea ou o envelhecimento da pele (Smythe *et al.*, 2023 ; Byrd *et al.*, 2018). Neste contexto, os compostos antioxidantes naturais, Q e ω_3 , aplicados topicamente na pele são uma estratégia promissora para reduzir o stress oxidativo e melhorar o estado do microbioma da pele, mantendo as qualidades protetoras cutâneas contra agentes hostis externos.

3. Nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas em meados dos anos noventa e, desde então, estes sistemas de veiculação foram motivo de grande investigação dado os benefícios evidentes que apresentam comparativamente a outros sistemas terapêuticos (Nguyen *et al.*, 2022).

O seu primeiro uso está relacionado com a incorporação de fármacos hidrófobos que apresentam baixa solubilidade, instabilidade química, elevada degradação enzimática e dificuldades de libertação e permeação no organismo. As nanopartículas lipídicas vieram proporcionar algumas soluções para estes problemas, fornecendo um veículo no qual o fármaco é protegido da degradação química e enzimática, e que permite melhorar as suas propriedades farmacocinéticas (Nguyen *et al.*, 2022).

Existem dois tipos de nanopartículas lipídicas, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs, do inglês *solid lipid nanoparticles*), também designadas de 1^a geração, e os vetores lipídicos nanoestruturados (NLCs, do inglês *Nanostructured Lipid Carriers*), ou seja, as nanopartículas de 2^a geração (Nguyen *et al.*, 2022). A diferença entre as SLNs e os NLCs encontra-se fundamental na composição da sua matriz lipídica. As SLNs são constituídas por lípidos sólidos às temperaturas ambiente e corporal enquanto que os NLCs são constituídos por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos (óleos) (Nguyen *et al.*, 2022).

As nanopartículas lipídicas estão entre os sistemas de veiculação mais adequadas para a administração tópica devido ao seu tamanho reduzido que proporciona um efeito oclusivo e à composição mimética da barreira natural da pele (Ricci *et al.*, 2005 ; Pardeike *et al.*, 2009). Além disso têm a capacidade de aumentar a permeação epidérmica através da fluidificação da matriz lipídica do estrato córneo sem prejudicar as funções desta barreira cutânea (Roberts *et al.*, 2017). A este respeito, a encapsulação de Q e ω_3 em NLCs tem

sido explorada para aumentar a sua permeação cutânea e melhorar a estabilidade deste composto bioativo (Azizi *et al.*, 2019).

Os NLCs apresentam algumas vantagens comparativamente às SLNs na encapsulação de constituintes insolúveis em água e instáveis, dado que, devido à sua matriz amorfa, apresentam uma maior capacidade de encapsulação (Chaudhari *et al.*, 2021). Os NLC foram selecionadas entre os vários nanossistemas de base lipídica para veiculação dos compostos bioativos selecionados com base na experiência anterior da equipa de orientação no desenvolvimento de formulações tópicas cutâneas para foto-proteção (Caldas *et al.*, 2021b) ou administração de compostos antioxidantes naturais (e.g., resveratrol) (Caldas *et al.*, 2021a). Os NLCs anteriormente desenvolvidos continham na sua composição também ω_3 , apresentando este uma dupla função, nomeadamente como componente oleoso da matriz lipídica dos NLCs e como bioativo com efeitos benéficos para o cuidado da pele (por exemplo, proteção contra o fotoenvelhecimento, qualidades fluidificantes que promovem a permeação e ação oclusiva). No presente estudo, alargámos a experiência da equipa de orientação nestas formulações através da conceção de novos sistemas de veiculação, desenvolvendo hidrogéis (HG) enriquecidos com NLCs (NLC1 ou NLC2- Figura 2) para melhorar a estabilidade Q e/ou ω_3 e para aumentar a permeação cutânea.

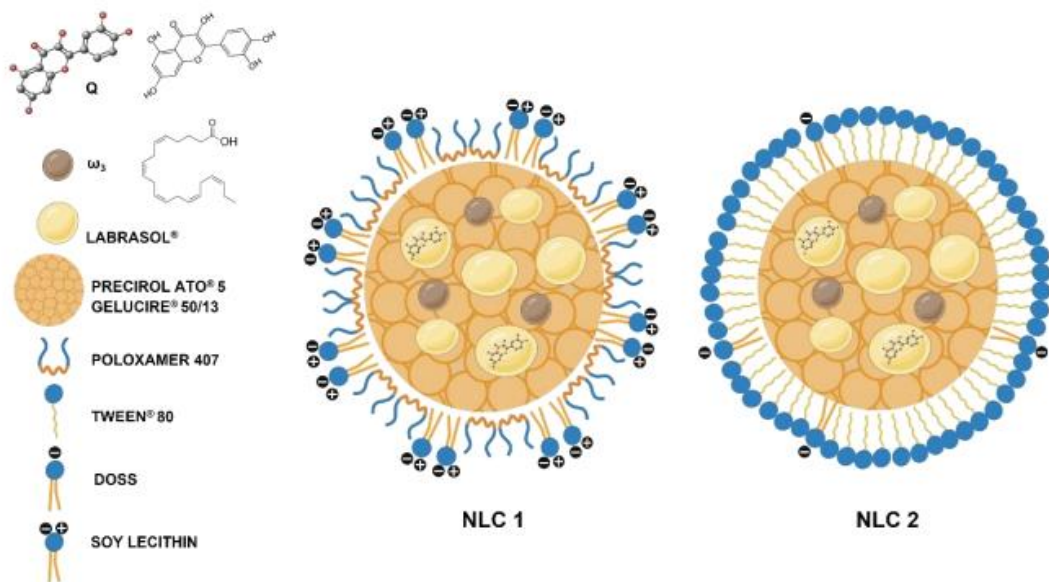


Figura 2: Esquema representativo dos NLCs (Lucio *et al.*, 2023).

III. PARTE EXPERIMENTAL

4. Materiais

A Q ($\geq 95\%$ HPLC), os ω_3 (óleo de peixe de menhaden) e o dioctilsulfossuccinato de sódio (DOSS) foram adquiridos à Sigma Aldrich Co. (St. Louis, EUA). A lecitina de soja (glicerofosfolípidos), o Tween[®] 80, a trietanolamina e a glicerina foram adquiridos à Acofarma[®] (Madrid, Espanha). O ácido cítrico e o fosfato de sódio dibásico di-hidratado foram adquiridos à Sigma Aldrich Co. (St. Louis, EUA). O Precirol ATO[®] 5 (distearato de glicerol), o Gelucire[®] 50/13 (estearoil polioxil-32 glicéridos) e o Labrasol[®] (caprilcaproil polioxil-8-glicéridos) foram doados pela Gattefossé (Saint-Priest Cedex, França). O Poloxamer 407 (também conhecido como Pluronic[®] F127) foi fornecido pela BASF (Ludwigshafen am Rhein, Alemanha). O agente gelificante PFC[®] (Carbopol 2001) foi adquirido à Guinama S.L.U (Valência, Espanha). O metanol ($\geq 99,9\%$), o acetonitrilo (grau de gradiente HPLC) e o ácido acético glacial ($\geq 99,7\%$) foram adquiridos à Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido). O lípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, do inglês *dipalmitoylphosphatidylcholine*) e o colesterol (Chol, do inglês *cholesterol*) foram obtidos da Avanti Polar Lipids, Inc. (Instruchemie, Delfzijl, Países Baixos). Os filtros de ésteres mistos de celulose (tamanho de poro de 0,65 μm) foram adquiridos à Merck Life Science (Algés, Portugal).

Os kits de ensaio de antioxidantes e TBARS (do inglês *Thiobarbituric acid-reactive substance*) da Cayman Chemical foram adquiridos à Bertin Bioreagent (Lisboa, Portugal). O caldo de soja trípico (TSB, do inglês *Trypticase Soy Broth*), o caldo de dextrose Sabouraud (SDB, do inglês *Sabouraud Dextrose Broth*) e o ágar foram adquiridos à Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Itália). O hemocitómetro de Neubauer (Lauda-Königshofen, Alemanha) foi adquirido à Paul Marienfeld GmbH & Co. KG. Todos os reagentes utilizados eram de qualidade analítica ou da mais alta qualidade disponível.

5. Método de preparação dos NLCs

Os NLCs foram preparados por um método de emulsificação por fusão seguido de ultrassons. A fase lipídica foi aquecida num banho de água a uma temperatura 5 - 10 °C acima do ponto de fusão da mistura de lípidos sólidos durante 20 minutos para garantir a solubilização completa da Q na fase lipídica. A fase aquosa foi aquecida à mesma

temperatura, tendo sido adicionada à fase lipídica e homogeneizada sob agitação de alta velocidade (9.000 rpm por 5 minutos) usando um Ultra Turrax[®] T25 (IKA[®], Janke & Kunkel GmbH, Alemanha), seguido de sonicação com uma sonda (Bandelin Electronic UW 2200, Alemanha) aplicando uma amplitude de 40% por um período de 10 minutos.

A nanoemulsão O/A resultante foi imediatamente transferida para frascos de vidro e arrefecida à temperatura ambiente num banho de gelo, para solidificação da matriz lipídica, e produção dos NLCs. Este processo foi repetido em triplicado para duas formulações de NLCs.

6. Caracterização dos NLCs

6.1. Tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta

A técnica de Dispersão de Luz Dinâmica (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) é usada para analisar o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão (PDI, do inglês *Polydispersity Index*), e a carga superficial. Este método é amplamente utilizado para estudar as propriedades de suspensões, soluções coloidais, sistemas biológicos, macromoléculas e polímeros, devido ao seu caráter absoluto, não invasivo e não destrutivo, além de exigir apenas pequenas quantidades de amostra e preparações simples (Aleandri *et al.*, 2018; Arzensek, 2010).

A técnica de DLS baseia-se na incidência de um feixe de laser sobre a amostra, medindo a intensidade da luz dispersa que é captada pelo detetor ao longo do tempo. Dependendo da concentração de partículas, o detetor é posicionado a 173° para amostras menos concentradas e a 90° para amostras mais concentradas. As flutuações na intensidade da luz dispersa são causadas pelos movimentos Brownianos das partículas suspensas, que se deslocam aleatoriamente devido à interação com moléculas do solvente (Arzensek, 2010; Narayanan, 2008). Essas partículas, ao estarem suspensas num meio líquido, são constantemente movidas pelas colisões com as moléculas ao redor.

No contexto do DLS, é importante considerar que partículas menores se movem mais rapidamente, gerando flutuações mais rápidas na intensidade da luz dispersa, devido ao seu elevado coeficiente de difusão. Em contrapartida, partículas maiores movem-se mais lentamente, resultando em flutuações mais lentas na intensidade da luz dispersa. A relação entre o tamanho das partículas e sua velocidade de movimento pode ser descrita pela equação de Stokes-Einstein. O detetor mede as intensidades de luz dispersa por todas as

partículas e, através de um correlador, compara os sinais em intervalos de tempo para calcular a velocidade das flutuações de intensidade, permitindo assim estimar o tamanho das partículas. Algoritmos específicos associam as taxas de decaimento da função de autocorrelação a diferentes classes de tamanho, gerando uma distribuição de tamanhos (Duncan, 2014; Narayanan, 2008 ; Pusey *et al.*, 1994).

Além do tamanho das partículas, o DLS também fornece informações sobre o PDI, que é obtido através de uma análise de cumulantes, baseada no ajuste de dois parâmetros simples para os dados de correlação. Nessa análise, assume-se um único tamanho de partícula e aplica-se um ajuste exponencial à função de autocorrelação. O PDI reflete a largura da distribuição gaussiana de tamanhos assumida, indicando a uniformidade ou dispersão das partículas em suspensão. Um PDI elevado sugere uma população de partículas com tamanhos variados, o que pode indicar agregação, enquanto um PDI baixo sugere uma população mais uniforme. O PDI varia de 0 a 1, sendo que valores inferiores a 0,300 indicam uma dispersão monodispersa, e valores iguais ou superiores a 0,500 apontam para uma dispersão polidispersa (Pusey *et al.*, 1994). A importância de obter uma população de partículas monodispersa depende do objetivo do estudo, da via de administração e dos materiais constituintes dos nanossistemas. Em formulações como os NLCs, valores de PDI iguais ou inferiores a 0,300 são geralmente aceites, especialmente em aplicações tópicas (Das *et al.*, 2011; Pathak *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2003a; Verma *et al.*, 2003b).

Em sistemas aquosos, as partículas adquirem uma carga superficial devido à presença de grupos ionizáveis ou pela adsorção de iões, o que afeta a distribuição de iões ao redor e forma uma camada de contra- iões próximo da superfície da partícula. Esta configuração resulta numa dupla camada elétrica com uma região interna, chamada de camada de Stern, onde os iões estão firmemente aderidos à superfície da partícula, e uma região externa, ou difusa, onde os iões estão mais livres. Através do movimento Browniano, alguns dos iões da camada difusa movem-se juntamente com a partícula, permitindo que o potencial zeta seja determinado pela técnica de eletroforese de luz dinâmica (ELS, do inglês *Electrophoretic Light Scattering*), que mede a mobilidade eletroforética das partículas (Das *et al.*, 2011 ;Instruments, 2004).

O potencial zeta é um parâmetro crucial para caracterizar nanossistemas lipídicos, pois a sua magnitude indica a carga superficial das partículas e a estabilidade do sistema. Partículas com valores elevados de potencial zeta, seja positivo ou negativo, tendem a

repelir-se eletrostaticamente, reduzindo a probabilidade de agregação. Por outro lado, partículas com valores baixos de potencial zeta têm maior probabilidade de se agregarem devido à predominância das forças de atração. Em geral, dispersões com potenciais zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são consideradas estáveis (Instruments, 2004).

As técnicas de DLS e ELS foram utilizadas para caracterizar as formulações de NLCs em termos de tamanho médio das partículas, PDI e potencial zeta utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern[®], Reino Unido). Para evitar o efeito de dispersão múltipla causado por uma concentração elevada de partículas, os NLCs foram diluídos com água purificada (v:v) (1:400 e 1:200 para os NLC1 e 1:200 e 1:25 para os NLC2), obtendo-se a intensidade de dispersão adequada (ou seja, uma taxa de contagem de 250-500 e atenuação mínima).

No dia da preparação (T1), todas as experiências foram efetuadas a uma temperatura controlada de 25 ± 1 °C. Após a análise de cumulantes, o tamanho e o PDI foram calculados a partir do correlograma, utilizando o software Zetasizer Nano ZS (Malvern[®], Reino Unido) e a norma ISO 22412:2008. O potencial zeta foi calculado através da conversão da mobilidade electroforética utilizando o método Helmholtz-von Smoluchowski. A caracterização acima referida foi também efetuada durante quatro semanas (de T1 a T4) para avaliar a estabilidade coloidal dos NLCs em condições de armazenamento (a uma temperatura de 4 °C).

6.2. Análise por calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) é uma técnica de análise térmica que regista o fluxo de energia calorífica associado a transições nos materiais em função da temperatura. É um método de avaliação da variação entálpica, no qual a diferença no fornecimento de energia calorífica entre um material a analisar e um material de referência é medida em função da temperatura, enquanto o material em estudo e a referência são submetidas a um mesmo programa de aquecimento, ou arrefecimento, rigorosamente controlado.

Para uma melhor compreensão da técnica de DSC é interessante obter algumas informações a respeito do funcionamento do equipamento. Todos os calorímetros DSC

têm em comum várias características. A mais importante, e motivo pelo qual são designados por calorímetros diferenciais de varrimento, está relacionada com o facto de as medições térmicas serem feitas de modo diferencial e contínuo entre duas células.

Nos calorímetros diferenciais de varrimento em que é feita a compensação de potência, as células ou plataformas onde se colocam o material a analisar e a referência encontram-se equipadas individualmente com um sensor de resistência, que mede as temperaturas da amostra (TA) e da referência (TR), e uma resistência de aquecimento. Ambas as temperaturas aumentam de forma linear no ciclo de aquecimento e são constantemente comparadas ($\Delta T = TA - TR$), verificando-se que ΔT é constante e nula (a não ser que ocorra uma transição de fase).

Quando um dos componentes do material a analisar sofre uma transição de fase, a temperatura deste permanece constante enquanto a temperatura da referência continua a aumentar. É então detetada uma diferença de temperatura entre a amostra e a referência e é adicionada energia térmica a uma das células de modo a manter um diferencial de temperaturas nulo entre ambas ($TA = TR$) (Hatakeyama T, 1999; Höhne *et al.*, 1996). Uma vez que essa quantidade de energia é exatamente equivalente à quantidade de energia absorvida ou libertada na transformação ocorrida no material a analisar, o seu registo fornece uma medida calorimétrica direta da energia associada à transformação apresentada no computador analisador sob a forma de um pico sobre uma linha de base. Ao completar a transição de fase, ocorre um fluxo de calor entre a base metálica e a amostra tal que o estado de equilíbrio é reassumido e ΔT volta a um valor constante (Blazek, 1973; Collings *et al.*, 1997). Concluindo, a técnica de DSC é um método que mede a energia absorvida ou libertada por um material durante a transição de fase (Collings *et al.*, 1997).

A técnica de DSC foi efetuada utilizando um NEXTADSC 600[®] (HITACHI, Ibaraki, Japão) equipado com um trocador de amostras automático para investigar a compatibilidade físico-química dos componentes que entram na composição dos NLCs e o comportamento de fusão e cristalização das dispersões lipídicas. Os componentes isolados, as misturas de lípidos e a Q, com peso entre 8 e 12 mg, foram colocados em cadinhos de alumínio selados com tampa perfurada. Como referência, foi utilizado um cadinho vazio selado. Os termogramas foram obtidos sob uma corrente de azoto (20 mL/min). Para os componentes isolados e misturas lipídicas com Q, o programa térmico contemplou um arrefecimento até 0 °C (a uma taxa de 30 °C/min), seguido de um período

isotérmico de 5 minutos e subsequente aquecimento de 0 a 200 °C (a uma taxa de 5 °C/min). Os dados foram obtidos utilizando o software NEXTA Standard Analysis (versão 2.7).

6.3. Eficiência de encapsulação e capacidade de carga

Uma formulação de nanossistemas lipídicos contendo um fármaco ou composto bioativo encapsulado só será viável para uso clínico se a sua eficiência de encapsulação (EE(%)) permitir que doses terapêuticas sejam administradas com uma quantidade aceitável de fármaco. Além disso, uma elevada capacidade de carga (DL(%)) possibilita reduzir a quantidade de fármaco/bioativo necessária para atingir o efeito terapêutico, diminuindo os efeitos adversos e o número de administrações. Desta forma, o sucesso das formulações de NLCs desenvolvidos como sistemas de veiculação depende diretamente da EE% e DL%. A EE(%) e a DL(%) foram determinadas indiretamente, doseando a quantidade de Q não encapsulada presente na fase aquosa dos NLCs, aplicando as seguintes equações:

$$EE(\%) = \frac{[Q]_{Total} - [Q]_{Livre}}{[Q]_{Total}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$DL(\%) = \frac{[Q]_{Total} - [Q]_{Livre}}{[Lipido]_{Total}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Um volume de 500 µL de NLCs contendo Q (ou seja, NLC1 + Q, NLC1 + Q + ω₃, NLC2 + Q e NLC2 + Q + ω₃) foi transferido para dispositivos de filtração centrífuga Ultracel 100K (Amicon® Ultra, Millipore Corporation, EUA). Estes dispositivos de filtração foram centrifugados (centrifugadora Labofuge 400, Thermo Scientific Heraeus®, Cacém, Portugal) a 3000 rpm durante 30 minutos. A quantidade de Q livre na fase sobrenadante aquosa foi determinada por um método validado de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, do inglês *High performance liquid chromatography*), desenvolvido com base nos métodos estudados por (Ang *et al.*, 2014) e (Vijayakumar *et al.*, 2017). Para a quantificação da Q foi utilizado um HPLC (HP Agilent 1100 HPLC System, Agilent Technologies (Alemanha)) equipado com um detetor UV-VIS e utilizando uma coluna imChem (França) Surf C18 (tamanho de partícula de 5 µm; 150 × 4,6 mm i.d.). A cromatografia foi efetuada com um caudal de 1 mL/min com eluição isocrática (fase

móvel constituída por acetonitrilo e ácido acético a 2% v/v (pH 2,60) (40%: 60% v/v)). Todas as análises foram efetuadas a um comprimento de onda de 370 nm e com um volume de injeção de 20 μ L.

7. Método de preparação do hidrogel enriquecido com NLCs

A inclusão de NLCs em bases semissólidas, tais como os HGs, parece ser um método que permite obter bons resultados para a administração tópica, dada a baixa viscosidade da dispersão aquosa de nanopartículas lipídicas (Lucio *et al.*, 2023). Os NLCs foram usados diretamente para dispersar o agente gelificante, PFC[®] 0,5% (m/m) num almofariz de porcelana, e o pH foi neutralizado com a adição de trietanolamina até se formar o hidrogel (\approx pH 6,5). Foi também adicionado um agente humectante (glicerina 2,5%, m/m) à preparação antes de equilibrar o HG durante 24 horas no frigorífico (4°C).

8. Avaliação dos HGs enriquecidos com NLCs

8.1. Ensaio de libertação da Q

A libertação de Q *in vitro* a partir dos NLCs foi medida pelo método de difusão por membrana de diálise (Float-A-Lyzer[®], 3,5 kD, VWR). O meio de libertação era constituído por 65% de solução tampão pH 5,6 (preparadas com ácido cítrico 0,1 M e fosfato de sódio dibásico di-hidratado 0,2 M) e 35% de etanol absoluto, mimetizando o pH da pele e assegurando as condições para a dissolução da Q. No procedimento laboratorial foi pesado aproximadamente 1,0 g de HGs enriquecidos com NLC1 + Q, NLC1 + Q + ω_3 , NLC2 + Q e NLC2 + Q + ω_3 para membranas de diálise, as quais foram posteriormente imersas em 20 mL de meio de libertação. O sistema foi mantido à temperatura mimética da superfície da pele de 32 ± 3 °C, utilizando um banho-maria com agitação SW22 (Julabo GmbH, Seelbach Alemanha) a uma velocidade de 100 rpm. Foram retiradas alíquotas de 1,0 mL do meio de libertação e substituídas por meio de libertação fresco a intervalos predeterminados até às 24 horas. Estas alíquotas foram diluídas com metanol (diluição 1:1) e a Q foi quantificada pelo método de HPLC validado previamente descrito.

8.2. Ensaio de avaliação da permeação cutânea da Q

O ensaio da permeabilidade por difusão *in vitro* da Q foi realizado a partir dos HGs enriquecidos com NLC1 + Q, NLC1 + Q + ω_3 , NLC2 + Q e NLC2 + Q + ω_3 . Os ensaios de permeação foram efetuados em células de difusão de Franz (V-Series Stirrers for Franz Cells; PermeGear, EUA) e entre o compartimento dador (onde foram colocados os HGs) e o compartimento recetor (no qual se doseou a Q que sofreu difusão) foi colocada uma membrana mimética da matriz lipídica do estrato córneo, uma vez que esta representa uma das principais barreiras à permeação cutânea.

Para a preparação da membrana mimética da matriz lipídica do estrato córneo, os lípidos componentes desta matriz, DPPC:Chol (2:1), foram dissolvidos em clorofórmio num tubo de vidro de fundo redondo e o solvente orgânico foi evaporado sob uma corrente de azoto, resultando numa película lipídica fina e seca nas paredes do fundo do tubo. A película lipídica foi hidratada com uma mistura de água/etanol (10%, v/v) e a suspensão resultante foi submetida a 5 ciclos de agitação em vórtex e aquecimento a uma temperatura de 60 °C, com o objetivo de formar vesículas multilamelares. Subsequentemente, as vesículas multilamelares foram depositadas em filtros mistos de celulose (tamanho de poro de 0,65 μm) através da técnica de revestimento por rotação (do inglês *spin-coating*) a uma velocidade de 0,3 rpm, seguida de ciclos de congelação-descongelação em azoto líquido.

As membranas miméticas da matriz lipídica do estrato córneo, com uma área de difusão de 0,64 cm², foram montadas nas células de difusão de Franz, entre o compartimento dador e o compartimento recetor (contendo 5 mL de solução tampão 65% pH 5,6 e 35% de etanol absoluto). A membrana foi aclimatizada a uma temperatura de 32 ± 3 °C durante 0,5 horas antes da adição dos HGs enriquecidos ao compartimento dador e a temperatura foi mantida durante todo o ensaio utilizando um banho de água em circulação. O meio recetor foi continuamente agitado durante 12 horas e as alíquotas deste meio foram recolhidas a intervalos de 1 hora e substituídas pelo mesmo volume de meio fresco.

A concentração de Q no compartimento recetor foi determinada utilizando o método validado de HPLC descrito anteriormente.

8.3. Avaliação do efeito oclusivo

A oclusão da pele ocorre através da formação de um filme sobre o estrato córneo, seja pela aplicação de excipientes emolientes, como óleos e vaselina, ou pela deposição de

partículas de pequeno tamanho, como as nanopartículas (Wissing *et al.*, 2001). Esse filme reduz a perda de água transepidérmica, desempenhando um papel essencial na hidratação cutânea. O aumento do teor de água na pele também pode facilitar a difusão de compostos bioativos através do estrato córneo, uma vez que a água retida na camada lipídica hidrata os grupos polares das membranas, tornando-as mais permeáveis.

Os ensaios de oclusão realizados visam, portanto, avaliar se as nanoformulações desenvolvidas proporcionam uma boa oclusividade cutânea, efeito especialmente importante para tentar compreender se a formulação aumenta a permeação cutânea (Hafeez *et al.*, 2013).

Para realizar este ensaio foram usados recipientes de vidro contendo uma massa exata de água (50 g) cobertos com um filtro de microfibras de celulose Whatman® (tamanho de poro de 0,6 a 0,8 µm) e, posteriormente, selados com parafilme. Quantidades equivalentes de HGs enriquecidos com NLCs foram distribuídas uniformemente sobre a superfície do filtro. Um recipiente usado como controlo continha apenas água e o filtro Whatman®.

Os recipientes foram mantidos numa estufa durante 24 horas a uma temperatura de 32 ± 3 °C. Durante este período de tempo, os recipientes foram pesados em balança com precisão analítica a vários intervalos de tempo para determinar a perda de massa de água, e calcular a taxa de transmissão de vapor de água (WVTR, do inglês *water vapor transmission rate*) expressa em $g \cdot m^{-2} \cdot dia^{-1}$, através da seguinte equação:

$$WVTR = \frac{w_i - w_f}{t \times A} \text{ Equação 2}$$

na qual, o t representa o período de 24 horas, o A é a área de ensaio da amostra (m^2), o parâmetro w_i é a massa inicial do recipiente e o w_f representa a massa final do recipiente.

O efeito oclusivo (%) de cada HG enriquecido com NLCs foi calculado pela aplicação da Equação 4:

$$\text{Efeito oclusivo (\%)} = \frac{WVTR_{HG} - WVTR_{NLC-HGs}}{WVTR_{HG}} \times 100 \text{ Equação 4}$$

na qual, o $WVTR_{HG}$ é a taxa de transmissão de vapor de água do hidrogel placebo (i.e., sem incorporação dos NLCs) e o parâmetro $WVTR_{NLC-HGs}$ representa a taxa de transmissão de vapor de água do hidrogel enriquecido com NLCs. Um efeito oclusivo de

0% indica que não existe efeito oclusivo e um efeito oclusivo de 100% significa que o efeito oclusivo foi máximo.

8.4. Estudo do comportamento reológico

O estudo das propriedades de escoamento, fluidez e deformação dos materiais permite estabelecer o seu comportamento reológico (Lahoud *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2009). Os princípios fundamentais da reologia envolvem o comportamento do escoamento, o qual é caracterizado pela viscosidade, elasticidade e plasticidade de preparações líquidas, sólidas e semissólidas, quando submetidas a deformações físicas (Lee *et al.*, 2009). Importa realçar que a viscosidade representa a medida da resistência interna de um material ao escoamento quando exposto a uma determinada tensão. Dessa forma, a relação entre a viscosidade e a tensão de corte é crucial, pois revela o tipo de comportamento reológico, que pode ser classificado, dependendo da forma da curva obtida num reograma, como newtoniano (apresenta uma relação linear entre a tensão de corte e a taxa de deformação) ou não newtoniano (i.e., a relação não é linear).

Num reograma, a diferença entre as curvas ascendente e descendente é designada de tixotropia. Este comportamento ocorre quando uma preparação é submetida a uma tensão de corte, resultando na rutura da sua estrutura e na redução gradual da viscosidade, o que facilita a aplicação e o espalhamento da preparação na pele. Após a remoção da tensão de corte, a viscosidade retorna lentamente, aumentando, o que facilita a permanência da preparação sobre a pele. Desta forma, a análise do comportamento reológico da preparação revela-se importante, pois permite avaliar e otimizar o comportamento *in vivo* quando se pretende uma aplicação tópica, além de ser um fator chave no desenvolvimento, caracterização físico-química e controlo de qualidade das formulações dermatológicas. A reologia desempenha um papel fundamental nas propriedades galénicas, sendo especialmente útil para garantir que preparações tópicas apresentem boas características de espalhamento e aderência cutânea. Em geral, as formulações dermocosméticas apresentam um comportamento pseudoplástico (ou seja, ocorre diminuição da viscosidade com o aumento da tensão) (Corrêa *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009), o que favorece as propriedades referidas anteriormente.

Neste trabalho, a análise do comportamento reológico dos HGs enriquecidos com os NLCs foi realizada no reómetro Kinexus PRO+ (Malvern[®], Reino Unido), utilizando uma

geometria (i.e., forma da peça que se coloca a amostra e aplica a tensão) de placa cônica com 40 mm de diâmetro. Todos os testes foram efetuados a uma temperatura controlada de 20 °C. Foi analisada a variação da tensão de corte (Pa) em função da velocidade de corte (s^{-1}).

8.5. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante da Q e dos ω_3

Como referido previamente, está reportado na literatura que a Q apresenta uma elevada capacidade antioxidante. Com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante das formulações de NLCs foram utilizados dois métodos *in vitro*, o método ABTS, o qual mede a capacidade antioxidante através da captação de radicais livres, e o método da prevenção da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), subprodutos da peroxidação lipídica (e.g. concentração de malondialdeído (MDA)). Para esta avaliação foram utilizados kits comerciais da Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, EUA), e foram seguidos os protocolos descritos pelo fabricante.

O método ABTS mede a capacidade de neutralizar radicais livres de 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico ($ABTS^{\bullet+}$) (Figura 3). Neste método, a quantidade de $ABTS^{\bullet+}$ produzida foi quantificada pela leitura da absorbância num comprimento de onda de 734 nm num leitor de microplacas (Synergy H1M2, BioTek, Agilent Technologies, CA, EUA), sendo que a atividade antioxidante de cada formulação foi proporcional à redução da absorbância (Miller *et al.*, 1993 ; Miller *et al.*, 1997; Rice-Evans *et al.*, 1994). O efeito de neutralização de radicações livres de cada formulação de NLCs foi comparado ao efeito produzido pelo Trolox, um análogo solúvel em água do α -tocoferol. Para isso, uma curva de calibração foi traçada a partir das absorbâncias das soluções padrões de Trolox (0 a 0,495 mM) a 734 nm, e a concentração antioxidante (mM) de cada formulação foi obtida pela regressão linear da curva de calibração.

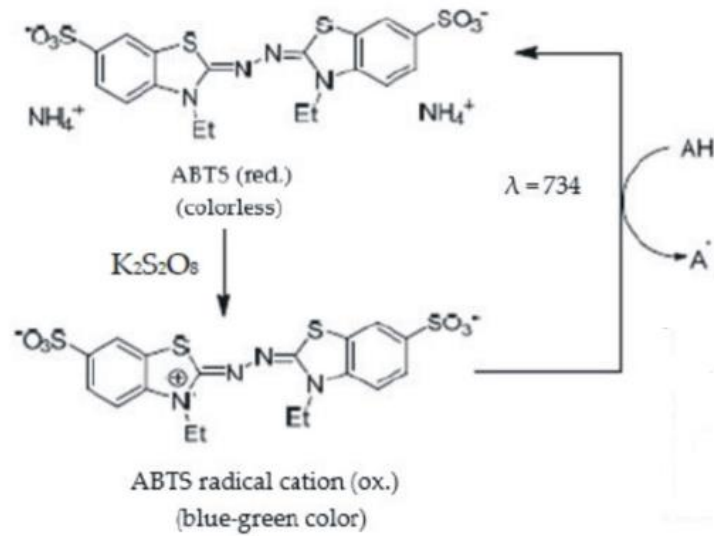


Figura 3: Reação do ABTS com compostos antioxidantes (Munteanu *et al.*, 2021)

O ABTS é uma molécula incolor que na presença de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) sofre oxidação, originando um radical livre catiónico, o ABTS^{•+}. Esta espécie química é um cromóforo azul-esverdeado, apresentando um espectro de absorção característico, com vários picos máximos, sendo um deles a 734 nm.

No ensaio de TBARS, o MDA, um produto natural resultante da peroxidação lipídica, quando submetidos a uma temperatura elevada e em condições ácidas, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA, do inglês *Thiobarbituric acid*) para formar um aducto MDA-TBA, que foi medido colorimetricamente a um comprimento de onda de 540 nm (Armstrong *et al.*, 1994 ; Yagi, 1998). Para isso, uma curva de calibração foi traçada a partir das absorbâncias dos padrões colorimétricos de MDA (0 a 50 µM) a 540 nm, e a concentração de MDA (µM) produzida pela peroxidação de cada formulação de NLCs foi obtida pela regressão linear da curva de calibração padrão.

8.6. Avaliação qualitativa do efeito foto-protetor

O efeito de foto-proteção dos HGs enriquecidos com os NLC2 foi avaliado qualitativamente utilizando um papel sensível às radiações UV (Nature Print Paper, EUA). Em resumo, uma pequena quantidade de HGs foi uniformemente espalhada no centro de uma lâmina, a qual foi posteriormente posicionada sobre o papel. Este papel reativo está impregnado com hexacianferrato (III) de ferro (III) ou Fe[Fe(CN)₆], também conhecido como verde Berlim, que sofre uma transformação fotoquímica quando submetidos à exposição da radiação UV para hexacianoferrato (II) de ferro (II)

$Fe[Fe_4(CN)_6]_3$, composto conhecido como azul da Prússia, o qual é insolúvel em água. Nesta avaliação, os HGs enriquecidos com NLCs foram irradiadas com luz UV (lâmpada fluorescente de UV com uma radiância espectral de $98,5 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ na região UVA, ou seja, de 320 nm a 400 nm) (Techinstro Industries, Nagpur, Índia) durante 3 minutos. Posteriormente, o papel foi lavado com água. No caso de proteção contra as radiações UV, o produto químico solúvel em água é removido, resultando no branqueamento do papel. Pelo contrário, o complexo insolúvel formado pela ação da radiação UV permanece fixo no papel, deixando-o azul.

8.7. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos HGs enriquecidos com os NLCs foi testada contra três microrganismos diferentes: uma espécie fúngica, *Candida albicans* (SC 5314, um isolado clínico pertencente à coleção do Grupo de Biofilmes do CEB), e duas bactérias, uma gram-positiva, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, um isolado clínico pertencente à mesma coleção), e uma gram-negativa, *Escherichia coli* (CECT 434, também isolado clínico da coleção do CEB Biofilm Group).

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* e *Candida albicans* foram cultivadas em meio líquido, inoculando uma colônia única em 30 mL de TSB para as bactérias e SDB para a levedura. Os microrganismos foram incubados por 18 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 120 rpm. Após a incubação, a suspensão celular resultante foi ajustada para uma densidade ótica (DO) abaixo de 1,0 a 620 nm para as bactérias, sendo diluída adequadamente em TSB para atingir 1×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC)·mL⁻¹. Para a *Candida albicans*, a densidade celular foi ajustada para 1×10^8 células·mL⁻¹, utilizando um hemocítmetro de Neubauer.

Para a incubação dos microrganismos no ágar, uma alíquota de 100 µL da suspensão celular foi espalhada em placas de petri contendo TSA ou SDA, respetivamente, para bactérias e leveduras. Discos em branco impregnados com HGs enriquecidos com NLCs foram colocados sobre o ágar e incubados por um período de 24 horas a uma temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o tempo de incubação, as placas de ágar foram deixadas à temperatura ambiente por mais uma semana. Ao final do período de incubação, o halo de inibição ou redução bacteriana formado à volta das amostras foi fotografado para registo dos resultados (imagens capturadas com o software Image Lab™ 6.1) e o diâmetro do halo

foi medido com o software ImageJ 1.53 t. Todas as análises foram repetidas em, pelo menos, três ensaios independentes.

9. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada utilizando o software GraphPad Prism[®] versão 5.0. Utilizou-se o teste de ANOVA para testar a significância estatística. O teste de Tukey foi aplicado para explorar comparações múltiplas. A significância estatística foi considerada para um valor de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

10. Caracterização dos NLCs

Uma vez que os NLCs desenvolvidos são para serem administrados topicamente, as suas propriedades físicas, tais como o tamanho e a carga superficial das partículas, devem ser analisadas, uma vez que podem influenciar a sua penetração na pele. Além disso, a qualidade das formulações produzidas deve ser avaliada em termos da sua estabilidade coloidal em condições de conservação.

Na Figura 4 estão representados os resultados da caracterização físico-química dos NLCs produzidos ao longo de 4 semanas de armazenamento. Pela análise da Figura 4 e pela análise estatística é possível concluir que as propriedades físico-químicas dos NLCs placebo (NLCs sem compostos bioativos) não apresentam diferenças estatisticamente significativas dos NLCs contendo Q e/ou ω_3 . Assim se depreende que a encapsulação dos compostos bioativos não afeta o empacotamento lipídico original dos NLCs, mantendo as suas propriedades em termos de tamanho e de PDI (Figura 4 A, B). Além disso, a carga superficial do placebo das NLCs também não é consideravelmente alterada quando os compostos bioativos são adicionados, uma vez que o valor de potencial zeta não apresenta alterações significativas, indicando que estes são incorporados no núcleo dos NLCs e não afetam a região interfacial (Figura 4 C, D).

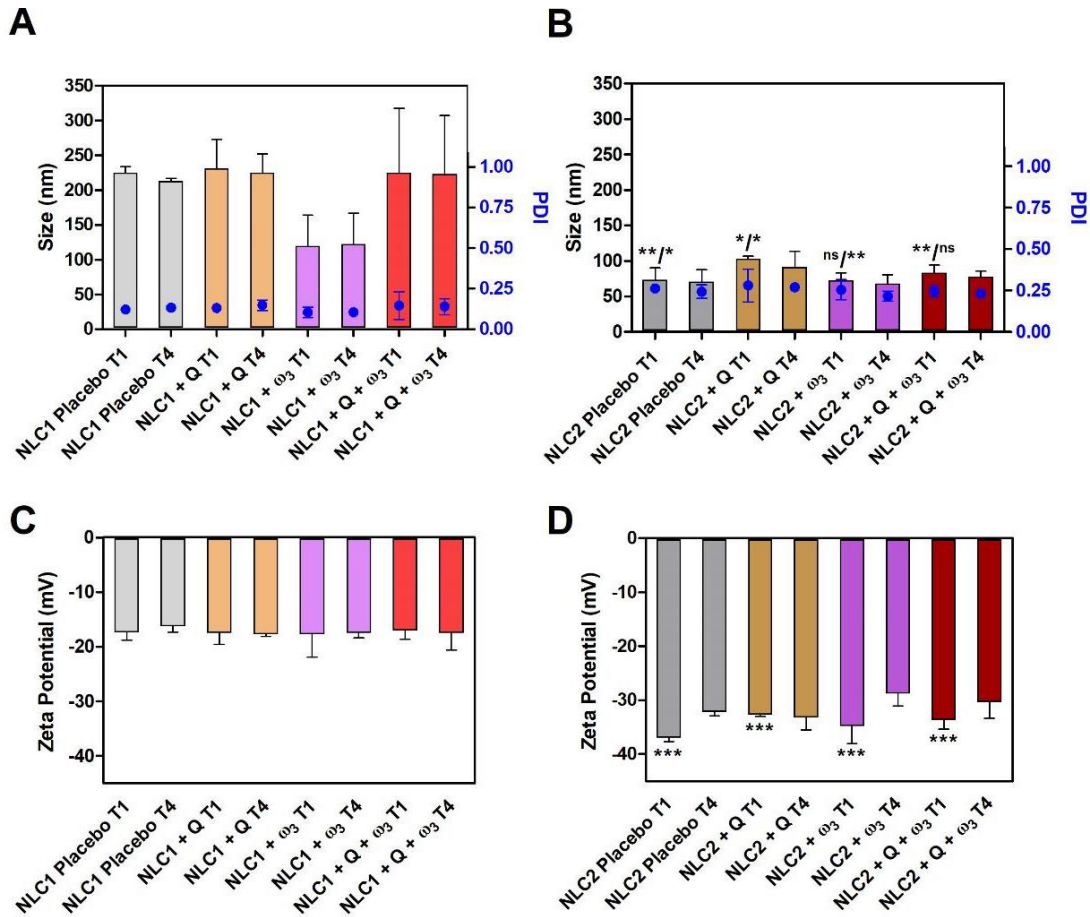


Figura 4: Resultados da caracterização físico-química das formulações de NLCs (Lucio *et al.*, 2023).

Caracterização da estabilidade dos NLC1 (A, C) e NLC2 (B, D) durante o armazenamento a 4 C. Os dados representam a média e o desvio padrão de 3 medições. As medições de tamanho (barras), PDI (pontos) (A, B) e carga de superfície (Potencial Zeta (mV)) (C, D) são do dia da preparação (T1) e após 4 semanas (T4). As comparações foram efetuadas utilizando o teste ANOVA e o teste de comparação múltipla de Tukey para as seguintes observações emparelhadas (tamanho/PDI em (B) e potencial Zeta em (D)): NLC1 Placebo T1 vs. NLC2 Placebo T1; NLC1 + Q T1 vs. NLC2 + Q T1; NLC1 + ω₃ vs. NLC2 + ω₃ T1; NLC1 + Q + ω₃ T1 vs. NLC2 + Q + ω₃ T1. ns-sem significância estatística; *** p-valor < 0,001; ** p-valor < 0,01; * p-valor < 0,05. Não foi encontrada significância estatística quando T1 e T4 foram comparados dentro de cada formulação de NLC; no entanto, neste caso, para maior clareza, ns não foi apresentado na figura.

Contudo, com exceção dos NLCs + ω₃ (quando o tamanho é comparado) ou os NLCs + Q + ω₃ (quando o PDI é comparado), a composição em termos de tensioativos apresenta impacto nas propriedades físicas dos NLCs. Os NLC2 são significativamente mais pequenos, mas apresentam valores de PDI significativamente mais elevados e uma carga superficial mais negativa quando comparadas com os seus homólogos NLC1.

Os NLC2 apresentam um tamanho de partícula mais adequado para a administração tópica, o qual idealmente deve estar compreendida entre os 100 e os 200 nm (Benson *et al.*, 2016 ;Lopes *et al.*, 2018). O tamanho reduzido destes NLC2 torna a sua penetração no estrato córneo mais fácil. Está reportado que os nanossistemas lipídicos com

dimensões compreendidos entre os 20 e os 200 nm apresentam um maior potencial para se acumularem nas irregularidades da pele (e.g. poros e folículos), facilitando uma interação mais estreita entre os bioativos e a pele (Zhao *et al.*, 2010).

Para além do tamanho, a presença de componentes que perturbam o empacotamento lipídico (por exemplo, ω_3) pode conferir maior flexibilidade e maleabilidade ao sistema de veiculação, aumentando a sua capacidade de permear a pele com maior eficácia (Caldas *et al.*, 2021a).

A estabilidade coloidal é parâmetro importante quando os compostos encapsulados, como Q e ω_3 , são propensos à oxidação, uma vez que ajuda a atenuar as interações com ROS presentes na interface ou na fase aquosa circundante. A estabilidade coloidal dos NLCs em condições de armazenamento foi avaliada para comparar as propriedades físico-químicas desde o dia de produção, T1, até 4 semanas, T4 (Figura 4), e não foram observadas alterações significativas para ambas as formulações de NLCs. Os NLC2 podem ter uma estabilidade mais longa, uma vez que, entre outros fatores que contribuem para a estabilidade coloidal das nanopartículas, os valores do potencial zeta iguais ou superiores a $|30|$ mV apresentam repulsão eletrostática e uma menor propensão para se agregarem (Xu, 2002).

Durante o desenvolvimento dos NLCs, os estudos de DSC são frequentemente utilizados para avaliar o comportamento térmico da fase lipídica. Um dos pré-requisitos para a sua produção é que a mistura de lípidos sólidos e líquidos deve ser sólida à temperatura corporal e à temperatura ambiente. Os termogramas dos óleos (ω_3 e Labrasol[®]), dos lípidos sólidos (Precirol ATO[®] 5 e Gelucire[®] 50/13), e a Q (composto isolado e na mistura lipídica fundida) estão representados na Figura 5.

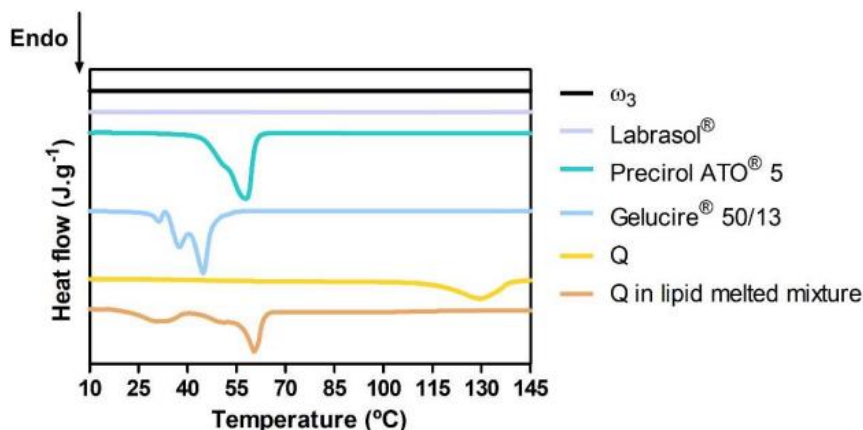


Figura 5: Resultado dos termogramas dos componentes lipídicos dos NLCs, da quercetina isolada e da quercetina na mistura lipídica fundida (Lucio *et al.*, 2023).

O ω_3 e o Labrasol[®] não sofreram qualquer evento térmico, uma vez estes componentes são óleos à temperatura ambiente, e não se degradam a temperaturas inferiores a 145 °C. No caso do Precirol[®], o seu pico de fusão ocorreu a uma temperatura de 56,9 °C e apresenta um evento térmico a 52,0 °C. Esses dois eventos térmicos foram anteriormente reportados na literatura e são causados pela presença de diferentes formas polimórficas encontradas em combinações complexas de glicerídeos, como é o caso do Precirol[®] ATO5 (Teixeira *et al.*, 2022). O outro lípido sólido (Gelucire[®] 50/13) é uma mistura cristalina e amorfa de glicerídeos, como demonstrado pelos vários eventos térmicos visíveis no seu termograma (Panigrahi *et al.*, 2018). O termograma da Q isolada apresenta um pico endotérmico a 129,2 °C, possivelmente relacionado com a sua transição termoquímica, envolvendo um relaxamento estrutural e decomposição (Tsiptsias *et al.*, 2022). Eventos endotérmicos idênticos de cada componente lipídico sólido individual podem ser identificados no termograma da Q na mistura lipídica fundida (que simula a fase lipídica dos NLCs), mas os picos endotérmicos são mais largos. Estas alterações resultam principalmente das interações entre os lípidos sólidos e os óleos durante o processo de fusão, originando uma matriz lipídica menos ordenada, o que se torna vantajoso para a encapsulação de maiores quantidades de bioativos (Kumbhar *et al.*, 2013 ; Tran *et al.*, 2014). A ausência do pico endotérmico Q no termograma da mistura lipídica fundida sugere uma possível dissolução de Q na fase lipídica dos NLCs.

A EE(%) da Q nos NLC1 e NLC2 (com e sem ω_3) foi superior a 99,0%. Considerando a solubilidade aquosa máxima da Q (2.150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 25 °C) (Tran *et al.*, 2014); (Kumbhar *et al.*, 2013), os NLCs foram capazes de encapsular 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Q, superando em 233

vezes o desempenho de Q disperso num meio aquoso. Os DL(%) da Q nos NLC1 e NLC2 (com e sem ω_3) foram respetivamente 0,62% e 0,43%.

11. Avaliação dos HGs enriquecidos com NLCs

Alguns critérios são frequentemente utilizados para prever *in vitro* o potencial farmacêutico e terapêutico de preparações cutâneas tópicas. O primeiro critério a ser estudado foi o perfil de libertação da Q num meio que mimetiza as condições da pele, ou seja, pH 5,6 e uma temperatura de 32 °C (Fluhr *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2019). Os perfis de libertação da Q libertada a partir dos HGs enriquecidos com os NLCs são apresentados na Figura 6.

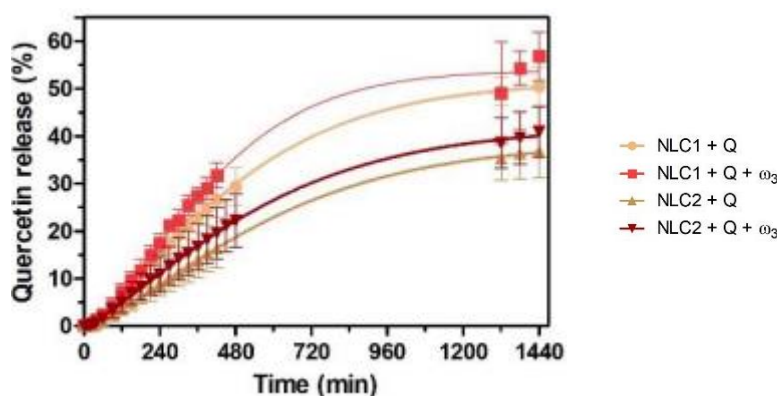


Figura 6: Perfil de libertação da Q a partir dos HGs enriquecidos com NLCs ao longo do tempo (Lucio *et al.*, 2023).

Os NLCs libertaram a Q de forma sustentada, atingindo um máximo de $53,8 \pm 0,9\%$ às 24 horas no caso dos NLC1 + Q + ω_3 . As velocidades de libertação da Q a partir dos NLC2 foram mais baixas do que as obtidas para os NLC1, apresentando libertações cumulativas às 24 horas de $38,4 \pm 0,4\%$ e $41,9 \pm 0,5\%$ para os NLC2 + Q e NLC2 + Q + ω_3 , respetivamente.

Os perfis de permeação *in vitro* da Q a partir dos HGs enriquecidos com os NLCs, através de uma membrana lipídica mimética do estrato córneo estão representados na Figura 7.

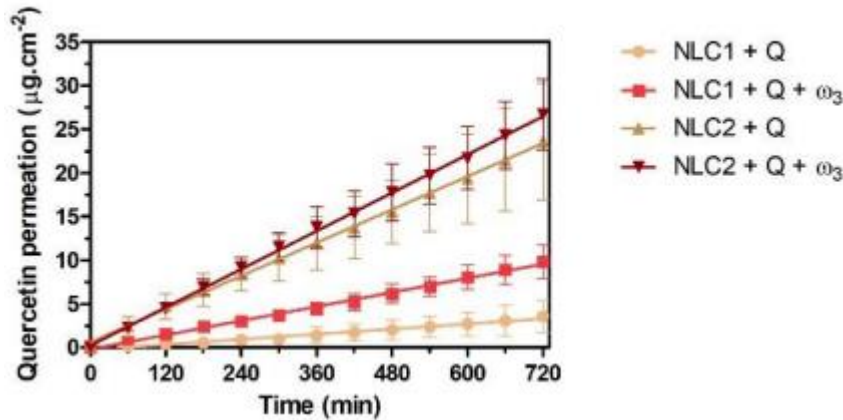


Figura 7: Perfis de permeação in vitro da Q a partir dos HGs enriquecidos com NLCs (Lucio *et al.*, 23).02

A partir da zona linear inicial dos perfis de permeação é possível calcular o fluxo de difusão da Q através da membrana segundo a primeira lei de Fick da difusão (Equação 5):

$$J_{SS} = \frac{Q_R}{A \times t} \quad \text{Equação 5}$$

na qual t representa o tempo de permeação, $A(\text{cm}^2)$ é a área de permeação e o parâmetro Q_R (μg) é a quantidade de fármaco que permeou a célula.

Os HGs enriquecidos com os NLCs promoveram a permeação da Q na seguinte ordem: NLC2 + Q + ω_3 ($J_{SS} = 2,2180 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) > NLC2 + Q ($J_{SS} = 1,9720 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) > NLC1 + Q + ω_3 ($J_{SS} = 0,7906 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) > NLC1 + Q ($J_{SS} = 0,2657 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$). Estes resultados confirmam que partículas esféricas com diâmetros inferiores a 100 nm possuem maior permeabilidade e demonstram o papel de ω_3 como perturbador do empacotamento lipídico quando presente na composição dos NLCs, conferindo deformabilidade à matriz lipídica e, assim, aumentando a permeabilidade (Caldas *et al.*, 2021a).

Apesar dos resultados de permeação serem promissores em termos de desenvolvimento de uma formulação cutânea para a administração da Q, este estudo tem uma limitação que deve ser considerada ao interpretar os resultados obtidos. Uma comparação direta da permeação da Q a partir dos HGs enriquecidos com NLCs contendo Q e da Q livre em solução ou da Q livre no HG não foi possível devido a questões metodológicas. De facto, a Q é pouco solúvel em água (Huang *et al.*, 2017), e uma solução ou dispersão de Q no

HG exigiria um conteúdo etanólico, o que causaria a solubilização do modelo lipídico do estrato córneo usado na avaliação da permeação. Contudo, este não é um problema exclusivo do modelo utilizado, porque numa aplicação tópica na pele, o etanol, frequentemente aplicado como promotor da permeação, atua dessa forma devido à sua capacidade de solubilizar a matriz lipídica do estrato córneo, não sendo uma situação desejável, pois afeta a função de barreira da pele. Apesar desta limitação metodológica, é possível comparar a permeação da Q a partir dos HGs enriquecidos com NLCs com a permeação da Q livre prevista *in silico*. De acordo com o algoritmo desenvolvido por Potts e Guy (Potts *et al.*, 1992), o *Jss* teórico da Q livre (ou seja, não encapsulado) através da pele humana foi calculado como $\approx 0,003480 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Este valor revela que o *Jss* dos HGs enriquecidos com NLCs contendo Q foi superior ao *Jss* da Q livre, conforme avaliado *in silico*. Assim, espera-se que os NLCs atuem como potenciadores da permeação, uma vez que aumentam os valores de *Jss* da Q em comparação com o que era esperado para este bioativo quando administrado livremente na pele.

Além de melhorar a permeabilidade, importa avaliar se as formulações têm a capacidade de limitar a perda natural de água da pele, ou seja, se têm um efeito oclusivo (Kalia *et al.*, 2000). O efeito oclusivo tem o potencial de aumentar a hidratação do estrato córneo, afetando a absorção percutânea e a eficácia dos bioativos (Hafeez *et al.*, 2013). Neste estudo, os efeitos oclusivos dos HGs enriquecidos com NLCs foram comparados (Figura 8). Todos os HGs enriquecidos com NLCs apresentaram um elevado efeito oclusivo, variando de uma diminuição de $13 \pm 5\%$ (NLC1 Placebo) a $34 \pm 1\%$ (NLC1 + Q) na WVTR.

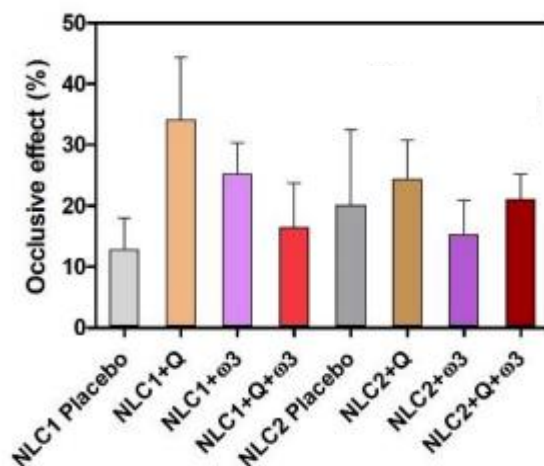


Figura 8: Efeito oclusivo dos HGs contendo NLCs (Lucio *et al.*, 2023).

O mesmo efeito oclusivo foi relatado para nanopartículas lipídicas produzidas para aplicações tópicas, mesmo quando não estão presentes compostos bioativos (Caldas *et al.*, 2021a; Han *et al.*, 2014), o que pode ser atribuído à adesão da camada de filme lipídico na superfície da pele, contribuindo para o efeito oclusivo e para a hidratação da pele.

Han *et al.* (2014) reportou um efeito oclusivo superior nas SLNs contendo Q comparativamente com os NLCs contendo Q desenvolvidos neste trabalho. Contudo, as SLNs normalmente têm tendência a apresentar um efeito oclusivo superior aos NLCs devido ao facto de serem mais cristalinas (Amasya, 2021). O efeito oclusivo das nanopartículas lipídicas varia de acordo com vários parâmetros, como por exemplo tamanho de partícula, concentração de lípidos e a cristalinidade da matriz lipídica (Amasya, 2021).

Os resultados da análise reológica são apresentados na Figura 9.

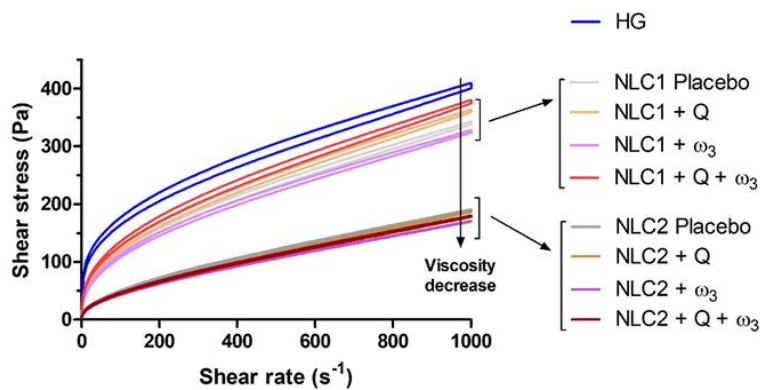


Figura 9: Análise do comportamento reológico dos HGs contendo NLCs (Lucio *et al.*, 2023).

Nos reogramas dos HGs, placebo e enriquecidos com NLCs, é possível observar uma diminuição da viscosidade em função do aumento da velocidade de corte, demonstrando que todos os HGs apresentaram um comportamento não-Newtoniano do tipo pseudoplástico. Em termos de aplicações cutâneas, o comportamento pseudoplástico dos HGs favorece a sua espalhabilidade quando se aplicam movimentos, mas conseguem recuperar rapidamente a sua consistência após cessar a aplicação de movimentos, favorecendo a retenção na superfície da pele. Os HGs enriquecidos com os NLC1 são mais viscosos comparativamente aos HGs enriquecidos com os NLC2. Adicionalmente, é possível constatar que HGs não apresentam tixotropia, uma vez que não existe variação da viscosidade com o tempo, sendo as curvas ascendentes e descendentes dos reogramas serem praticamente sobrepostas e sem a histerese característica do comportamento

tixotrópico (Lee *et al.*, 2009). Estes resultados não são surpreendentes dado que foi anteriormente reportado um comportamento semelhante para HGs enriquecidos com outros NLCs (Mendes *et al.*, 2013).

Dos vários agentes ambientais prejudiciais (por exemplo, luz solar, poluição e microrganismos), a exposição diária às radiações UV gera continuamente ROS, que aceleram o processo de envelhecimento e causam danos foto-oxidativos na pele (Parrado *et al.*, 2019 ; Trueb, 2021; Wadhwa *et al.*, 2022). Além disso, os ROS que podem ser gerados por processos de peroxidação lipídica em nanossistemas lipídicos, seja durante as etapas de produção ou durante o armazenamento, devem ser avaliados em termos de qualidade da formulação e estabilidade coloidal. Neste contexto, foram utilizados dois tipos de métodos para avaliar a atividade antioxidante: (i) o efeito sequestrador de radicais livres através do método ABTS (Figura 10A) e (ii) o efeito protetor contra radicais peróxido, avaliado pela concentração de MDA (Figura 10B), que é um indicador comum do grau de peroxidação.

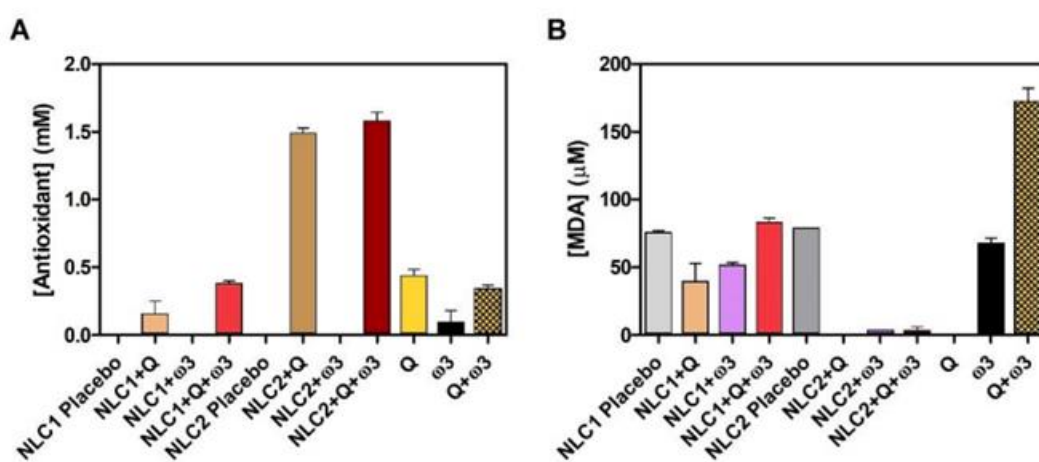


Figura 10: Resultados da avaliação da atividade antioxidante dos NLCs pelo método ABTS (A) e pela concentração de MDA (B) (Lucio *et al.*, 2023).

No método ABTS, os NLCs que apresentaram atividade antioxidante superior foram os NLC2, com ou sem ω_3 . Esta atividade antioxidante foi significativamente superior ($p < 0,001$) comparativamente com os bioativos livres (i.e., não encapsulados nos NLCs), provavelmente devido à proteção/estabilidade química conferida pelos nanossistemas (neste caso, os NLCs), tal como reportado por outros autores (Talarico *et al.*, 2021). Os NLC1 apresentam também capacidade de neutralizar o radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$, contudo este efeito é menor quando comparado com os NLC2, podendo ser explicada pela diferente difusão dos bioativos de acordo com as propriedades reológicas dos NLCs

(Azizi *et al.*, 2019). Conforme reportado por Azizi *et al.*, dispersões de nanossistemas lipídicos altamente viscosos podem diminuir a difusão de radicais livres documenta que de acordo com a sua reologia se for elevada a sua difusão dos radicais livres pode diminuir (Azizi *et al.*, 2019). Como resultado, os radicais $ABTS^{\bullet+}$ produzidos em meio aquoso apresentam maior dificuldade em se difundir e encontrar a Q quando encapsulada nos NLC1 pois esta formulação é mais viscosa, podendo justificar a menor atividade antioxidante obtida nos NLC1 + Q comparativamente à Q livre. A inclusão de ω_3 nos NLC1 com Q reduziu a viscosidade da formulação, aumentando a acessibilidade da Q aos $ABTS^{\bullet+}$ e, portanto, os NLC1 + Q + ω_3 apresentam uma atividade antioxidante semelhante à Q e à Q + ω_3 .

Como o MDA é um subproduto da peroxidação lipídica, uma maior [MDA] indica maior peroxidação lipídica (Figura 10B). De acordo com dados da literatura, 7 a 8 mg MDA/kg é o intervalo aceitável para determinar se o óleo de peixe fornece proteção adequada contra a oxidação (Jiménez-Martín *et al.*, 2015). Com base neste intervalo, os resultados da Figura 10B mostram que os NLCs (com [MDA] entre 0 e 6 mg /Kg), armazenadas durante 4 semanas, apresentam estabilidade de oxidação adequada e corroboram a estabilidade coloidal referida aquando da caracterização dos NLCs. A Q livre não produziu MDA, dado que este bioativo não é propenso a sofrer um processo de peroxidação lipídica, ao contrário do que acontece com o ω_3 . Importa também realçar que os estudos reportados da proteção da Q contra a peroxidação lipídica do óleo de peixe envolvem ensaios de curto prazo, revelando uma perda significativa da proteção da Q em apenas 5 dias, ou seja, um tempo muito inferior quando comparado com as 4 semanas em que os NLCs testados neste trabalho foram previamente armazenados (Liu *et al.*, 2021).

A produção de MDA foi a menor para os NLC2 contendo Q e/ou ω_3 (Figura 10B). Este efeito sugere uma elevada proteção contra a peroxidação lipídica, tendo sido superior quando comparados com os NLC2 placebo (i.e., sem bioativos encapsulados), uma vez que a formulação placebo apenas contém lípidos, sendo estes mais propensos à sua peroxidação na ausência de um agente antioxidante protetivo (como é o caso dos NLCs contendo Q e/ou ω_3). Uma situação semelhante ocorre nos NLC1 placebo; contudo, os NLC2 contendo Q e/ou ω_3 produzem uma [MDA] menor, possivelmente devido à menor viscosidade das NLC2 o que promove uma distribuição mais homogênea dos agentes antioxidantes protetores na matriz dos NLCs e uma melhor difusão/interação do radical

peroxilo com os antioxidantes protetores. Um efeito semelhante foi reportado por (Azizi *et al.*, 2019).

A foto-proteção foi qualitativamente avaliada usando um papel sensível às radiações UV (Figura 11).

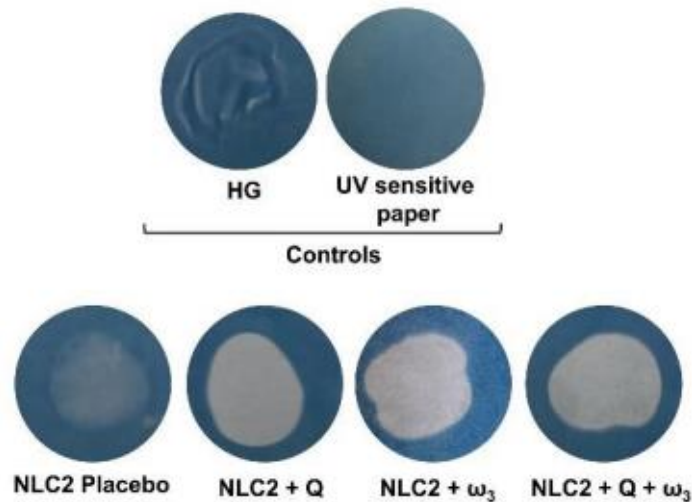


Figura 11: Resultados do teste de foto-proteção dos HGs enriquecidos com os NLC2 (Lucio *et al.*, 2023).

O papel sensível às radiações UV sem HG aplicado ou com aplicação do HG placebo foram usados como controlos negativos. A cor azul do papel indica a sua incapacidade de foto-proteção, uma vez que os produtos químicos insolúveis em água permaneceram fixos após a lavagem, enquanto as colorações brancas são indicativas de foto-proteção. Os resultados demonstram que todos os HGs contendo NLC2 apresentam alguma foto-proteção comparativamente com os controlos, o que está de acordo com o efeito físico de dispersão de luz que as nanopartículas lipídicas possuem para bloquear a radiação UV (Caldas *et al.*, 2021b). Como esperado, a incorporação da Q e/ou ω_3 aumentou o efeito foto-protetor das formulações, como pode ser observado pela coloração mais branca quando comparado com o HG enriquecido com NLC2 placebo. O efeito de foto-proteção é consistente com estudos que demonstram que a Q ou ω_3 são estratégias promissoras para melhorar o dano da pele causado pelas radiações UV (Caldas *et al.*, 2021b; Felippim *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2018; Kawabata *et al.*, 2022; Saija *et al.*, 2003).

Formulações que combinam compostos com atividades antioxidante e antimicrobiana podem diversificar o microbioma comensal da pele, sendo considerado um fator de

proteção cutânea. Desta forma, avaliou-se a atividade antimicrobiana dos HGs enriquecidos com os NLC. Nenhum efeito inibitório foi observado no crescimento de *E. coli* ou *C. albicans*. Os resultados para o *S. aureus* são apresentados na Figura 12.

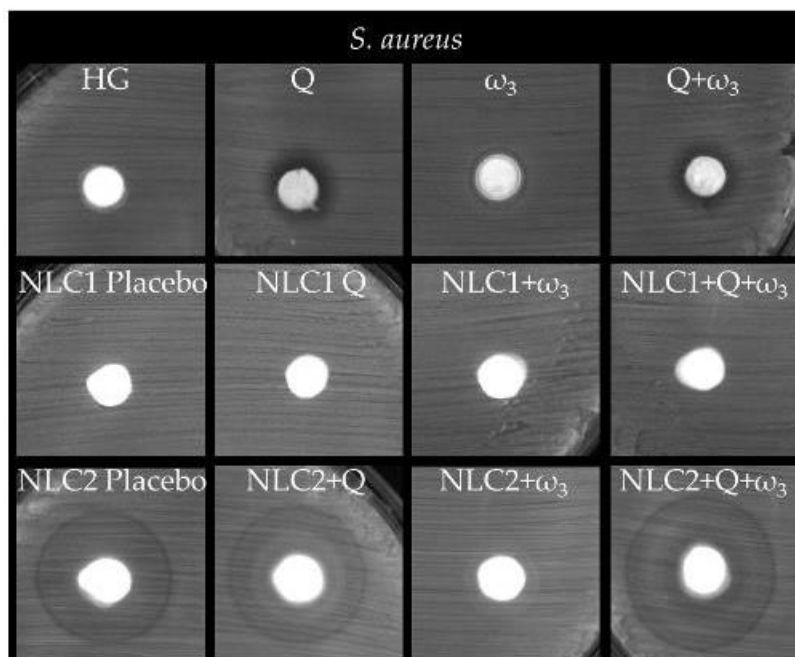


Figura 12: Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos bioativos, dos HGs enriquecidos com os NLCs e do HG placebo contra *S. aureus* (Lucio *et al.*, 2023).

A Q livre e Q + ω_3 apresentam uma zona de inibição (zona transparente, livre de bactérias), com um diâmetro de inibição de $11,3 \pm 0,2$ mm e $10,1 \pm 0,2$ mm, respectivamente (Figura 12, primeira linha). A inibição do crescimento de *S. aureus* apresentada por Q + ω_3 é provavelmente devido ao efeito antibacteriano da Q, uma vez que ω_3 isolado não apresenta um halo inibitório. De facto, de acordo com Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2018) bactérias gram-positivas são mais sensíveis à atividade bacteriostática da Q. No caso dos HGs enriquecidos com NLCs, apenas os NLC2 mostraram alguma redução no crescimento de *S. aureus* (Figura 12, terceira linha), nomeadamente os HGs enriquecidos com NLC2, NLC2 + Q e NLC2 + Q + ω_3 . Apesar da ausência de qualquer composto bioativo responsável pela atividade antibacteriana, o HG enriquecido com NLC2 placebo reduziu o crescimento bacteriano, o que provavelmente resulta da ação do(s) agente(s) tensioativo(s) presentes nos NLC2 (Tween[®] 80 e/ou DOSS). O efeito inibitório do Tween[®] 80 e/ou outros tensioativos contra o *S. aureus* já foi demonstrado (Kubo *et al.*, 2018).

V. CONCLUSÃO

OS NLC2 demonstraram melhor desempenho farmacêutico e terapêutico. Nos parâmetros testados os NLC2 demonstraram uma melhor libertação da Q, melhor proteção do bioativo e ao mesmo tempo favoreceu a sua permeação. Além disso, a utilização de HGs enriquecidos com NLCs permite também aumentar a permeação cutânea, sendo esta uma das limitações dos compostos bioativos testados.

Para finalizar em termos de atividade antioxidante, os NLC2 contendo Q, com ou sem ω_3 , foram os sistemas de veiculação mais eficazes na eliminação de ROS e na proteção contra a peroxidação lipídica. Adicionalmente, os NLC2 apresentaram efeito foto-protetor e atividade antimicrobiana contra o *S. aureus*. Os resultados obtidos sugerem que os NLC2, contendo ambos os bioativos, podem ser considerados bastante promissores para a prevenção do envelhecimento da pele e de outras condições patológicas.

Concluindo as formulações de NLCs apresentam boa capacidade de encapsulação como apresentado pelo termograma, ultrapassando o problema da solubilidade da Q. Tanto os NLC1 como os NLC2 apresentaram-se sólidas às temperaturas ambiente e corporal o que é desejável para a sua estabilidade e para uma libertação prolongada da Q. Os NLC2 apresentam maior estabilidade coloidal devido ao seu potencial zeta ser igual ou maior, em módulo, que 30 mV, demonstrando repulsão electrostática e menor propensão a agregar (Krambeck *et al.*, 2021).

IV. BIBLIOGRAFIA

- Aleandri, S. *et al.* (2018). Dynamic Light Scattering of Biopharmaceutics-Can Analytical Performance Be Enhanced by Laser Power? *Pharmaceutics*, 10(3), pp.
- Amasya, G. (2021). A novel formulation strategy for skin occlusion: Semi-solid lipid nanoparticles. *Journal of Research in Pharmacy*, 25(4)(25(4)), pp. 388-397.
- Ang, L. F. *et al.* (2014). HPLC method for simultaneous quantitative detection of quercetin and curcuminoids in traditional chinese medicines. *J Pharmacopuncture*, 17(4), pp. 36-49.
- Arzensek, D. (2010). Dynamic light scattering and application to proteins in solutions. pp.
- Azizi, M. *et al.* (2019). Study of the Physicochemical Properties of Fish Oil Solid Lipid Nanoparticle in the Presence of Palmitic Acid and Quercetin. *J Agric Food Chem*, 67(2), pp. 671-679.
- Benson, H. A. E. *et al.* (2016). Chapter 9 - Formulation Effects on Topical Nanoparticle Penetration. In: HAMBLIN, M. R., AVCI, P. & PROW, T. W. (eds.) *Nanoscience in Dermatology*. Boston, Academic Press, pp. 115-126.
- Blazek, A. (1973). *Thermal Analysis*. Van Nostrand Reinhold Company
- Boots, A. W., Haenen, G. R. e Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, 585(2-3), pp. 325-337.
- Borges, E. L., Donoso, M. T. V. e Ferreira, V. d. M. F. (2011). Revisão integrativa do uso dos ácidos graxos essenciais no tratamento de lesão cutânea. *Rev. Enferm. do Cent. Oeste Min.*, 1, pp. 121-130.
- Brieger, K. *et al.* (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 142, pp. w13659.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y. e Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 16(3), pp. 143-155.
- Caldas, A. R. *et al.* (2021a). Omega-3- and Resveratrol-Loaded Lipid Nanosystems for Potential Use as Topical Formulations in Autoimmune, Inflammatory, and Cancerous Skin Diseases. *Pharmaceutics*, 13(8), pp.
- Caldas, A. R. *et al.* (2021b). Avobenzone-loaded and omega-3-enriched lipid formulations for production of UV blocking sunscreen gels and textiles. *Journal of Molecular Liquids*, 342, pp.
- Chagas, M. *et al.* (2022). Flavonols and Flavones as Potential anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, pp. 9966750.
- Chaudhari, V. S., Murty, U. S. e Banerjee, S. (2021). Nanostructured lipid carriers as a strategy for encapsulation of active plant constituents: Formulation and in vitro physicochemical characterizations. *Chem Phys Lipids*, 235, pp. 105037.
- Cholewski, M., Tomczykowa, M. e Tomczyk, M. (2018). A Comprehensive Review of Chemistry, Sources and Bioavailability of Omega-3 Fatty Acids. *Nutrients*, 10(11), pp.
- Collings, P. J. e Hird, M. (1997). *Introduction to Liquid Crystals Chemistry and Physics*.
- Corrêa, N. M. *et al.* (2005). Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.
- Das, S. e Chaudhury, A. (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech*, 12(1), pp. 62-76.
- Deepika e Maurya, P. K. (2022). Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules*, 27(8), pp.

- Djuricic, I. e Calder, P. C. (2021). Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. *Nutrients*, 13(7), pp.
- Domaszewska-Szostek, A., Puzianowska-Kuznicka, M. e Kurylowicz, A. (2021). Flavonoids in Skin Senescence Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci*, 22(13), pp.
- Duncan, B., Dermot, H., and Richard, W. (2014). *Multi Length-Scale Characterization*. Wiley.
- Felippim, E. C., Marcato, P. D. e Maia Campos, P. (2020). Development of Photoprotective Formulations Containing Nanostructured Lipid Carriers: Sun Protection Factor, Physical-Mechanical and Sensorial Properties. *AAPS PharmSciTech*, 21(8), pp. 311.
- Ferreira, A. M. *et al.* (2012). [The use of fatty acids in wound care: an integrative review of the Brazilian literature]. *Rev Esc Enferm USP*, 46(3), pp. 752-760.
- Fluhr, J. W. e Elias, P. M. (2002). Stratum corneum pH: Formation and Function of the 'Acid Mantle'. *Exogenous Dermatology*, 1(4), pp. 163-175.
- Fonseca, M. *et al.* (2023). The Impact of Flavonoid-Loaded Nanoparticles in the UV Protection and Safety Profile of Topical Sunscreens. *Biomolecules*, 13(3), pp.
- Frenzel, M. e Steffen-Heins, A. (2015). Impact of quercetin and fish oil encapsulation on bilayer membrane and oxidation stability of liposomes. *Food Chem*, 185, pp. 48-57.
- Hafeez, F. e Maibach, H. (2013). Occlusion effect on in vivo percutaneous penetration of chemicals in man and monkey: partition coefficient effects. *Skin Pharmacol Physiol*, 26(2), pp. 85-91.
- Han, S. B. *et al.* (2014). Physical characterization and in vitro skin permeation of solid lipid nanoparticles for transdermal delivery of quercetin. *Int J Cosmet Sci*, 36(6), pp. 588-597.
- Hatakeyama T, Q. F. X. (1999). *Thermal analysis - Fundamentals and applications to polymer science*. Wiley.
- He, S. *et al.* (2020). Vortex fluidic mediated encapsulation of functional fish oil featuring in situ probed small angle neutron scattering. *NPJ Sci Food*, 4, pp. 12.
- Höhne, G., Hemminger, W. e Flammershiem, H. J. (1996). *Differential Scanning Calorimetry - An Introduction for Practitioners* Springer Springer.
- Huang, J. *et al.* (2017). Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies. *Journal of Food Engineering*, 215, pp. 1-12.
- Huang, T. H. *et al.* (2018). Cosmetic and Therapeutic Applications of Fish Oil's Fatty Acids on the Skin. *Mar Drugs*, 16(8), pp.
- Instruments, M. (2004). Malvern instruments: Zetasizer Nano Series User Manual. *Malvern Instruments Ltd*, pp.
- Januszewski, J. *et al.* (2023). Nutritional Supplements for Skin Health-A Review of What Should Be Chosen and Why. *Medicina (Kaunas)*, 60(1), pp.
- Jiménez-Martín, E. *et al.* (2015). Volatile compounds and physicochemical characteristics during storage of microcapsules from different fish oil emulsions. *Food and Bioproducts Processing*, 96, pp. 52-64.
- Kalia, Y. N. *et al.* (2000). Normalization of Stratum Corneum Barrier Function and Transepidermal Water Loss In Vivo. *Pharmaceutical Research*, 17(9), pp. 1148-1150.
- Kalia, Y. N., Piroot, F. e Guy, R. H. (1996). Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: Water diffusion across human stratum

- corneum in vivo. *Biophysical Journal*, 71, pp. 2692–2700.
- Kawabata, K., Miyoshi, A. e Nishi, H. (2022). Photoprotective Effects of Selected Polyphenols and Antioxidants on Naproxen Photodegradability in the Solid-State. *Photochem*, 2(4), pp. 880-890.
- Krambeck, K. *et al.* (2021). Design and characterization of Nanostructured lipid carriers (NLC) and Nanostructured lipid carrier-based hydrogels containing Passiflora edulis seeds oil. *Int J Pharm*, 600, pp. 120444.
- Kubo, A. L. *et al.* (2018). Antimicrobial potency of differently coated 10 and 50 nm silver nanoparticles against clinically relevant bacteria Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 170, pp. 401-410.
- Kumbhar, D. D. e Pokharkar, V. B. (2013). Engineering of a nanostructured lipid carrier for the poorly water-soluble drug, bicalutamide: Physicochemical investigations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 416, pp. 32-42.
- Lahoud, M. H. e Campos, R. (2010). Theoretical aspects related to pharmaceutical rheology. pp. 65-73.
- Lawson, M. K. (2023). Improvement of Therapeutic Value of Quercetin with Chitosan Nanoparticle Delivery Systems and Potential Applications. *Int J Mol Sci*, 24(4), pp.
- Lee, C. H., Moturi, V. e Lee, Y. (2009). Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J Control Release*, 136(2), pp. 88-98.
- Lee, C. M. *et al.* (2019). Regional Variation of Human Skin Surface Temperature. *Ann Dermatol*, 31(3), pp. 349-352.
- Li, Y. *et al.* (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 8(3), pp. 167.
- Liu, H. M. *et al.* (2023). Possible Mechanisms of Oxidative Stress-Induced Skin Cellular Senescence, Inflammation, and Cancer and the Therapeutic Potential of Plant Polyphenols. *Int J Mol Sci*, 24(4), pp.
- Liu, S. *et al.* (2021). Antioxidative Properties and Chemical Changes of Quercetin in Fish Oil: Quercetin Reacts with Free Fatty Acids to Form Its Ester Derivatives. *J Agric Food Chem*, 69(3), pp. 1057-1067.
- Lopes, C. M. *et al.* (2018). Lipid-based colloidal carriers for topical application of antiviral drugs. *Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications*. pp. 565-622.
- Lucio, M. *et al.* (2023). Nanostructured Lipid Carriers Enriched Hydrogels for Skin Topical Administration of Quercetin and Omega-3 Fatty Acid. *Pharmaceutics*, 15(8), pp.
- Mendes, A. I. *et al.* (2013). Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: improving antifungal activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 111, pp. 755-763.
- Narayanan, T. (2008). Synchrotron Small-Angle X-Ray Scattering. In: R. BORSALI, R. P. (ed.) *Soft Matter Characterization*. Springer Netherlands: Dordrecht., pp. 899-952.
- Nguyen, T.-T.-L. e Duong, V.-A. (2022). Solid Lipid Nanoparticles. *Encyclopedia*, 2(2), pp. 952-973.
- Panigrahi, K. C. *et al.* (2018). Gelucire: A versatile polymer for modified release drug delivery system. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1), pp. 102-108.
- Papaccio, F. *et al.* (2022). Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. *Antioxidants (Basel)*, 11(6), pp.

- Pardeike, J., Hommoss, A. e Muller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm*, 366(1-2), pp. 170-184.
- Parrado, C. *et al.* (2019). Environmental Stressors on Skin Aging. Mechanistic Insights. *Front Pharmacol*, 10, pp. 759.
- Pathak, P. e Nagarsenker, M. (2009). Formulation and evaluation of lidocaine lipid nanosystems for dermal delivery. *AAPS PharmSciTech*, 10(3), pp. 985-992.
- Pilkington, S. M. *et al.* (2021). Inflammaging and the Skin. *J Invest Dermatol*, 141(4S), pp. 1087-1095.
- Potts, R. O. e Guy, R. H. (1992). Predicting skin permeability. *Pharm Res*, 9(5), pp. 663-669.
- Pusey, P. N. e Megen, V. (1994). Dynamic light scattering by non-ergodic media. 79(1), pp. 17-30.
- Reuter, S. *et al.* (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49(11), pp. 1603-1616.
- Ricci, M. *et al.* (2005). Evaluation of indomethacin percutaneous absorption from nanostructured lipid carriers (NLC): in vitro and in vivo studies. *J Pharm Sci*, 94(5), pp. 1149-1159.
- Roberts, M. S. *et al.* (2017). Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *J Control Release*, 247, pp. 86-105.
- Saija, A. *et al.* (2003). 'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *Eur J Pharm Biopharm*, 56(2), pp. 167-174.
- Shahparast, Y. *et al.* (2019). Preparation, Physicochemical Characterization and Oxidative Stability of Omega-3 Fish Oil/alpha-Tocopherol-co-Loaded Nanostructured Lipidic Carriers. *Adv Pharm Bull*, 9(3), pp. 393-400.
- Smythe, P. e Wilkinson, H. N. (2023). The Skin Microbiome: Current Landscape and Future Opportunities. *Int J Mol Sci*, 24(4), pp.
- Talarico, L. *et al.* (2021). Solid Lipid Nanoparticles Produced via a Coacervation Method as Promising Carriers for Controlled Release of Quercetin. *Molecules*, 26(9), pp.
- Teixeira, M. I. *et al.* (2022). Formulation, Characterization, and Cytotoxicity Evaluation of Lactoferrin Functionalized Lipid Nanoparticles for Riluzole Delivery to the Brain. *Pharmaceutics*, 14(1), pp.
- Tomou, E. M. *et al.* (2023). Recent Advances in Nanoformulations for Quercetin Delivery. *Pharmaceutics*, 15(6), pp.
- Tran, T. H. *et al.* (2014). Preparation and characterization of fenofibrate-loaded nanostructured lipid carriers for oral bioavailability enhancement. *AAPS PharmSciTech*, 15(6), pp. 1509-1515.
- Trueb, R. M. (2021). Oxidative stress and its impact on skin, scalp and hair. *Int J Cosmet Sci*, 43 Suppl 1, pp. S9-S13.
- Tsioptsias, C. e Tsivintzelis, I. (2022). On the Thermodynamic Thermal Properties of Quercetin and Similar Pharmaceuticals. *Molecules*, 27(19), pp.
- Ulusoy, H. G. e Sanlier, N. (2020). A minireview of quercetin: from its metabolism to possible mechanisms of its biological activities. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60(19), pp. 3290-3303.
- Vamanu, E. e Gatea, F. (2020). Correlations between Microbiota Bioactivity and Bioavailability of Functional Compounds: A Mini-Review. *Biomedicines*, 8(2), pp.

- Vaz, G. R. *et al.* (2022). Curcumin and Quercetin-Loaded Lipid Nanocarriers: Development of Omega-3 Mucoadhesive Nanoemulsions for Intranasal Administration. *Nanomaterials (Basel)*, 12(7), pp.
- Verma, D. D. *et al.* (2003a). Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *Eur J Pharm Biopharm*, 55(3), pp. 271-277.
- Verma, D. D. *et al.* (2003b). Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int J Pharm*, 258(1-2), pp. 141-151.
- Vijayakumar, A. *et al.* (2017). Quercetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticle Dispersion with Improved Physicochemical Properties and Cellular Uptake. *AAPS PharmSciTech*, 18(3), pp. 875-883.
- Wadhwa, K. *et al.* (2022). New insights into quercetin nanoformulations for topical delivery. *Phytomedicine Plus*, 2(2), pp.
- Wang, S. *et al.* (2018). Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. *J Food Prot*, 81(1), pp. 68-78.
- Wissing, S., Lippacher, A. e Müller, R. (2001). Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Cosmet Sci*, 52(5), pp. 313-324.
- Xu, D. *et al.* (2019). Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules*, 24(6), pp.
- Xu, R. (2002). *Particle Characterization: Light Scattering Methods*. Springer Science & Business Media.
- Zhao, Y., Brown, M. B. e Jones, S. A. (2010). Pharmaceutical foams: are they the answer to the dilemma of topical nanoparticles? *Nanomedicine*, 6(2), pp. 227-236.