

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

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE SISTEMAS NANO E MICROPARTICULADOS CONTENDO
MELATONINA**

SCHEILA REZENDE SCHAFFAZICK

PORTO ALEGRE, 2006

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

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE SISTEMAS NANO E MICROPARTICULADOS CONTENDO
MELATONINA**

Tese apresentada por **Scheila Rezende
Schaffazick** para obtenção do TÍTULO
DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.06.2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Eneida de Paula
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Mirian Salvador
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Predro Ros Petrovick
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

S296d Schaffazick, Scheila Rezende

Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina/ Scheila Rezende Schaffazick – Porto Alegre: UFRGS, 2006 – 252 p.: il., gráf., tab.

Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Tecnologia Farmacêutica. 2. Melatonina. 3. Nanopartículas poliméricas. 4. Nanocápsulas. 5. Nanoesferas. 6. Lipoperoxidação. I. Guterres, Sílvia Stanisquaski. II. Pohlmann, Adriana Raffin. III. Título.

CDU: 615.453.4

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

“Aos meus pais, Ireneu e Sueli, pelo incentivo constante, apoio incondicional e compreensão a mim sempre dedicados”.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sílvia pela oportunidade concedida desde o mestrado até o doutorado, pela confiança, estímulo e orientação constante, durante todos estes anos de convívio, pelos conhecimentos adquiridos, além do exemplo de dedicação à pesquisa.

À Profa. Dra. Adriana pela co-orientação, que também começou no mestrado e estendeu-se ao doutorado, a qual foi sempre de fundamental importância, estando sempre disposta a transmitir conhecimentos e a discutir os resultados obtidos.

À Profa. Dra. Tânia B. Creczynski-Pasa e à MSc. Clarissa de Cordova, da UFSC, e aos Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto e Profa. Dra. Ionara R. Siqueira, do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pelas importantes colaborações científicas e à Profa. Dra. Teresa Dalla Costa pelo empréstimo do HPLC.

Ao programa e ao Corpo Docente de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela realização deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao CNPq pelo fornecimento da bolsa de doutorado e da taxa de bancada, que foram importantes para o desenvolvimento do trabalho.

Ao apoio financeiro da CAPES, FAPERGS e da Rede de Nanotecnologia/CNPq/MCT, além da oportunidade proporcionada pela Rede de participar de um curso e de mais dois encontros da área de nanociência.

Aos colegas e amigos do Laboratório 405, pela agradável convivência e troca de experiências: Letícia Cruz, Lali, Valéria, Cláudia, Lê Colomé, Renata, Alessandro, Eliézer, Bibiana, Dani, Vitória, Sandra, Graziela, Gislane, Leandro, Helen, Clarissa Xavier e Bettoni, Érico, Maria, Fernanda, Rodrigo, Mari, Ana Elisa e Marta. Aos alunos Denise, Tassiana e à Cristiane H. pelo auxílio em certas etapas do trabalho e, especialmente, à Alessandra pela ajuda no último ano do doutorado. À Graziela e à Lali pela determinação de diâmetros de partículas e potenciais zeta e à Renata pela determinação de diâmetro no IPT.

Aos demais colegas e laboratórios deste Programa de Pós-Graduação que me prestaram alguns auxílios e a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Em especial aos colegas e amigos Ruy e Cristiane B. pelo convívio, bons momentos e discussões científicas, e, também, à Silvana, à Marjo e ao Iguatinã pela amizade e apoio. E, por fim, agradeço carinhosamente à minha família, Ireneu, Sueli, Tatiana, Daniel, Adriane e avôs Arnaldo e Ulysses, pelo incentivo, apoio, conselhos, afeto e compreensão.

APRESENTAÇÃO

A presente tese está estruturada na forma de capítulos, visando ao melhor delineamento das hipóteses de trabalho e à organização dos resultados obtidos, dividindo-se, então, da seguinte maneira:

- Introdução;
- Objetivos;
- Capítulo 1: Revisão de Literatura;
 - Parte I: Artigo publicado;
 - Parte II: Continuação da revisão de literatura;
- Capítulos 2, 3 e 4: Artigo publicado, aceito para publicação ou submetido a periódico científico, relativos ao desenvolvimento tecnológico das formulações;
- Capítulos 5 e 6: Artigo publicado ou ainda a ser enviado a periódico científico, referentes à avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* da melatonina associada às formulações selecionadas;
- Discussão Geral;
- Conclusões;
- Perspectivas e
- Referências Bibliográficas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	09
CAPÍTULO 1: Revisão de literatura.....	13
PARTE I: Publicação 1: Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.....	15
PARTE II: Continuação da revisão de literatura.....	29
1.1. Métodos de preparação das nanopartículas poliméricas.....	31
1.1.1. Polimerização de monômeros dispersos.....	31
1.1.2. Métodos baseados na utilização de polímeros pré-formados.....	32
1.2. Micropartículas.....	38
1.3. Secagem por aspersão de sistemas nano e microparticulados.....	41
1.4. Melatonina.....	45
1.4.1. Lipoperoxidação e atividade antioxidante da melatonina.....	51
1.4.2. Desenvolvimento de formulações contendo melatonina.....	60
CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de suspensões e de produtos secos de nanocápsulas contendo melatonina.....	65
2.1. Introdução.....	67
Publicação 2: Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin.....	69
CAPÍTULO 3: Suspensões de nanocápsulas, nanoemulsão e nanodispersão de tensoativos contendo melatonina: preparação, caracterização e estudo de estabilidade.....	79
3.1 Introdução.....	81
Publicação 3 (aceita): Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: preparation, characterization and stability	

evaluation.....	83
CAPÍTULO 4: Avaliação dos métodos de deposição interfacial e de emulsificação-difusão na preparação de nanocápsulas contendo melatonina.....	111
4.1. Introdução.....	113
Publicação 4 (submetida): Caracterização e estudo de estabilidade físico-química de nanocápsulas contendo melatonina preparadas através dos métodos de deposição interfacial e de emulsificação-difusão.....	115
CAPÍTULO 5: Avaliação <i>in vitro</i> da atividade protetora da melatonina associada às nanopartículas poliméricas contra a lipoperoxidação.....	153
5.1. Introdução.....	155
Publicação 5: Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation.....	157
CAPÍTULO 6: Avaliação <i>in vivo</i> da capacidade antioxidante aguda da melatonina associada a nanocápsulas.....	165
6.1. Introdução.....	167
Publicação 6 (ainda não-submetida): Melatonin-loaded polysorbate 80-coated nanocapsules show <i>in vivo</i> acute antioxidant capacity against lipid peroxidation in brain and liver.....	169
DISCUSSÃO GERAL	199
CONCLUSÕES	211
PERSPECTIVAS	219
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	223
PARECERES DA BANCA	243
BIOGRAFIA	249

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 (Parte I)

- Figura 1.** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas..... 17
- Figura 2.** Métodos usuais, empregados na preparação de nanopartículas poliméricas, baseados na utilização de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados..... 18

CAPÍTULO 1 (Parte II)

- Figura 1.** Esquema dos métodos de preparação empregados na presente tese: nanoprecipitação (nanoesferas), deposição-interfacial (nanocápsulas) ou emulsificação-difusão (nanocápsulas ou nanoesferas)..... 36
- Figura 2.** Fisiologia da secreção da melatonina, 5-metoxi-N-acetiltryptamina..... 47
- Figura 3.** Geração de radicais livres 53

CAPÍTULO 2

- Figure 1.** Melatonin structure (N-acetyl-5-methoxytryptamine)..... 72
- Figure 2.** Transmission electron microscopy images of Eudragit S100[®]-nanocapsule suspension containing melatonin 75
- Figure 3.** Images obtained by scanning electron microscopy of the Eudragit S100[®] nanocapsule spray-dried powder containing melatonin, after preparation and after 12 months of storage and silicon dioxide spray-dried..... 76
- Figure 4.** The release profile of melatonin-loaded nanocapsule spray-dried powder in comparison with the dissolution of the pure drug, in pH 7.4 phosphate buffer solution. 77
- Figure 5.** Fit of experimental melatonin release from Eudragit[®] S100-nanocapsule spray-dried powder by Krosmeier-Peppas model (drug release limited up to 60 %). 77

CAPÍTULO 3

Figure 1. Degradation pathway of melatonin.....	105
Figure 2. Content of melatonin associated with nanocarrier systems stored at room temperature, at natural light and at 50 °C.....	106
Figure 3. pH of the nanocarrier systems containing melatonin in function of time.....	107
Figure 4. Associated melatonin with the nanocarrier systems in function of time.....	108
Figure 5. Diameters of the nanocarrier systems containing melatonin, after preparation and after 90 days.....	109

CAPÍTULO 4

Figura 1. Estruturas químicas da melatonina e dos componentes empregados na preparação das nanocápsulas.....	146
Figura 2. Potenciais zeta, diâmetros, polidispersões e pH das suspensões de nanocápsulas contendo melatonina, após a preparação.....	147
Figura 3. Imagens obtidas através de TEM a partir das nanocápsulas de Eudragit RS100 [®] contendo melatonina.....	148
Figura 4. Comparação dos valores de potenciais zeta das formulações preparadas com melatonina e sem fármaco.....	149
Figura 5. Teores e taxas de associação da melatonina às nanocápsulas em função do tempo de armazenamento.....	150
Figura 6. Diâmetros e polidispersões das suspensões de nanocápsulas, preparadas com ou sem melatonina, em função do tempo de armazenamento.....	151
Figura 7. Potenciais zeta e valores de pH das formulações de nanocápsulas, preparadas com ou sem melatonina, em função do tempo de armazenamento.....	152

CAPÍTULO 6

Figure 1. Transmission electron microscopy images of melatonin-loaded Eudragit [®] S100-nanocapsules.....	196
---	-----

Figure 2. Antioxidant effect of melatonin-loaded nanocapsules or melatonin solution against lipid peroxidation and the total antioxidant reactivity, after 1 hour of intraperitoneal administration in mice.....

197

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 (Parte I)

Tabela 1. Parâmetros que influenciam o diâmetro médio de nanocápsulas e de nanoesferas preparadas através de diferentes métodos.....	19
Tabela 2. Taxas de associação de alguns fármacos a nanopartículas poliméricas.....	22
Tabela 3. Forma de associação de diferentes fármacos a nanocápsulas ou a nanoesferas poliméricas.....	23
Tabela 4. Estudos de estabilidade de suspensões de nanopartículas poliméricas, em função do tempo de armazenamento.....	25

CAPÍTULO 1 (Parte II)

Tabela 1. Parâmetros gerais de caracterização físico-química de sistemas microparticulados e alguns métodos que podem ser empregados.....	41
--	----

CAPÍTULO 2

Table 1. The influence of the type of the surfactant on physicochemical characteristics of poly(ϵ -caprolactone)-nanocapsule suspensions containing melatonin, using caprylic/capric triglyceride as oil core.....	74
Table 2. The influence of the type of the polymer on physicochemical characteristics of nanocapsule suspensions containing melatonin, prepared using polysorbate 80, sorbitan monooleate, and caprylic/capric triglyceride as oil core.....	74
Table 3. Influence of the presence of polymer and/or oil on physicochemical characteristics of several colloidal formulations containing melatonin, prepared using polysorbate 80 and sorbitan monooleate as surfactants.....	75

CAPÍTULO 3

Table 1. Physicochemical characteristics of the nanocapsule suspensions, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin, after preparation.....	104
--	-----

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Desenho fatorial 2^3 das formulações de nanocápsulas de Eudragit RS100 [®] contendo melatonina.....	144
---	-----

Tabela 2. Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo ou não melatonina, preparadas através dos métodos de deposição interfacial ou de emulsificação-difusão	145
--	-----

CAPÍTULO 5

Table 1. Physicochemical properties of drug-loaded and drug-unloaded colloids: nanospheres, nanocapsules and nanoemulsion	161
--	-----

Table 2. Effect of melatonin encapsulation on lipid peroxidation.....	161
--	-----

CAPÍTULO 6

Table 1. Physicochemical characterization of the polysorbate 80-coated Eudragit S100 [®] nanocapsule suspensions.....	195
---	-----

RESUMO

Este trabalho centrou-se no desenvolvimento tecnológico e na caracterização de nanopartículas poliméricas (nanocápsulas ou nanoesferas) contendo melatonina, empregando diferentes composições, métodos de preparação e concentrações de melatonina. De uma maneira geral, as diferentes suspensões nanoparticuladas foram caracterizadas segundo a determinação dos teores totais de melatonina, a determinação das taxas de associação da melatonina aos nanocarreadores, a análise morfológica, a determinação dos diâmetros médios de partículas e polidispersões, além da determinação dos valores de potenciais zeta. As suspensões de nanocápsulas ou de nanoesferas foram preparadas pelos métodos de deposição interfacial ou de nanoprecipitação, respectivamente. Foram avaliadas as influências do tipo de polímero [Eudragit[®] S100, Eudragit[®] RS100, poli(ϵ -caprolactona) ou poli(lactideo)], de óleo (triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, óleo mineral ou Eutanol G[®]) e de tensoativos (polissorbato 80, poloxamer 188, monooleato de sorbitano, monoestearato de sorbitano ou lecitina) sobre as características físico-químicas das suspensões. Os resultados demonstraram que as nanopartículas apresentaram diâmetros inferiores a 350 nm, encapsulação parcial da melatonina e morfologia esférica. As suspensões de nanoesferas apresentaram eficiências de encapsulação similares, mas diâmetros inferiores às respectivas nanocápsulas. O tipo de polímero empregado influenciou nas taxas de associação da melatonina. De acordo com a maior eficiência de encapsulação (56 %), nanocápsulas preparadas com Eudragit S100[®] foram selecionadas para secagem por aspersão, empregando dióxido de silício coloidal (3 % m/V). As micropartículas nanorrevestidas obtidas apresentaram eficiência de encapsulação de 93 % e foram capazes de controlar a velocidade de liberação da melatonina, comparativamente ao fármaco puro. O estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas, comparativamente à nanoemulsão e à nanodispersão dos tensoativos, mostrou que a composição dos sistemas e as condições de armazenamento influenciaram a estabilidade físico-química das formulações. Um delineamento fatorial 2³ foi também realizado objetivando-se a comparação das características físico-químicas de nanocápsulas de Eudragit RS100[®] contendo melatonina obtidas através de

deposição interfacial ou de emulsificação-difusão. As taxas de associação da melatonina não foram influenciadas pela composição das formulações e nem pelo método de preparação empregado. Por outro lado, os diâmetros, as polidispersões, os potenciais zeta, os valores de pH e a estabilidade físico-química foram influenciados pelo método de preparação e/ou pela composição dos sistemas. As propriedades antioxidantes da melatonina associada a nanopartículas foram também avaliadas. Desta forma, experimentos *in vitro* de lipoperoxidação de microsomas hepáticos e de lipossomas de fosfatidilcolina, induzida pelo radical ascorbil, foram realizados. Nanocápsulas ou nanoesferas preparadas com Eudragit S100[®] foram selecionadas para o estudo, com base na maior eficiência de associação do fármaco. Nanoemulsão também foi testada para verificar a influência da presença do polímero. A presença da melatonina foi capaz de proteger os lipídios em comparação aos controles, com influência da formulação, da dose de melatonina e do modelo de membrana empregado. Apenas os nanocarreadores poliméricos (nanocápsulas ou nanoesferas revestidas com polissorbatato 80) contendo melatonina foram capazes de aumentar significativamente a atividade antioxidante deste fármaco nos dois modelos de membrana empregados. Finalmente, nanocápsulas de Eudragit S100[®] revestidas com polissorbatato 80 foram administradas, intraperitonealmente em camundongos saudáveis, e os efeitos antioxidantes agudos da melatonina *in vivo* foram avaliados no cérebro (córtex frontal e hipocampo) e no fígado. Os resultados demonstraram que as nanocápsulas contendo melatonina foram capazes de reduzir significativamente a lipoperoxidação no córtex, no hipocampo e no fígado, ao passo que a solução do fármaco não exerceu efeito significativo. O conjunto dos resultados demonstrou a viabilidade tecnológica da preparação de sistemas poliméricos nanoparticulados e microparticulados contendo melatonina, na forma de suspensão ou de pós, com potencial aplicação tanto no aumento da atividade antioxidante quanto no controle da liberação deste fármaco.

Palavras-chaves: melatonina, nanopartículas, nanocápsulas, nanoesferas, polímeros pré-formados, lipoperoxidação *in vivo* e *in vitro*.

ABSTRACT

Technological Development and Evaluation of the Antioxidant Activity of Melatonin-Loaded Nano- and Microparticulated Systems

This work has been based on the development and characterization of the melatonin-loaded polymeric nanoparticles (nanocapsules or nanospheres) employing different system compositions, methods of preparation and melatonin concentrations. In general, the different nanoparticle suspensions were characterized in terms of melatonin content and its association within the particles, morphology, mean size and polydispersity of the particles, as well as the zeta potentials. The nanocapsule or nanosphere suspensions were prepared by interfacial deposition or nanoprecipitation methods, respectively. The influences of the type of the polymer [Eudragit[®] S100, Eudragit[®] RS100, poly(ϵ -caprolactone) or poly(lactide)], of the oil nature (caprylic/capric triglyceride, mineral oil or Eutanol G[®]) and of the type of surfactants (polysorbate 80, poloxamer 188, sorbitan monooleate, sorbitan monostearate or lecithin) on the physicochemical characteristics of suspensions were evaluated. The results demonstrated that the nanoparticles presented mean size lower than 350 nm, partial encapsulation of melatonin and they were spherically shape. The nanosphere suspensions presented similar encapsulation efficiencies to nanocapsules, however, the former presented a lower mean size of particles. The type of polymer used in the formulations influenced the encapsulation efficiencies. The nanocapsules prepared with Eudragit S100[®] were selected to be spray-dried, using colloidal silicon dioxide (3 % w/v), due to the highest encapsulation efficiency (56 %). The nanoparticle-coated microparticles presented the encapsulation efficiency of 93 % and they controlled the release rate of melatonin when compared to the pure drug. The physicochemical stability evaluation of the melatonin-loaded nanocapsule suspensions compared to the nanoemulsion or the nanodispersion of surfactants showed that the composition of the melatonin-loaded system and the storage conditions influenced the physicochemical stability of the formulations. Melatonin-loaded Eudragit RS100[®]-nanocapsule

suspensions prepared by interfacial deposition or by emulsification-diffusion techniques were also compared in terms of physicochemical characteristics using a 2³ factorial-design. The formulation composition or the preparation methods did not influence the encapsulation efficiencies. However, the mean size, polydispersity, zeta potential, pH and physicochemical stability were influenced by the formulation composition and/or by the preparation methods. The antioxidant properties of the melatonin-loaded nanoparticle suspensions were also evaluated. Hence, phosphatidylcholine liposomes or liver microsomes were used as model of the lipid membrane and in vitro lipid peroxidation was induced by free radical ascorbyl. The melatonin-loaded Eudragit S100[®] nanoparticles (nanocapsules and nanospheres) were selected to this study based on the highest encapsulation efficiencies. The nanoemulsion was also evaluated for studying the influence of the presence of the polymer. The results demonstrated that the lipids were protected against peroxidation due to the presence of the melatonin, and this effect depended on the type of formulation, drug concentration and on the type of the membrane model. Only the melatonin-loaded polymeric nanocarriers (polysorbate 80-coated nanocapsules or nanospheres) were able to improve the antioxidant action of melatonin in both membrane model. Finally, the in vivo acute antioxidant capacities of melatonin-loaded polysorbate 80-coated Eudragit S100[®] nanocapsules in the brain (frontal cortex and hippocampus) and in the liver were compared to the effect of the drug solution, after 1 h of intraperitoneal administration in mice. It was verified that the melatonin-loaded nanocapsules significantly decreased the lipid peroxidation in the cortex, in the hippocampus and in the liver. On the other hand, the melatonin solution did not significantly decrease the lipid peroxidation. Briefly, the results demonstrated the technological viability of the preparation of melatonin-loaded polymeric nanoparticulated and microparticulated systems in the form of suspension or powder. These polymeric particulated systems presented potential applications in both to improve the antioxidant activity and to control the release profile of melatonin.

Keywords: melatonin, nanocapsules, nanospheres, preformed polymers, in vitro and in vivo lipid peroxidation.

INTRODUÇÃO

As nanopartículas poliméricas são carreadores submicrométricos de fármacos, as quais incluem as nanocápsulas e as nanoesferas. As nanocápsulas são formadas por uma camada polimérica disposta ao redor de um núcleo geralmente oleoso, enquanto as nanoesferas são sistemas matriciais constituídos por polímero (PUISIEUX *et al.*, 1994; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a). Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações, tais como o controle da liberação de fármacos (SOPPIMATH *et al.*, 2001; LEGRAND *et al.*, 1999; YOO *et al.*, 2000), a distribuição mais seletiva de substâncias ativas, aumentando os seus índices terapêuticos (PUISIEUX *et al.*, 1994; BARRAT *et al.*, 2000; COUVREUR *et al.*, 2002; PINTO-ALPHANDARY *et al.*, 2000; BRIGGER *et al.*, 2002; CHELLAT *et al.*, 2005), a vetorização cerebral de fármacos (SOPPIMATH *et al.*, 2001; GARCIA-GARCIA *et al.*, 2005), a veiculação de antiinflamatórios não-esteróides (GUTERRES *et al.*, 1995a; GUTERRES *et al.*, 1995b; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003b; POHLMANN *et al.*, 2004), a proteção de fármacos degradáveis no trato gastrintestinal (ALLÉMANN *et al.*, 1998; PONCHEL e IRACHE *et al.*, 1998; BILATI *et al.*, 2005) e o aumento de suas biodisponibilidades (peptídeos, proteínas, hormônios), o aumento da atividade antioxidante de substâncias ativas (PALUMBO *et al.*, 2002), assim como a veiculação de fármacos para uso oftálmico (CALVO *et al.*, 1996; LUDWIG, 2005).

Durante as duas últimas décadas, diversas técnicas para a preparação de suspensões de nanopartículas têm sido desenvolvidas, as quais têm evoluído no sentido da utilização de solventes e componentes menos tóxicos e na simplificação do processo, objetivando-se a possibilidade de transposição de escala e, ainda, buscando otimizar as técnicas em termos de rendimento e de eficiência de encapsulação de fármacos (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998a). Dentre estes métodos, aqueles baseados na utilização de polímeros pré-formados têm merecido destaque devido à menor toxicidade e ao maior controle das partículas formadas, em relação ao método de polimerização *in situ*. O método de nanoprecipitação de polímeros pré-formados de FESSI e colaboradores (1986, 1989), o qual utiliza solventes miscíveis com a água, tem sido bastante difundido, embora possua algumas limitações como a

impossibilidade de ser empregado para fármacos que não são solúveis nestes solventes e a agregação do polímero quando se trabalha com alta concentração do mesmo (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998a; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998b). Em vista destas limitações, uma metodologia mais recente, denominada emulsificação-difusão, a qual utiliza solventes parcialmente miscíveis em água foi desenvolvida. Através deste método, as nanopartículas são formadas, após a difusão do solvente pela adição de água, a partir de uma emulsão prévia O/A. Uma interessante vantagem deste método é o maior controle do tamanho das partículas formadas (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1996; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1997; MÜLLER, 2003; GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Outro campo de pesquisa que vem crescendo é o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas contendo nanopartículas, com a finalidade de implementar a estabilidade das formulações e, portanto, aumentar a aplicabilidade industrial destes sistemas (SCHMIDT e BODMEIER, 1999; MURAKAMI *et al.*, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2002; POHLMANN *et al.*, 2002). Para a secagem destas suspensões os métodos empregados têm sido a liofilização (CHASTEIGNER *et al.*, 1996; MOLPECERES *et al.*, 1997; SAEZ *et al.*, 2000; SCHAFFAZICK, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003b; ABDELWAHED *et al.*, 2006) e a secagem por aspersão (*spray-drying*) (GUTERRES *et al.*, 1999; MÜLLER *et al.*, 2000; WEISS, 2001; POHLMANN *et al.*, 2002).

GUTERRES e colaboradores (1999) obtiveram, através de secagem por aspersão, pós constituídos de aglomerados micrométricos de nanopartículas poliméricas, utilizando dióxido de silício coloidal como adjuvante, traduzindo-se em interessantes intermediários para a preparação de formas farmacêuticas para a administração oral (cápsulas e comprimidos). Através de microscopia eletrônica, verificou-se que estes pós são compostos por micropartículas esféricas de dióxido de silício, as quais, em aumentos maiores, apresentaram-se revestidas por nanopartículas poliméricas (MÜLLER *et al.* 2000; MÜLLER *et al.*, 2001; WEISS, 2001; MÜLLER, 2003). Além disto, OBACH (2002) avaliou a potencialidade destes sistemas em

modificar a liberação de indometacina. Recentemente, BECK e colaboradores (2004, 2005) desenvolveram uma nova aplicação para as nanopartículas, preparando micropartículas nanorrevestidas, constituídas por núcleos de dióxido de silício coloidal contendo um fármaco, os quais foram revestidos com nanopartículas através de secagem por aspersão.

Desta forma, micropartículas são sistemas, geralmente poliméricos, que apresentam diâmetros na ordem de micrômetros (THIES, 1996; BENOIT *et al.*, 1996), os quais, a exemplo dos sistemas nanoestruturados, também têm sido amplamente empregados para o controle da liberação de fármacos (CHO *et al.*, 2001; YAMADA *et al.*, 2001; Del BARRIO *et al.*, 2003), além de outras aplicações, destacando-se o aumento da biodisponibilidade de substâncias ativas (KAWASHIMA *et al.*, 1993). Ao contrário de muitos outros métodos clássicos de preparação de micropartículas, a secagem por aspersão constitui uma técnica bastante rápida para a obtenção das mesmas, em virtude de consistir de um processo de etapa única, além de ser passível de transposição de escala e aplicável a uma grande variedade de materiais, incluindo substâncias termolábeis (JAIN *et al.*, 1998), bem como apresentar uma boa aceitação na indústria farmacêutica (BROADHEAD *et al.*, 1992).

A inclusão de fármacos em formas farmacêuticas multiparticuladas traz inúmeras vantagens em potencial, quando comparadas aos sistemas unitários, destacando-se uma distribuição mais uniforme e rápida ao longo do trato gastrointestinal, menor variação da biodisponibilidade interindividual, maior reprodutibilidade de doses, bem como a redução do risco de toxicidade, quando comparadas ao rompimento de um sistema de ação prolongado do tipo unitário (*dose dumping*) (LIN *et al.*, 1991; KAWASHIMA *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1997).

A melatonina é um hormônio natural, secretado pela glândula pineal, cuja produção é controlada por impulsos gerados na retina, através de uma estrutura comumente denominada relógio biológico, responsável pelo ritmo circadiano. Em adultos jovens, a concentração de melatonina é baixa durante o dia e elevada durante a noite (BÉNÈS *et al.*, 1997; HOFFMANN *et al.*, 1998; RANG *et al.*, 2001). A partir da

última década, a utilização de melatonina exógena tornou-se bastante disseminada e está disponível, em muitos países, como produto de venda livre, sendo utilizada como automedicação ou suplemento alimentar ou, ainda, sob prescrição (ARENDRT, 2003). Formulações orais foram desenvolvidas para controlar distúrbios do ciclo circadiano, como no alívio da defasagem de tempo de longas viagens (*jet-lag*), da síndrome de mudança de trabalho, de doenças afetivas sazonais e de distúrbios do sono. O emprego de melatonina tem mostrado melhorar distúrbios do sono em pessoas cegas e em pacientes que sofrem de alguns tipos de síndromes da fase do sono retardada (LEE *et al.*, 1995; BÉNÈS *et al.*, 1997; KANDIMALLA *et al.*, 1999b; RANG *et al.*, 2001). Recentemente, alguns efeitos potenciais foram descritos para a melatonina, tais como sedativo, anticonvulsivante, analgésico, anticancerígeno, contraceptivo e antiinflamatório (BRZEZINSKI, 1997; HOFFMANN *et al.*, 1998; VIJAYALAXMI *et al.*, 2002).

Inúmeras pesquisas também têm demonstrado a potente atividade antioxidante da melatonina, atuando como seqüestradora de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes, reduzindo a atividade de enzimas pró-oxidantes e aumentando os níveis de glutathione, sendo bastante efetiva contra a lipoperoxidação (MELCHIORRI *et al.*, 1995; REITER *et al.*, 1997; MORISHIMA *et al.*, 1998; KARBOWNIK *et al.*, 2000; OSSENI *et al.*, 2000; CHUNG e HAN, 2003; SAIJA *et al.*, 2002; ORTEGA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2003; REITER, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Em vista disto, tem sido sugerido que a melatonina possui efeitos contra o envelhecimento e ação na redução dos danos causados por radicais livres associados a certas patologias, como na doença de Alzheimer, no câncer (BEYER *et al.*, 1998), em isquemia/reperfusão (TORII *et al.*, 2004) e diabetes (NISHIDA *et al.*, 2002), dentre outros.

Entretanto, a melatonina possui uma curta meia-vida biológica e apresenta uma baixa e variada biodisponibilidade oral, provavelmente devido ao importante metabolismo de primeira passagem e/ou absorção variável. Em função destas características, a melatonina não é adequada para incorporação em formas

farmacêuticas de liberação imediata convencionais (BÉNÈS *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1998). Em decorrência deste fato, sistemas de liberação controlada contendo melatonina para serem empregados por via oral (LEE *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1996a; LEE *et al.*, 1996b; HOFFMANN *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999; EL-GIBALY *et al.*, 2002, 2003), transdérmica (BÉNÈS *et al.*, 1997; KANDIMALLA *et al.*, 1999a; KANDIMALLA *et al.*, 1999b; DUBEY *et al.*, 2006), trasmucosal (BÉNÈS *et al.*, 1997) ou nasal (MAO *et al.*, 2004), têm sido desenvolvidos, tendo em vista suas diversas potencialidades terapêuticas. Dentre estes sistemas, micropartículas de álcool esteárico, de quitosana e de amido (LEE *et al.*, 1998; EL-GIBALY *et al.*, 2002; MAO *et al.*, 2004) e, recentemente, lipossomas (DUBEY *et al.*, 2006) têm sido estudados.

Considerando o exposto, este trabalho tem como proposta geral o desenvolvimento de formulações inovadoras para a administração de melatonina, baseadas em suspensões de nanopartículas poliméricas e em pós microparticulados originados destas, visando avaliar a habilidade destes sistemas na encapsulação, no controle da liberação e na atividade antioxidante da melatonina associada aos mesmos. Cabe ressaltar que a melatonina foi selecionada como fármaco em virtude de ser empregada em baixa dosagem e apresentar reduzida solubilidade em água (condições interessantes para a nanoencapsulação), ser recomendável para administração em sistemas de liberação controlada, além de ser alvo de diversos campos recentes de pesquisa, no que se refere às suas potencialidades terapêuticas. Deve-se destacar também que, até o momento da definição do trabalho, não foram encontrados relatos na literatura científica da associação de melatonina a nanopartículas. Além disto, este representa o primeiro trabalho de nosso grupo de pesquisa baseado na nanoencapsulação de uma substância antioxidante, campo ainda pouco explorado na nanotecnologia.

OBJETIVO

1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento e a caracterização de suspensões aquosas de nanopartículas contendo melatonina e a conversão das mesmas em pós, através de secagem por aspersão, bem como a avaliação da atividade antioxidante da melatonina associada a estes sistemas nanocarreadores.

2. Objetivos específicos

- Obter e caracterizar suspensões aquosas de nanocápsulas ou de nanoesferas contendo melatonina (0,5 mg/mL), com diferentes composições, através dos métodos de deposição interfacial e de nanoprecipitação, respectivamente;
- Obter, através de secagem por aspersão (*spray-drying*), micropartículas nanorrevestidas a partir das suspensões selecionadas, bem como caracterizar os produtos obtidos e avaliar o perfil de dissolução da melatonina a partir destes sistemas;
- Avaliar a estabilidade de suspensões de nanocápsulas contendo melatonina (1,5 mg/mL), durante três meses, sob diferentes condições de armazenamento, comparativamente à nanoemulsão e à nanodispersão de tensoativos;
- Realizar um delineamento fatorial do tipo 2^3 , visando a um estudo comparativo das características físico-químicas de suspensões de nanocápsulas, contendo melatonina (1,5 mg/mL), obtidas através dos métodos de deposição interfacial e de emulsificação-difusão, variando-se a composição dos sistemas;
- Estudar a estabilidade físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo ou não melatonina, obtidas através de deposição interfacial ou emulsificação-difusão;
- Avaliar *in vitro* a atividade antioxidante da melatonina (200 ou 400 μ M), associada a nanocápsulas ou a nanoesferas, contra a peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil, comparativamente à nanoemulsão e à solução do

fármaco, utilizando diferentes modelos de membranas (microsomas de fígado de rato ou lipossomas de fosfatidilcolina);

- Avaliar a capacidade antioxidante aguda *in vivo* da melatonina (1,0 ou 10,0 mg/kg) associada a nanocápsulas contra a peroxidação lipídica em cérebro (córtex frontal e hipocampo) e em fígado, após a administração intraperitoneal em camundongos saudáveis, comparativamente à solução do fármaco.

CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura

PARTE I (PUBLICAÇÃO 1): Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos

Artigo publicado na revista Química Nova

(*Quim. Nova*, vol. 26, nº 5, p. 726-737, 2003)

CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

Scheila Rezende Schaffazick e Sílvia Stanisçuaski Guterres*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre - RS

Liane de Lucca Freitas e Adriana Raffin Pohlmann

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970 Porto Alegre - RS

Recebido em 28/10/02; aceito em 27/2/03

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND STABILITY OF THE POLYMERIC NANOPARTICLE SYSTEMS FOR DRUG ADMINISTRATION. Polymeric nanoparticle systems such as nanocapsules and nanospheres present potential applications for the administration of therapeutic molecules. The physico-chemical characteristics of nanoparticle suspensions are important pre-requisites of the success of any dosage form development. The purpose of this review is to present the state of the art regarding the physico-chemical characterization of these drug carriers, in terms of the particle size distribution, the morphology, the polymer molecular weight, the surface charge, the drug content and the *in vitro* drug release profiles. Part of the review is devoted to the description of the techniques to improve the stability of colloidal systems.

Keywords: nanoparticles; polymers; characterization.

INTRODUÇÃO

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores, capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias, tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos dez anos. Dentre os vetores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas). As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento¹⁻³.

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Figura 1). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são

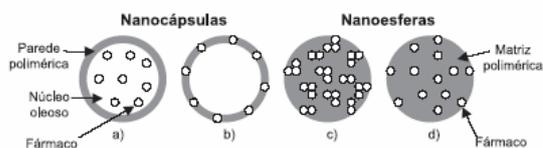


Figura 1. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas)

*e-mail: nanoc@farmacia.ufrgs.br

formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido^{2,4,5}.

Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejados, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica. Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de fármacos anticancerígenos^{2,6-8} e de antibióticos^{2,9,10}, principalmente através de administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos e, assim, um aumento do índice terapêutico. Com relação à administração oral de nanopartículas, as pesquisas têm sido direcionadas especialmente à: a) diminuição dos efeitos colaterais de certos fármacos, destacando-se os anti-inflamatórios não-esteróides (diclofenaco^{11,12}, indometacina^{13,15}), os quais causam frequentemente irritação à mucosa gastrointestinal e b) proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, como peptídeos^{16,17}, proteínas^{8,18} e/ou hormônios¹⁹, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos. Outro grande interesse nas nanopartículas é sua administração oftálmica²⁰⁻²³, visando o controle da liberação, o aumento da biodisponibilidade ocular e/ou a diminuição dos efeitos colaterais devido à absorção sistêmica de certos fármacos.

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila)²⁴⁻²⁸ ou na precipitação de polímeros pré-formados^{11,29-33}, tais como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico. A Figura 2 apresenta as principais etapas dos diferentes métodos de preparação de nanopartículas³⁴⁻³⁶. Independentemente do método de preparação os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a agregação das nanopartículas no meio, resultando na formação de precipitados^{37,38}. Além disso, problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, incluindo o fármaco, podem ocorrer³⁹⁻⁴¹. A consequência de uma estabilidade físico-química limitada, em função do tempo, constitui um obstáculo para a aplicabilidade industrial das sus-

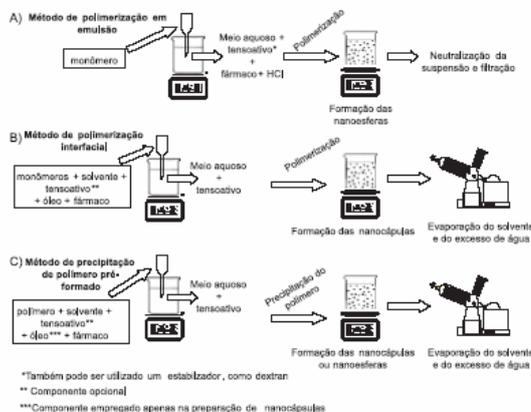


Figura 2. Métodos usuais, empregados na preparação de nanopartículas poliméricas, baseados na utilização de monômeros dispersos (A³⁴; B³⁵) ou na precipitação de polímeros pré-formados (C³⁶)

penções aquosas de nanopartículas. Neste sentido, o interesse pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de nanopartículas é um ponto de convergência das pesquisas. Os problemas de estabilidade limitada podem ser minimizados através da secagem das suspensões^{42,43}. A sublimação (liofilização) tem sido bastante utilizada para a desidratação de sistemas coloidais, principalmente lipossomas^{44,47} e nanoesferas^{38,41,48}, empregando-se um crioprotetor ou lioprotetor, geralmente um carboidrato, para evitar a agregação das partículas durante o congelamento das suspensões. Recentemente, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu um método de secagem por aspersão (nebulização) para a obtenção de pós nebulizados contendo nanopartículas poliméricas^{49,50}, utilizando como adjuvante o dióxido de silício (Aerosil 200®). Os produtos secos podem ser utilizados na obtenção de formas farmacêuticas sólidas, tais como cápsulas e comprimidos, o que é interessante sob o ponto de vista tecnológico e industrial.

Em função de sua natureza coloidal, dificuldades técnicas são encontradas na caracterização físico-química das nanopartículas. A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica, a distribuição de tamanho de partícula, a distribuição de massa molar do polímero, a determinação do potencial zeta e do pH, a determinação da quantidade de fármaco associado às nanoestruturas, a cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento^{51,52}. O conjunto de informações obtidas pela caracterização destes sistemas pode conduzir à proposição de modelos que descrevam a organização das nanopartículas em nível molecular, que será dependente da composição quali-quantitativa das formulações.

Na literatura, estão disponíveis alguns artigos de revisão referentes a nanopartículas, os quais são direcionados principalmente aos diferentes métodos de preparação^{1,2,4,5,8,29,53} e às potencialidades terapêuticas destes sistemas^{1,2,8,9,17,52,54}. Um artigo de revisão consistente sobre caracterização de nanopartículas foi publicado por Maghenhein e Benita⁵¹ e outros artigos de revisão^{1,52,55} abordam alguns aspectos da caracterização físico-química, embora estes não sejam o foco principal dos mesmos. Desta forma, artigos de revisão atualizados, direcionados especificamente à caracterização físico-química e, principalmente, voltados à proposição das formas de associação de fármacos a nanocápsulas e a nanoesferas poliméricas não são encontrados na literatura.

Este artigo tem como objetivo revisar as principais metodologias empregadas para a caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas, visando a compreensão do comportamento físico-químico destes sistemas. As proposições das formas de associação e os perfis de liberação do fármaco, a partir das estruturas coloidais poliméricas, serão enfocados. Além disso, também serão abordados estudos referentes à secagem das suspensões de nanopartículas, empregando-se liofilização ou nebulização, como estratégia para aumentar a estabilidade físico-química destes sistemas.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Avaliação morfológica

As microscopias eletrônicas de varredura⁵⁶⁻⁶⁰ (MEV) ou de transmissão^{59,61,62} (MET) têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas. A MET pode permitir também a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, possibilitando, inclusive, a determinação da espessura da parede das nanocápsulas^{63,64}. A técnica de criofratura também tem sido empregada para auxiliar na análise morfológica destes sistemas^{10,60,63,65-67}.

Um trabalho que exemplifica a utilização da MET, associada à técnica de criofratura, é o realizado por Rollet e colaboradores⁶⁵, o qual demonstrou que nanoesferas apresentam forma esférica, com estrutura polimérica sólida, ao passo que, as nanocápsulas são formadas por um fino (cerca de 5 nm) invólucro polimérico ao redor do núcleo oleoso. A utilização de microscopia eletrônica, também associada à técnica de criofratura, permitiu evidenciar a organização morfológica de nanocápsulas de poli(cianoacrilato de etila), nas quais o óleo, um triacilglicerol (Miglyol 812®), está circundado por uma parede polimérica⁶⁵.

Gouvender e colaboradores⁶⁸, através de MET, mostraram que a incorporação de quantidades baixas ou elevadas de fármaco não alterou a morfologia de nanopartículas formadas por PLA-bloco-poli(óxido de etileno). Santos-Magalhães e colaboradores³³, através de MEV, verificaram a presença de uma segunda população de partículas, com cerca de 2 µm de diâmetro, em uma suspensão de nanocápsulas de PLGA, após 3 meses da preparação, a qual apresentava diâmetro inicial de 180 ± 52 nm.

Outra técnica que tem sido empregada para caracterizar a morfologia de superfície das nanopartículas é a microscopia de força atômica⁶⁹⁻⁷², a qual fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície em nível atômico⁷². Feng e colaboradores⁶⁹ empregaram esta técnica visando um estudo morfológico mais detalhado de nanoesferas de PLGA, preparadas empregando-se diferentes emulsificantes. Através do estudo, foi verificada uma topografia complexa na superfície das partículas e, mediante a análise seccional das amostras, foi revelada a presença de pequenas cavidades e de poros.

Distribuição de tamanho de partícula

De uma forma geral, as nanopartículas obtidas através de diferentes métodos, após a preparação, apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão^{22,73,74}. Os métodos usuais para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas consistem em espectroscopia de correlação de fótons e MEV ou MET⁵². Dependendo da formulação, podem ser verificadas diferenças de tamanho de partículas conforme o método empregado na sua determinação, uma vez que a microscopia eletrônica fornece uma imagem da partícula isolada do meio, enquanto a espectroscopia

de correlação de fótons possibilita a determinação do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão⁷⁵.

Vários estudos^{10,23,39,57,63,76-78} (Tabela 1) têm sido desenvolvidos para a avaliação dos principais fatores que afetam o diâmetro das partículas de sistemas nanoestruturados. Geralmente, as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm^{37,50,75-81}, no entanto, partículas com diâmetros em torno de 60 a 70 nm⁶⁸ ou mesmo inferiores a 50 nm podem ser obtidas⁷⁷. A composição quali-quantitativa⁵⁷ e o método de preparação das nanopartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas. No caso das nanocápsulas, um fator importante, que influencia o diâmetro das partículas, é a natureza do óleo utilizado como núcleo. Os resultados são atribuídos às diferenças de viscosidade⁸², hidrofobicidade²³ ou tensão interfacial⁶⁴ das substâncias empregadas.

Outra observação relevante é que a adição de monômero à emulsão⁶³ (método de polimerização interfacial) ou, ainda, a presença do polímero²³ (método de deposição de polímero pré-formado) podem conduzir à diminuição de tamanho de partícula em relação à emulsão devido, provavelmente, à redução da energia livre interfacial do sistema, no primeiro caso, ou mediante um efeito estabilizador do polímero ao redor das gotículas, no segundo.

Empregando-se o método de polimerização *in situ*, a presença do fármaco no meio pode alterar¹⁰ ou não⁷⁷ o diâmetro médio das partículas, uma vez que esse, assim como o tipo de tensoativo em-

pregado, podem interferir ou não na síntese e deposição das cadeias oligoméricas formadas⁷⁸. A presença do fármaco no meio reacional influencia o processo de nucleação, conduzindo a partículas maiores com ampla distribuição de tamanho¹⁰. Em alguns estudos^{7,10,76,78}, quando o fármaco foi adicionado após o término da polimerização, o tamanho destas não foi alterado pela sua associação. Utilizando-se o método de precipitação de polímeros pré-formados, a presença do fármaco na fase orgânica, antes da precipitação do polímero em meio aquoso, também pode⁷³ ou não^{39,37} influenciar o diâmetro médio de partículas.

É importante mencionar que a tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas^{22,38,39}.

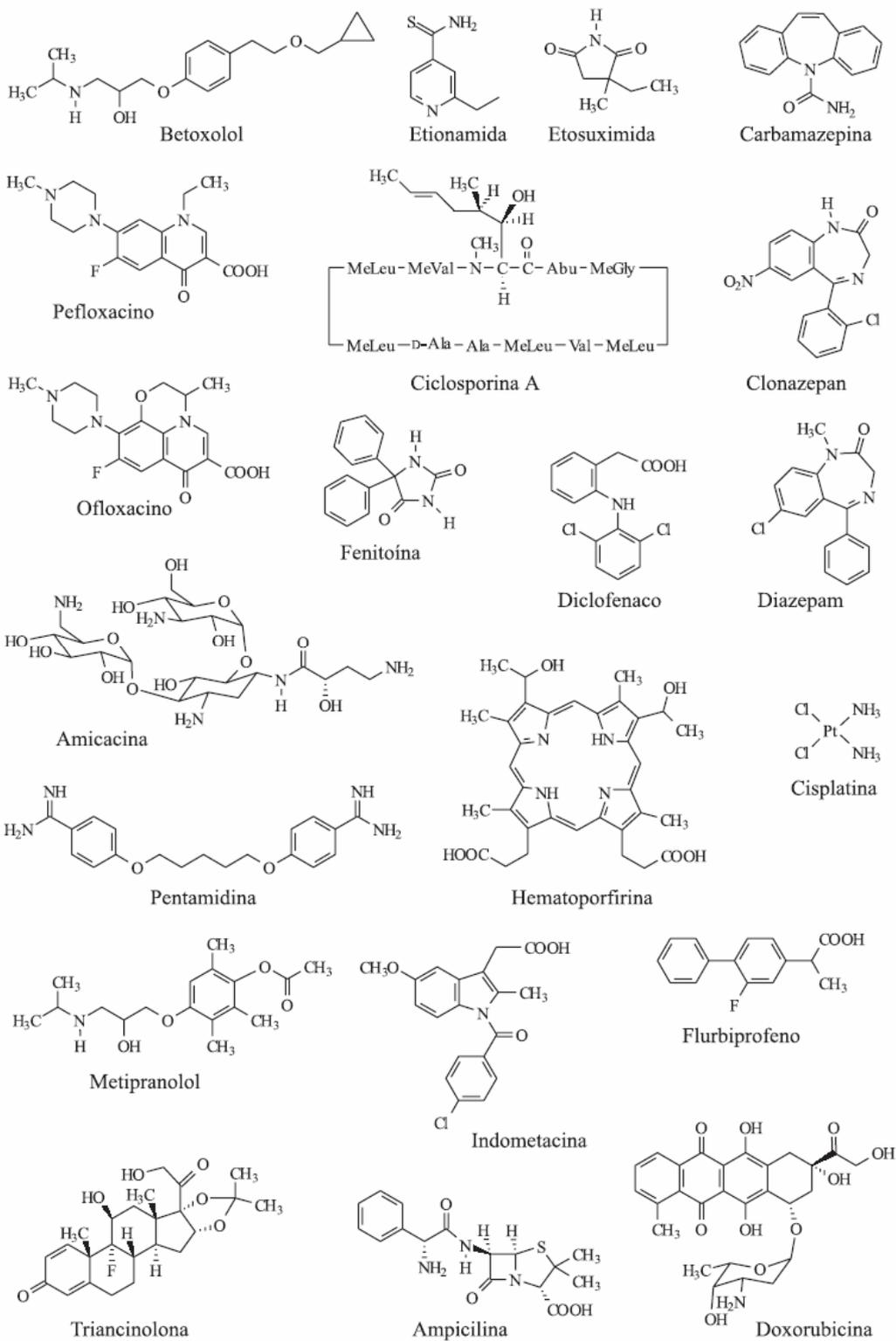
Massa molar e distribuição de massa molar do polímero

A determinação da distribuição de massa molar do polímero, após preparação, pode fornecer informações em relação à influência de componentes da formulação sobre o processo de polimerização¹⁰, sobre a ocorrência de reações químicas entre o fármaco e o polímero⁷⁷ e, ainda, sobre a degradação do polímero, em função do tempo³⁹. A técnica comumente utilizada para a determinação da distribuição de massa molar do polímero é a cromatografia de exclusão de tamanho^{39,83,84}. Outra técnica que pode ser empregada é o espalhamento

Tabela 1. Parâmetros que influenciam o diâmetro médio de nanocápsulas e de nanoesferas preparadas através de diferentes métodos

Fármaco	Polímero*	Método de preparação	Resultados	Ref.
Mesilato de pefloxacino ou Ofloxacino	PECA	polimerização em emulsão	- a presença do ofloxacino no meio de polimerização aumentou o diâmetro das NS em comparação às formulações sem fármaco, preparadas com Triton X10 [®] , Tween 80 [®] ou Pluronic F68 [®] como tensoativos - a presença do pefloxacino no meio de polimerização aumentou o diâmetro das NS apenas no caso da formulação preparada com Pluronic F68 [®]	10
Metipranolol	PCL PIBCA	precipitação de polímero pré-formado polimerização interfacial	- para ambos os métodos, as NC preparadas com Labrafil [®] apresentaram diâmetro menor que as preparadas com Miglyol 840 [®] e a concentração de óleo não influenciou o diâmetro das partículas	23
Diclofenaco	PLA	precipitação de polímero pré-formado	- as concentrações de óleo e de fármaco não influenciaram o diâmetro das NC	39
-	PLA	emulsificação-difusão	- aumento da concentração do polímero ocasionou aumento do diâmetro das NS - o aumento da velocidade de agitação e aumento da concentração do tensoativo ocasionaram redução do diâmetro das partículas	57
-	PIBCA	polimerização interfacial	- diâmetro das NC menor que o diâmetro das gotículas da nanoemulsão correspondente	63
Cloridrato de betoxolol	PIBCA	polimerização em emulsão	- adição do fármaco após a formação das NS não alterou o diâmetro	76
-	PIBCA PIHCA	polimerização em emulsão	- o aumento da concentração de HCl ou do tensoativo diminuiu o diâmetro das NS - aumento da concentração de monômero ocasionou o aumento do diâmetro das NS	77
Sulfato de amicacina	PIBCA	polimerização em emulsão	- o aumento da concentração do fármaco ocasionou o aumento do diâmetro das NS	78

*PIBCA: poli(cianoacrilato de *iso*-butila); PECA: poli(cianoacrilato de etila); PIHCA: poli(cianoacrilato de *iso*-hexila); PLA: poli(ácido láctico); PCL: poli(ϵ -caprolactona); NC: nanocápsulas; NS: nanoesferas.



de luz estático, mediante a análise da intensidade de luz espalhada pelas partículas^{10,85}.

Através da comparação da distribuição de massa molar entre nanoesferas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila) contendo ou não ampicilina, um antibiótico β -lactâmico, não foram observadas mudanças significativas neste parâmetro, após a adição do fármaco no meio reacional, levando os autores a concluir que não houve interações químicas entre a ampicilina e a macromolécula em formação⁷⁷. Por outro lado, Alonso e colaboradores⁷⁸ verificaram que a presença de sulfato de amicacina, um antibiótico aminoglicosídeo, no meio de polimerização, conduziu à obtenção de cadeias de poli(cianoacrilato de butila) com maior massa molar, em relação àquelas preparadas sem o fármaco. Fresta e colaboradores¹⁰ verificaram que oloxacino, um antibiótico fluorquinolônico, funciona como um iniciador da polimerização, conduzindo a cadeias poliméricas com menor massa molar, enquanto que o mesilato de pefloxacino foi capaz de levar à formação de cadeias poliméricas de maior massa molar, em relação às partículas obtidas na ausência destes fármacos.

Reich⁸⁶ verificou, através de estudos de distribuição de massa molar, que a estabilidade química das nanopartículas de PLA, em fluidos gástrico e intestinal artificiais, foi dependente das características do polímero e do pH do meio. E, ainda, que a distribuição de massa molar foi levemente influenciada pela presença de enzimas e/ou do tensoativo (poloxamer 188) adsorvido.

Potencial zeta

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão^{51,64}. Este parâmetro é determinado utilizando-se técnicas de eletroforese^{75,78,87}.

Os fosfolípidos (lecitinas), os poloxamers (copolímeros dos óxidos de etileno e de propileno) e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Especialmente os poliésteres, como o PLA, e as lecitinas fornecem um potencial negativo à interface, enquanto que, os poloxamers (tensoativos não-iônicos) tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro⁵². Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes.

As características de superfície das partículas também podem alterar a resposta biológica do fármaco associado. Quando se administram intravenosamente sistemas de nanopartículas convencionais, estes são rapidamente removidos da circulação sanguínea pela ação de células do sistema fagocitário mononuclear, dificultando a chegada do fármaco ao sítio de ação. Diferentes estratégias têm sido propostas para modificar a distribuição *in vivo* das nanopartículas, baseadas principalmente na redução da hidrofobicidade da superfície das partículas através da adsorção física de um polímero hidrofílico [poli(etilenoglicol)]^{1,88,89}.

Calvo e colaboradores⁸⁷ prepararam nanoemulsões e nanocápsulas de PCL, nas quais quitosana (um polissacarídeo catiônico) foi incorporada às formulações para fornecer potencial de superfície positivo às partículas ($\zeta = +37$ mV a $\zeta = +61$ mV), objetivando facilitar a interação destas com as membranas biológicas fosfolípídicas, além de prevenir a desestabilização das nanoestruturas de poliéster devido à adsorção de cátions e proteínas catiônicas presentes nos fluidos biológicos.

A determinação do potencial zeta também pode ser útil na

elucidação do mecanismo de associação de fármacos às nanopartículas^{40,78}. Um exemplo desta abordagem é o trabalho de Alonso e colaboradores⁷⁸, em que o potencial zeta de nanoesferas de poli(cianoacrilato de butila) foi determinado para se inferir sobre o mecanismo pelo qual o fármaco, sulfato de amicacina, e este polímero interagem. Desta forma, foi verificado que, quando o fármaco foi adicionado às nanopartículas em quantidades crescentes, a redução, em módulo, do potencial zeta foi concordante com o aumento da taxa de associação do fármaco. Os autores sugeriram que ocorre uma interação eletrostática entre o fármaco e o polímero.

Estudos comparativos entre nanocápsulas, nanoemulsões e nanoemulsão foram realizados para a proposição de modelos descritivos da organização destas nanopartículas. Calvo e colaboradores²² observaram os efeitos da composição das diferentes formulações sobre os valores do potencial zeta. Foi verificado que a presença da fase oleosa, nas nanocápsulas e nanoemulsões, conferiu a estas um potencial zeta mais negativo ($\zeta = -41,94$ mV e $\zeta = -42,32$ mV, respectivamente) em relação às nanoemulsões ($\zeta = -16,33$ mV). Tendo em vista a semelhança dos resultados obtidos para nanocápsulas e nanoemulsões, os autores sugeriram que a camada polimérica ao redor das gotículas de óleo seria um delgado filme polimérico. Com o mesmo objetivo, Losa e colaboradores²³ determinaram valores de potencial zeta similares para nanocápsulas e nanoemulsões, concluindo que a camada polimérica ao redor das gotículas de óleo poderia não ser contínua. Por outro lado, Mosqueira e colaboradores⁶⁴ não observaram alteração do valor do potencial zeta em função da natureza do núcleo oleoso (triglicérido dos ácidos cáprico e caprílico, succinato de diglicerila dos ácidos cáprico e caprílico, dicaprilato/dicaprato de propilenoglicol, oleato de etila, óleo mineral, dodecano, óleo de soja) utilizado para a preparação de nanocápsulas de PLA, concluindo que o óleo deveria estar completamente encapsulado pelo polímero. Além disso, sugeriram, através de comparações dos valores de potencial zeta de diferentes formulações, que a lecitina, utilizada como tensoativo, poderia estar localizada na superfície externa do polímero ou misturada com o filme polimérico ao redor do núcleo oleoso.

pH das suspensões

Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, em função do tempo. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indício de degradação do polímero^{39,90}. Em um trabalho realizado por Calvo e colaboradores²² foi verificada uma diminuição da massa molar da PCL em suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas, após 6 meses de armazenamento, com conseqüente diminuição do pH destas formulações.

No entanto, a diminuição dos valores de pH de suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo, pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster. Suspensões de nanopartículas preparadas com PCL apresentaram redução dos valores de pH, num período de 3,5 meses³⁷. Este fato foi atribuído à exposição de maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais, em função do tempo, promovida pela relaxação das cadeias poliméricas. Em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa⁹¹, a diminuição do pH de suspensões de nanocápsulas de poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) (Eudragit S90®), monitorado durante os primeiros 45 dias após a preparação, foi também atribuída à dissociação dos grupos carboxílicos, presentes como grupos pendentes no polímero, que, em função do tempo, se posicionam na interface partícula/água devido à relaxação das cadeias poliméricas.

Determinação da taxa de associação e da forma de associação do fármaco

A determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada^{1,51}. Uma técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação^{33,76,78,92}, na qual a concentração de fármaco livre, presente na suspensão, é determinada no sobrenadante, após a centrifugação. A concentração total de fármaco, por sua vez, é geralmente determinada pela completa dissolução das nanopartículas em um solvente adequado. Por conseguinte, a concentração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre. Outra técnica que também tem sido empregada é a ultrafiltração-centrifugação^{23,39,37,52}, na qual uma membrana (10 kDa) é empregada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração livre do fármaco é determinada no ultrafiltrado e a fração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada também pela subtração das concentrações total e livre.

A Tabela 2 exemplifica alguns valores de taxas de associação de diversos fármacos^{22,27,39,50,77,87,90,91,93,94} a nanocápsulas ou a nanoesferas preparadas com diferentes polímeros. De acordo com os estudos publicados, diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do fármaco^{22,39}, o pH do meio^{7,73,93,94}, as características da superfície das partículas ou a natureza do polímero¹⁸, a quantidade de fármaco adicionada à formulação⁷, a ordem de adição do fármaco na formulação, ou seja, antes (incorporação) ou após (incubação) à formação das nanoestruturas^{10,95}, a natureza do óleo utilizado³³ (no caso das nanocápsulas) e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica^{76,96}.

Modificando-se as características de superfície das partículas, é possível obter diferentes taxas de associação do fármaco por adsorção, para uma mesma concentração inicial do mesmo. Este parâmetro é provavelmente muito importante para determinar a capacidade de prolongar o tempo de ação do fármaco⁷⁶. Portanto, é relevante determinar a isoterma de adsorção de fármacos à superfície das nanopartículas, uma vez que a mesma fornece informações de como o fármaco está distribuído na superfície das partículas e, ainda, sobre a capacidade de associação do mesmo. Experimentalmente⁷⁶, em uma dada temperatura, diferentes quantidades de fármaco são adicionadas a um determinado volume de suspensão. Após estabelecido o equilíbrio, pela distribuição do fármaco entre a fase fluida e o adsorvente (nanopartículas), uma alíquota de cada mistura é ultracentrifugada e a concentração do fármaco é determinada no

sobrenadante. A isoterma de adsorção, que expressa a variação da concentração de equilíbrio no adsorvente, é obtida plotando-se os valores de concentração de equilíbrio contra os valores de fármaco adsorvido. Além disso, uma pequena variação nas quantidades adsorvidas pode induzir a grandes diferenças no perfil de liberação do fármaco, principalmente para aqueles fracamente ligados às nanopartículas^{1,95,97}.

Em relação às nanoesferas, diferentes formas de associação do fármaco são descritas, sendo relatado que este pode estar dissolvido ou disperso dentro da matriz polimérica, ou ainda que pode estar adsorvido ao polímero⁴⁵. No entanto, até o presente momento, não está clara a diferença entre a adsorção do fármaco à matriz polimérica e a sua dispersão molecular na partícula. Por outro lado, nas nanocápsulas, as quais foram desenvolvidas para aumentar a eficiência de associação de fármacos lipofílicos, estes deveriam estar encapsulados pela membrana polimérica, ou seja, dissolvidos no núcleo oleoso. Entretanto, alguns artigos relatam a possibilidade da adsorção do fármaco à parede polimérica das nanocápsulas^{4,5,52,53,98,99}. Segundo Fresta e colaboradores¹⁰, os fármacos, quando associados pelo processo de incorporação, estariam dissolvidos, dispersos, adsorvidos ou quimicamente ligados à matriz polimérica. Por outro lado, utilizando-se o método de incubação, dependendo da natureza química do fármaco e do polímero, esse poderia estar adsorvido às nanoestruturas⁹¹.

Em vista disto, outro ponto que merece destaque, é a proposição da forma de associação do fármaco às nanopartículas, a qual é bastante complexa, uma vez que os métodos disponíveis apenas determinam a concentração de fármaco associada aos sistemas, ou seja, não são capazes de diferenciar se o fármaco está adsorvido ou retido na matriz polimérica das nanoesferas, ou se está dissolvido no óleo das nanocápsulas e/ou adsorvido à parede polimérica. Neste contexto, os pesquisadores têm feito inferências a respeito da associação do fármaco às nanopartículas através de estudos comparativos de potencial zeta^{40,78}, de perfis de liberação^{91,94}, de distribuição de massa molar do polímero⁷⁷, de estudos de adsorção e/ou de taxa de associação do fármaco às nanoestruturas^{7,10,76,94,95,100}, ou, ainda, através do uso de sondas fluorescentes²⁸. A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de trabalhos nos quais foram obtidas algumas informações a respeito da provável forma de associação de fármacos^{7,28,77,91,94,95,100} às nanoestruturas, incluindo oligonucleotídeos ou peptídeos como a insulina.

Outro interessante trabalho, que objetivou a quantificação de uma fração de fármaco adsorvida à superfície das nanopartículas, foi desenvolvido por Gref e colaboradores¹⁰¹. Neste estudo, através da utilização de espectroscopia eletrônica para análise química, foi possível determinar a quantidade de ciclosporina A, um imunossupressor, presente na superfície de nanopartículas de PLA (16%) e de PLA-bloco-poli(etilenoglicol) (8%).

Tabela 2. Taxas de associação de alguns fármacos a nanopartículas poliméricas

Fármaco	Polímero*	Sistema	Método de análise	Taxa de associação (%)	Ref.
Indometacina	PCL, PLA	NC, NS	ultrafiltração	94-100	22, 93
Diclofenaco	PLA, PCL, Eudragit S90 [®]	NC, NS	ultrafiltração	100	37, 39, 50
Ciclosporina A	PCL	NS	ultracentrifugação	90-98	38
Ampicilina	PIBCA	NS	ultracentrifugação	75	77
Diazepam	PCL	NC	ultracentrifugação	92-94	87
Pentamidina	PLA	NS	ultrafiltração	48-75	90
Etionamida	Eudragit S90 [®]	NC, NS	ultrafiltração	39-62	91
Insulina	Quitosana	NS	ultracentrifugação	87-96	94

*PIBCA: poli(cianoacrilato de *iso*-butila); PLA: poli(ácido láctico); PCL: poli(ϵ -caprolactona); NC: nanocápsulas; NS: nanoesferas.

Tabela 3. Forma de associação de diferentes fármacos a nanocápsulas ou a nanoesferas poliméricas

Fármaco	Polímero*	Método de preparação	Método de análise	Forma de associação	Ref.
Hematoporfirina	PIBCA PIHCA	polimerização em emulsão	isotermas de adsorção - ultracentrifugação	- adsorção do fármaco na superfície das NS	7
Oligonucleotídeo	PIBCA	polimerização interfacial	sonda fluorescente	- dissolução do fármaco no núcleo aquoso das NC	28
Ampicilina	PIBCA	polimerização em emulsão	liberação - ultracentrifugação	- retenção do fármaco pela matriz polimérica das NS	77
Etionamida	Eudragit S90 ^b	precipitação de polímero pré-formado	liberação - ultrafiltração	- interação eletrostática do fármaco com as NC e NS	91
Insulina	Quitosana	geleificação ionotrópica	incubação - liberação - ultrafiltração	- interação eletrostática do fármaco com as NS	94
Doxorrubicina	PIBCA	polimerização em emulsão	isotermas de adsorção - centrifugação	- forte adsorção do fármaco nas NS	95
Oligonucleotídeo	MMA/EMA	polimerização radicalar	incubação - quantificação	- interação do fármaco por pares iônicos com as NS	100

*PIBCA: poli(cianoacrilato de *iso*-butila); PIHCA: poli(cianoacrilato de *iso*-hexila); MMA/EMA: copolímero de metacrilato de metila e metacrilato de monometilaminoetila; NC: nanocápsulas; NS: nanoesferas.

Calorimetria exploratória diferencial, difração de raios X e espectroscopia no infravermelho

Outras técnicas empregadas para a determinação da forma de associação do fármaco a nanopartículas incluem a calorimetria exploratória diferencial, a difração de raios X e/ou a espectroscopia no infravermelho. A seguir, serão descritos alguns exemplos do emprego destas técnicas.

Os métodos termo-analíticos, tais como calorimetria exploratória diferencial (DSC), são de grande utilidade para a análise de polímeros¹⁰², e têm sido utilizados também para investigar interações entre os polímeros e os fármacos em diversas formulações de microesferas¹⁰³ e nanopartículas^{22,79}. Deste modo, informações úteis podem ser obtidas a respeito da morfologia do polímero cristalino e sobre o estado de dispersão sólida ou molecular do fármaco associado a estes sistemas poliméricos^{51,105}. Análises através de DSC têm sido utilizadas também para estudar as interações intermoleculares entre fármacos e adjuvantes, sendo de grande utilidade em estudos de pré-formulação, na medida em que podem ser obtidas informações sobre potenciais incompatibilidades físicas ou químicas entre o fármaco e os adjuvantes¹⁰⁴. Também é possível investigar reações químicas, como polimerização, depolimerização e degradação¹⁰².

A caracterização do estado físico de indometacina associada a nanocápsulas e a nanoesferas de PCL, realizada por DSC e difração de raios X, indicou que o fármaco está disperso molecularmente na matriz polimérica²². Adicionalmente, através do uso de espectroscopia no infravermelho, foi verificada a ausência de reações químicas entre a indometacina e o polímero. Empregando-se DSC, raios X e espectroscopia no infravermelho também foi verificado que o diclofenaco sódico estaria disperso molecularmente em nanoestruturas preparadas com uréia-formaldeído¹⁰⁵. Ainda, através de DSC e raios X¹⁰⁶, foi verificado que um fármaco anti-hipertensivo dihidropiridínico estaria molecularmente disperso na matriz de nanoesferas, preparadas com PCL, PLA ou PLGA.

Além do emprego de DSC na elucidação da forma de associação dos fármacos às nanoestruturas, esta técnica também pode ser aplicada na obtenção de informações a respeito da organização de outros componentes das formulações nestes sistemas. Assim, análises por DSC¹⁰⁷ permitiram propor que o monoestearato de sorbitano,

um tensoativo, estaria dissolvido no núcleo oleoso (triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico) das nanocápsulas de PCL. No caso das nanoesferas, foi proposto um sistema bifásico polímero-tensoativo, onde o monoestearato de sorbitano estaria disperso na matriz polimérica.

CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO FÁRMACO

Segundo Soppimath e colaboradores¹, a liberação dos fármacos a partir de sistemas nanoparticulados poliméricos depende de diferentes fatores: a) da desorção do fármaco da superfície das partículas; b) da difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas; c) da difusão através da parede polimérica das nanocápsulas; d) da erosão da matriz polimérica ou e) da combinação dos processos de difusão e erosão. Métodos como a difusão em sacos de diálise^{22,37,6} e a separação baseada na ultracentrifugação^{77,96,101}, na filtração a baixa pressão¹⁰⁸ ou na ultrafiltração-centrifugação^{91,95} têm sido utilizados para este fim.

Li e colaboradores¹⁰⁹ verificaram que a albumina, utilizada como proteína modelo, associada a nanopartículas de PLGA ou de PLGA-bloco-poli(etilenoglicol) apresentou uma rápida liberação inicial, a qual pode estar relacionada com uma fração da proteína adsorvida à superfície das partículas. Numa segunda etapa, o perfil de liberação apresentou forma sustentada, atribuída à difusão da proteína através da matriz polimérica e à erosão desta. De forma semelhante, Fresta e colaboradores¹⁰ verificaram uma liberação bifásica de mesilato de pefloxacino ou ofloxacino a partir de nanoesferas de poli(cianoacrilato de etila), com uma liberação rápida inicial, seguida por uma fase de liberação muito lenta, com uma cinética de primeira ordem. A velocidade de liberação de cisplatina, um anticancerígeno, a qual também apresentou-se bifásica, foi afetada pela composição das nanopartículas. A diminuição da razão PLGA/poli(etilenoglicol) aumentou a velocidade de liberação do fármaco⁷⁴.

Bapat e Boroujerdi⁹⁵ sugeriram que a liberação de doxorubicina, uma antraciclina antineoplásica, incorporada a nanopartículas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila), pode ser controlada e dependente da taxa de erosão da partícula. Em outro estudo, a cinética de liberação de doxorubicina conjugada quimicamente ao grupo carboxílico

terminal do PLGA, através de uma ligação éster, foi sustentada, podendo ser controlada pela massa molar do polímero⁶.

A liberação de clonazepam, utilizado como fármaco modelo, associado a nanoesferas, constituídas pelo tribloco PCL-bloco-poli(etilenoglicol)-bloco-PCL seguiu aproximadamente uma cinética de pseudo ordem zero¹⁰. Quanto maior a massa molar do tribloco, mais lenta foi a cinética de liberação do fármaco, sendo esta controlada predominantemente por um mecanismo de difusão do que pela degradação do copolímero.

Em um trabalho realizado em nosso laboratório⁹¹, suspensões de nanocápsulas ou de nanoesferas de Eudragit S90[®] contendo etionamida, um tuberculostático, preparadas pela adição do fármaco antes (incorporação) ou depois (incubação) da formação das nanopartículas, tiveram seus perfis de liberação avaliados para se determinar o mecanismo de associação do fármaco aos colóides. Foi observada a liberação rápida e total do fármaco a partir das formulações obtidas por incubação e liberação de 80% e de 90% a partir das nanopartículas preparadas por incorporação. Desta forma, esta comparação levou à proposição de que o fármaco estaria majoritariamente adsorvido à superfície das partículas. Esta adsorção seria decorrente da formação de um sal entre o ácido conjugado da etionamida e os ânions carboxilatos do polímero.

Tendo em vista os estudos realizados, a cinética de liberação de fármacos a partir de nanoesferas apresenta-se, geralmente, na forma de uma exponencial (primeira ordem), provavelmente devido à difusão do fármaco da matriz polimérica para o meio e/ou à erosão da matriz polimérica, liberando o fármaco^{110,108,109,111}.

No caso das nanocápsulas, o fármaco, teoricamente dissolvido no núcleo oleoso, seria liberado desta estrutura vesicular mediante a sua difusão através da parede polimérica, podendo apresentar cinética de ordem zero¹. Neste sentido, Fresta e colaboradores⁶⁶ verificaram que os perfis de liberação de carbamazepina, etosuximida e fenitoína (anticonvulsivantes), associadas a nanocápsulas de poli(cianoacrilato de etila), seguiram aproximadamente uma cinética de ordem zero. Desta forma, o mecanismo de liberação destes fármacos corresponderia, principalmente, à difusão dos mesmos a partir do núcleo oleoso em direção à parede polimérica. Além disto, a rápida liberação inicial dos fármacos poderia, segundo os autores, ser atribuída a uma pequena quantidade destes adsorvida à superfície das partículas. Watanasrichaikul e colaboradores¹¹² também estimaram que a cinética de liberação de insulina a partir de nanocápsulas de poli(cianoacrilato de etila) segue uma cinética de ordem zero.

Por outro lado, Calvo e colaboradores²², com base na similaridade entre os perfis de liberação de indometacina, associada a nanocápsulas de PCL e à nanoemulsão, sugeriram que a parede polimérica das nanocápsulas não influencia o processo de liberação, sendo este afetado somente pela partição do fármaco entre as gotículas de óleo e o meio aquoso externo. Comparando estes resultados com o perfil de liberação da indometacina a partir de nanoesferas, a rápida liberação deste fármaco foi interpretada pelos autores como decorrente da difusão desta através da matriz polimérica. Losa e colaboradores²³, estudando a liberação de metipranolol, um β -bloqueador antiglaucoma, a partir de nanocápsulas e nanoemulsão, verificaram que não houve influência significativa da parede polimérica na liberação do fármaco, sugerindo que o passo limitante do processo de liberação do fármaco é a partição do mesmo entre as fases oleosa e aquosa. Por outro lado, Valero e colaboradores¹¹³ verificaram diferenças significativas entre a suspensão de nanocápsulas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila) e a emulsão controle, quanto aos perfis de liberação da triancinolona, principalmente durante as primeiras 10 h. Além disto, a liberação de triancinolona a partir das nanocápsulas apresentou-se bifásica, com uma rápida liberação inicial, seguida por uma fase de liberação muito lenta de primeira ordem.

ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As suspensões coloidais normalmente não possuem tendência à separação de fases, até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano. No entanto, com o tempo, pode ocorrer a aglomeração das partículas e, conseqüentemente, a sedimentação. Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos. Além disto, a avaliação da estabilidade química dos polímeros formadores dos colóides, sob diferentes condições de armazenagem, é de fundamental importância^{38,51}. O tamanho de partícula, o potencial zeta, a distribuição da massa molar do polímero, o teor de fármaco e o pH são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas^{22,23,36,39,114}. Poucos estudos referentes à estabilidade de nanopartículas contendo diferentes fármacos são encontrados na literatura^{22,23,37,38,114,115} (Tabela 4).

A aplicabilidade industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso pode ser limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química, em períodos de armazenamento prolongados. As principais limitações são a agregação das partículas, a estabilidade química do polímero, do fármaco ou de outras matérias-primas e, ainda, a liberação prematura da substância ativa^{37,39,41,51}. Além disto, é importante enfatizar que formas farmacêuticas líquidas são propensas à proliferação microbiana, havendo a necessidade de adição de conservantes¹¹⁶. Apesar disto, poucos trabalhos, relacionados a suspensões de nanopartículas, têm se preocupado em avaliar a adição de tais componentes às formulações^{117,118}.

Tendo em vista que estes problemas físico-químicos e microbiológicos possam ser retardados ou evitados através de uma operação de secagem⁴², vêm crescendo o interesse pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de nanopartículas, ampliando as perspectivas para a utilização clínica destes sistemas carreadores de fármacos^{43,50,107,119,120}. A desidratação das suspensões de nanopartículas tem sido realizada através das operações de sublimação (liofilização)^{40,41} ou de aspersão ("spray-drying" ou nebulização)^{50,107}.

Liofilizados de nanopartículas

A liofilização consiste na remoção da água (gelo) através de sublimação¹²¹⁻¹²³ e tem sido amplamente empregada para a secagem de suspensões de nanoesferas^{38,40,41,89,124-126}. Entretanto, no caso das suspensões de nanocápsulas, poucos trabalhos, utilizando esta operação, têm sido desenvolvidos^{87,99,127,128}.

Este método foi empregado para a secagem de suspensões de nanocápsulas, contendo indometacina, preparadas com PLA e benzoato de benzila como núcleo das vesículas^{127,128}. Entretanto, após a re-hidratação dos produtos liofilizados, armazenados à temperatura ambiente, mais de 50% do fármaco associado foi liberado. Gürsoy e colaboradores¹²⁸ atribuíram estes resultados a mudanças na estrutura da parede das nanocápsulas, e Chasteigner e colaboradores¹²⁷ sugeriram que, durante o estágio de congelamento, as tensões provocadas pela cristalização da água poderiam "quebrar" as nanocápsulas, ocasionando a perda do conteúdo das mesmas para a fase aquosa.

Em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa¹²⁹, experimentos de inchamento/dissolução mostraram que filmes poliméricos de PCL ou de PLA foram rapidamente dissolvidos pelo benzoato de benzila, sugerindo que, quando são empregadas estas matérias-primas, as nanopartículas formadas seriam micelas e não nanocápsulas.

Tabela 4. Estudos de estabilidade de suspensões de nanopartículas poliméricas, em função do tempo de armazenamento

Fármaco	Polímero*	Sistema	Condições de armazenagem	Resultados	Ref.
Indometacina	PCL	NC, NS	t.a. 6 meses	- taxa de associação inalterada - diminuição do pH - discreta redução do potencial zeta (NC)	22
Metipranolol	PIBCA PCL	NC	4 °C 3 meses	- potencial zeta inalterado - aumento do diâmetro médio - diminuição da taxa de associação	23
Diclofenaco	PCL Eudragit S90®	NC, NS	t.a. 3,5 meses	- redução do teor do fármaco - redução do pH - precipitação	37
Ciclosporina A	PCL	NS	8 / 25 °C 3 meses	- taxa de associação inalterada - após 4 meses formação de agregados	38
Flurbiprofeno	PCL	NS	4 / 25 / 40 °C 6 meses	- agregação após 60 dias das formulações de pH 2,67 - redução do pH e do teor de fármaco após 60 dias das formulações de pH 7,0	114
Indometacina	PCL PLA	NC, NS	t.a. / 50 °C 3 meses	- discreta redução do teor do fármaco à t.a. - acentuada redução do teor do fármaco à 50 °C	115

*PIBCA: poli(cianoacrilato de *iso*-butila); PCL: poli(ϵ -caprolactona); PLA: poli(ácido láctico); NC: nanocápsulas; NS: nanoesferas; t.a.: temperatura ambiente.

Portanto, as mudanças na estrutura da parede polimérica das nanocápsulas, propostas por Gürsoy e colaboradores¹²⁸, ocorreriam antes da etapa de congelamento, devido à dissolução do polímero pelo benzoato de benzila e as tensões provocadas pela cristalização da água, propostas por Chasteigner e colaboradores¹²⁷, ocorreriam em estruturas micelares, não ocasionando a quebra de nanocápsulas. Conseqüentemente, a operação de liofilização não pode ser rejeitada para a secagem de suspensões de nanocápsulas, quando o óleo não dissolve o polímero e a estrutura das partículas corresponde a uma vesícula.

A caracterização dos liofilizados de nanopartículas geralmente é feita após a ressuspensão do produto em água e pode envolver a observação visual do efeito Tyndall e da presença de grumos, a determinação do diâmetro de partícula, da taxa de associação do fármaco e do pH^{38,40,41,48,87,124-126}. Além disto, alguns trabalhos empregam DSC⁴¹ e microscopia eletrônica⁹⁹ para caracterizar estes sistemas.

Em artigos recentes, têm sido relatado que a presença de um crioprotetor é fundamental para a desidratação de suspensões de nanopartículas através de liofilização. Os crioprotetores mais comuns, citados na literatura são os carboidratos (glicose, sacarose, manitol, frutose), sendo os mono- e dissacarídeos os mais efetivos na manutenção das características iniciais de tamanho das partículas^{38,40,41,48,87,124-126}. Este efeito crioprotetor ou lioprotetor dos açúcares é atribuído à formação de uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando, assim, a agregação durante o congelamento, tornando-as ressuscitáveis^{41,48}.

A seleção dos carboidratos mais adequados para atuarem como crioprotetores, na liofilização de nanopartículas, tem sido feita pelo índice de redispersão, o qual é obtido pela relação entre os diâmetros médios de partícula após a ressuspensão dos liofilizados e antes da secagem. Para um adequado efeito protetor, geralmente, é necessário adicionar quantidades elevadas de carboidrato. O produto apresenta um aspecto de sólido aglomerado^{38,40,41,48,87,124-126}. Cabe ressal-

tar que, quando estas formulações são planejadas para a administração parenteral, a manutenção do tamanho médio das partículas é um fator crítico.

Em um de nossos trabalhos⁹⁹ foram obtidos pós liofilizados de micropartículas contendo nanocápsulas ou nanoesferas, destinados à administração oral, empregando-se o dióxido de silício coloidal (3% m/v) como adjuvante. Análises através de MEV dos pós liofilizados evidenciaram micropartículas não esféricas, as quais, em aumentos maiores, apresentaram-se nanorrevestidas (Figura 3). A operação de retirada da água das suspensões causa a formação das micropartículas pela deposição das nanopartículas orgânicas sobre as nanopartículas do dióxido de silício.

Nebulizados de nanopartículas

A operação de secagem por nebulização consiste na passagem da solução ou da suspensão, através de um orifício atomizador, para a câmara de secagem sob a forma de gotículas, em co-corrente, contracorrente ou fluxo misto de ar quente, que promove a rápida secagem das gotículas. As partículas sólidas secas são, então, separadas e recolhidas, podendo apresentar-se sob a forma de pós finos, granulados ou aglomerados^{123,130}.

Freitas e Müller¹³¹ empregaram a nebulização como uma alternativa à liofilização, objetivando aumentar a estabilidade de nanopartículas formadas por lipídeos sólidos, utilizando como adjuvante carboidratos (manitol, lactose, trealose, sorbitol, glicose e manose). Recentemente, nosso grupo de pesquisa⁴⁹ descreveu, pela primeira vez, o uso da nebulização para a secagem de suspensões de nanopartículas poliméricas, com intuito de implementar a estabilidade destes sistemas. Utilizando esta metodologia, a partir de suspensões aquosas de nanopartículas pode-se obter produtos pulverulentos. Esta característica torna estes produtos interessantes como intermediários no desenvolvimento de formas farmacêuticas compartimentadas como cápsulas e comprimidos^{50,107,129} de ampla

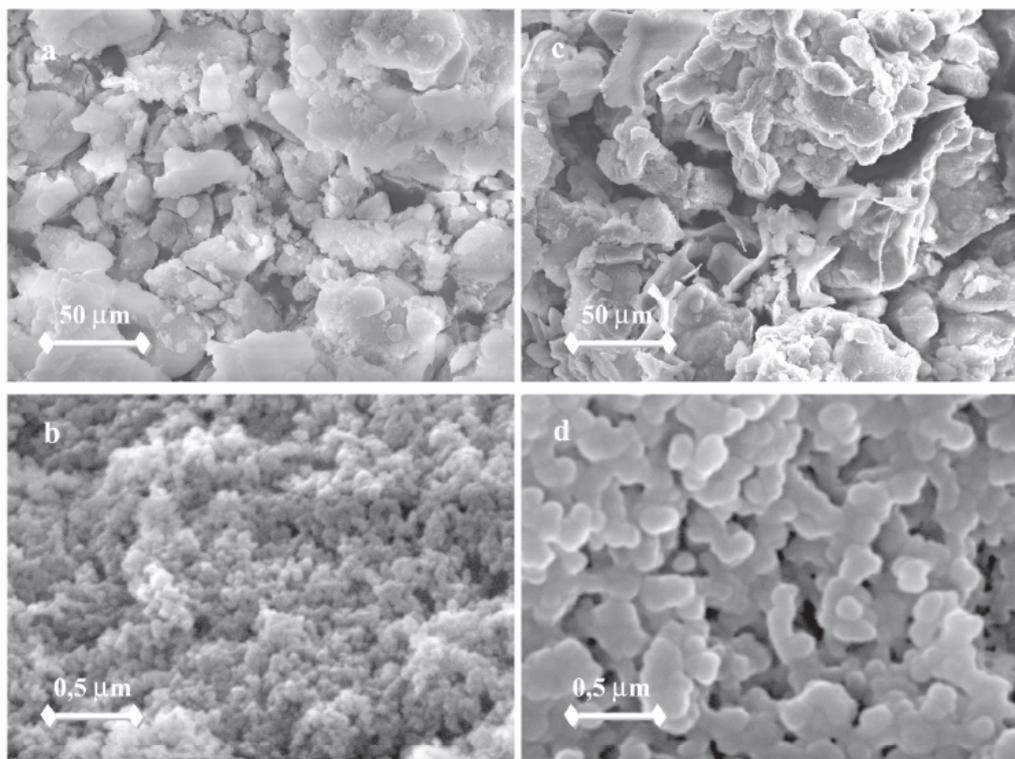


Figura 3. Fotomicrografias: comparação do liofilizado da dispersão aquosa do dióxido de silício puro (a e b) com o liofilizado de nanocápsulas de poli(*ε*-caprolactona) preparado na presença de dióxido de silício (c e d)

aplicação industrial. Os pós nebulizados têm sido caracterizados através de MEV, da determinação do teor de fármaco, do rendimento da nebulização, da umidade residual^{15,50,107,129}, da liberação *in vitro* dos fármacos associados¹⁵ e, ainda, mediante análises através de DSC¹⁰⁷. Além da caracterização físico-química, estudos farmacocinéticos¹² e avaliação da tolerância gastrointestinal^{12,15}, em ratos, de antiinflamatórios não-esteróides associados a nanopartículas nebulizadas, têm sido realizados. A MEV tem sido empregada para a observação de nanopartículas adsorvidas à superfície do adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal), após a secagem das suspensões através de nebulização ("spray-drying")^{50,107,129}. Foi possível evidenciar a presença de micropartículas de dióxido de silício revestidas por nanocápsulas, preparadas com PCL ou Eudragit S90® e Miglyol 810® (óleo), cujos diâmetros apresentavam-se semelhantes aos das partículas em suspensão aquosa, antes da secagem⁵⁰. Por outro lado, para pós nebulizados de nanoesferas de PCL não foram observadas nanopartículas, com tamanho semelhante às suspensões de origem, adsorvidas à superfície do dióxido de silício, sugerindo que a operação de secagem por "spray-drying" causou uma alteração na organização das nanoesferas de PCL^{107,115}. Estes estudos mostram a possibilidade de preparação de forma controlada de pós microparticulados nanorevestidos⁴⁹.

CONCLUSÃO

A compreensão do comportamento físico-químico das nanopartículas poliméricas é objeto de inúmeras pesquisas, sendo que as principais dificuldades encontradas, para a caracterização dos

mesmos, são conseqüências do tamanho reduzido destas partículas. A caracterização físico-química desses sistemas só é possível mediante a combinação de diversas técnicas de análise. Um dos maiores desafios, que ainda persiste, é a elucidação da forma de associação dos fármacos a estas nanopartículas, visando a otimização da taxa de associação e a compreensão dos fatores que influenciam o perfil de liberação dos fármacos. Entretanto, algumas generalizações podem ser assumidas com base na análise dos resultados específicos, produzidos pela ampla gama de trabalhos publicados empregando diferentes fármacos, composição de adjuvantes e tipos de sistemas coloidais. Ainda que, de uma forma geral, as nanopartículas poliméricas apresentem uma distribuição unimodal com baixo índice de polidispersão, seus diâmetros médios podem ser fundamentalmente dependentes da composição quali-quantitativa dos sistemas, bem como do método e condições operacionais de preparação. Estes mesmos fatores, somados à solubilidade e partição do fármaco nos sistemas, influenciam os teores e as taxas de associação. As formas de associação dos fármacos dependem do tipo de interações destes com o polímero e o óleo, no caso de nanocápsulas, não sendo estritamente dependente do coeficiente de partição do fármaco entre a fase oleosa e a aquosa. Quando interações iônicas entre o fármaco e o polímero podem se estabelecer, mesmo que o primeiro seja lipofílico, a adsorção parece ser a forma de associação preferencial. Diversos avanços têm sido alcançados, tanto no acúmulo de informações relativas aos fenômenos físico-químicos envolvidos, quanto em relação ao desenvolvimento de formulações de nanopartículas mais estáveis, o que têm ampliado as perspectivas de emprego clínico destes sistemas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERGS, à PROPESQ-UFRGS e ao CNPq/MCT.

REFERÊNCIAS

- Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E.; *J. Controlled Release* **2001**, *70*, 1.
- Puisieux, F.; Barrat, G.; Couarraze, G.; Couvreur, P.; Devissaguet, J-P.; Dubernet, C.; Fattal, E.; Fessi, H.; Vauthier, C.; Benita, S. Em *Polymeric Biomaterials*; Dumitriu, S., ed.; Marcel Dekker: New York, 1994. cap. 16.
- Benoit, J. P.; Couvreur, P.; Devissaguet, J. P.; Fessi, H.; Puisieux, F.; Roblot-Treupel, L.; *J. Pharm. Belg.* **1986**, *41*, 319.
- Vauthier-Holtzschcherer, C.; Benabbou, S.; Spenlehauser, G.; Veillard, M.; Couvreur, P.; *S.T.P. Pharma Sci.* **1991**, *1*, 109.
- Allémann, E.; Gurny, R.; Doelker, E.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1993**, *39*, 173.
- Yoo H. S.; Lee K. H.; Oh J. E.; Park T. G.; *J. Controlled Release* **2000**, *68*, 419.
- Brasseur, N.; Brault, D.; Couvreur, P.; *Int. J. Pharm.* **1991**, *70*, 129.
- Couvreur, P.; Dubernet, C.; Puisieux, F.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995**, *41*, 2.
- Pinto-Alphandary, H.; Andremont, A. Couvreur, P.; *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *13*, 155.
- Fresta, M.; Puglisi, G.; Giammona, G.; Cavallaro, G.; Micali, N.; Furneri, P. M.; *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 895.
- Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-P.; *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 1.
- Guterres, S. S.; Muller, C. R.; Michalowski, C. B.; Pohlmann, A. R.; Dalla Costa, T.; *S.T.P. Pharma Sci.* **2001**, *11*, 229.
- Ammoury, N.; Dubrasquet, M.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; Benita, S.; *Clinical Materials* **1993**, *13*, 121.
- Ammoury, N.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Dubrasquet, M.; *S. T. P. Pharma Sci.* **1989**, *5*, 537.
- Obach, E. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.
- Jung, T.; Kamm, W.; Breitenbach, A.; Kaiserling, E.; Xiao, J. X.; Kissel, T.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 147.
- Allémann, E.; Leroux, J-C.; Gurny, R.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *34*, 171.
- Vila, A.; Sánchez, A.; Tobío, M.; Calvo, P.; Alonso, M. J.; *J. Controlled Release* **2002**, *78*, 15.
- Hillery, A.M.; Toth, I.; Florence, A. T.; *J. Controlled Release* **1996**, *42*, 65.
- Ding, S.; *PSTT* **1998**, *1*, 328.
- Le Bourlais, C. A.; Treupel-Acar, L.; Rhodes, C. T.; Sado, P. A.; Leverge, R.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1995**, *21*, 19.
- Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 530.
- Losa, C.; Marchal-Heussler, L.; Orallo, F.; Vila Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 80.
- Gallardo, M. M.; Couarraze, G.; Denizot, B.; Treupel L.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; *Int. J. Pharm.* **1993**, *100*, 55.
- Chouinard, F.; Buczkowski, S.; Lenaerts, V.; *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 869.
- Lenaerts, V.; Labib, A.; Choinard, F.; Rousseu, J.; Ali, H.; van Lier, J.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995**, *41*, 38.
- Sakuma, S.; Suzuki, N.; Kikuchi, H.; Hiwatari, K-I.; Arikawa, K.; Kishida, A.; Akashi, M.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *149*, 93.
- Lambert, G.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H.; Gulik, A.; Couvreur P.; *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 707.
- Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 1113.
- Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H.; *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275*, 640.
- Marchais, H.; Benali, S.; Irache, J. M.; Tharasse-Bloch, C.; Lafont, O.; Orecchioni, A. M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 883.
- Espuelas, M. S.; Legrand, P.; Irache, J. M.; Gamazo, C.; Orecchioni, A. M.; Devissaguet, J-Ph.; Ygartua, P.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *158*, 19.
- Santos-Magalhães, N. S.; Pontes, A.; Pereira, V. M. W.; Caetano, M. N. P.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *208*, 71.
- Couvreur, P.; Roland, M.; Speiser, P.; *US pat.* **4,329,332** **1982**.
- Al Khouri-Fallouh, N.; Roblot-Treupel, L.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; *Int. J. Pharm.* **1986**, *28*, 125.
- Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-Ph.; Ammoury, N.; Benita, S.; *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, r1.
- Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; De Lucca Freitas, L.; Guterres, S. S.; *Acta Farm. Bonaerense* **2002**, *21*, 99.
- Molpeceres, J.; Aberturas, M. R.; Chacon, M.; Berges, L.; Guzman, M.; *J. Microencapsulation* **1997**, *14*, 777.
- Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; *Int. J. Pharm.* **1995**, *113*, 57.
- Chasteigner, S.; Cavé, G.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; *Drug Dev. Res.* **1996**, *38*, 116.
- Saez, M.; Guzman, M.; Molpeceres, J.; Aberturas, M. R.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 379.
- Franks, F. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *45*, 221.
- Schmidt, C.; Bodmeier, R.; *J. Controlled Release* **1999**, *57*, 115.
- Ausborn, M.; Schreier, H.; Brezesinski, G.; Fabian, H.; Meyer, H. W.; Nuhn, P.; *J. Controlled Release* **1994**, *30*, 105.
- Bendas, G.; Schubert, K.; Nuhn, P.; *Pharmazie* **1998**, *53*, 43.
- Zingel, C.; Sachse, A.; Robling, G. L.; Muller, R. H.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *140*, 13.
- Suzuki, T.; Komatsu, H.; Miyajima, K.; *Biochimica et Biophysica Acta* **1996**, *1278*, 176.
- Konan, Y.; Gurny, R.; Allémann, E.; *Int. J. Pharm.* **2002**, *233*, 239.
- Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Dalla Costa, T.; Bassani, V.; Müller, C. R.; *Br PI* **9906081-7** **1999**.
- Muller, C. R.; Bassani, V. L.; Pohlmann, A. R.; Michalowski, C. B.; Petrovick, P. R.; Guterres, S. S.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2000**, *26*, 343.
- Magenheim, B.; Benita, S.; *S.T.P. Pharma Sci.* **1991**, *1*, 221.
- Legrand, P.; Barratt, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; *S.T.P. Pharma Sci.* **1999**, *9*, 411.
- Montasser, I.; Briançon, S.; Lieto, J.; Fessi, H.; *J. Pharm. Belg.* **2000**, *55*, 155.
- Brannon-Peppas, L.; *Int. J. Pharm.* **1995**, *116*, 1.
- Roblot-Treupel, L.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; *Chimicaoggi* **1988**, *37*.
- Horisawa, E.; Kubota, K.; Tuboi, I.; Sato, K.; Yamanoto, H.; Takeuchi, H.; Kawashima, Y.; *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 132.
- Quintanar-Guerrero, D.; Fessi, H.; Allémann, E.; Doelker, E.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *143*, 133.
- Berton, M.; Allémann, E.; Stein, C. Y. A.; Gurny, R.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **1999**, *9*, 163.
- Jeon, H.-J.; Jeong, Y.-I.; Jang, M.-K.; Park, Y.-H.; Nah, J.-W.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *207*, 99.
- Watanasrichaikul, S.; Davies, N. M.; Rades, T.; Tucker, I. G.; *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 684.
- Skiba, M.; Nemati, F.; Puisieux, F.; Duchêne, D.; Wouessidjewe, D.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *145*, 241.
- Yoo, H. S.; Oh, J. E.; Lee, K. H.; Park, T. G.; *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1114.
- Rollot, J. M.; Couvreur, P.; Roblot-Treupel, L.; Puisieux, F.; *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75*, 361.
- Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barratt, G.; *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 614.
- Palumbo, M.; Russo, A.; Cardile, V.; Renis, M.; Paolino, D.; Puglisi, G.; Fresta, M.; *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 71.
- Fresta, M.; Cavallaro, G.; Giammona, G.; Wehrli, E.; Puglisi, G.; *Biomaterials* **1996**, *17*, 751.
- Puglisi, G.; Fresta, M.; Giammona, G.; Ventura, C. A.; *Int. J. Pharm.* **1995**, *125*, 283.
- Govender, T.; Riley, T.; Ehtezazi, T.; Garnett, M. C.; Stolnik, S.; Illum, L.; Davis, S. S.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *199*, 95.
- Feng, S-S.; Huang, G.; *J. Controlled Release* **2001**, *71*, 53.
- Ferdous, A. J.; Stenbridge, N. Y.; Singh, M.; *J. Controlled Release* **1998**, *50*, 71.
- Olbrich, C.; Bakowsky, U.; Lehr, C-M.; Müller, R. H.; Kneuer, C.; *J. Controlled Release* **2001**, *77*, 345.
- Mu, L.; Feng, S-S.; *J. Controlled Release* **2002**, *80*, 129.
- Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S.; *J. Controlled Release* **1999**, *57*, 171.
- Avgoustakis, K.; Beletsi, A.; Panagi, Z.; Klepetsanis, P.; Karydas, A. G.; Ithakissios, D. S.; *J. Control. Release* **2002**, *79*, 123.
- Hoffmann, F.; Cinatl Jr., J.; Kabicková, H.; Cinatl, J.; Kreuter, J.; Stieneker, F.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *157*, 189.
- Marchal-Heussler, L.; Maicent, P.; Hoffman, M.; Spittler, J.; Couvreur, P.; *Int. J. Pharm.* **1990**, *58*, 115.
- Seijo, B.; Fattal, E.; Treupel, L. R.; Couvreur, P.; *Int. J. Pharm.* **1990**, *62*, 1.
- Alonso, M. J.; Losa, C.; Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; *Int. J. Pharm.* **1991**, *68*, 69.
- Gamisans, F.; Lacoulonche, F.; Chauvet, A.; Espina, M.; Garcia, M. L.; Egea, M. A.; *Int. J. Pharm.* **1999**, *179*, 37.

80. De Jaeghere, F.; Allémann, E.; Kubel, F.; Galli, B.; Cozens, R.; Doelker, E.; Gurny, R.; *J. Controlled Release* **2000**, *68*, 291.
81. Araujo, L.; Sheppard, M.; Löbenberg, R.; Kreuter, J.; *Int. J. Pharm.* **1999**, *176*, 209.
82. Yu, W.; Tabosa do Egito, E. S.; Barratt, G.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; *Int. J. Pharm.* **1993**, *89*, 139.
83. Soma, C. E.; Dubernet, C.; Bentolila, D.; Benita, S.; Couvreur, P.; *Biomaterials* **2000**, *21*, 1.
84. Breton, P.; Guillon, X.; Roy, D.; Lescure, F.; Riess, G.; Bru, N.; Roques-Carmes, C.; *Biomaterials* **1998**, *19*, 271.
85. Puglisi, G.; Giammona, G.; Fresta, M.; Carlisi, B.; Micali, N.; Villari, A.; *J. Microencapsulation* **1993**, *10*, 353.
86. Reich, G.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 1191.
87. Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275*, 46.
88. Calvo, P.; Gouritin, B.; Chacun, H.; Desmaële, D.; D'Angelo, J.; Noel, J-P.; Georin, D.; Fattal, E.; Andreux, J. P.; Couvreur, P.; *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1157.
89. De Jaeghere, F.; Allemann, E.; Leroux, J-C.; Stevels, W.; Feljen, J.; Doelker, E.; Gurny, R.; *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 859.
90. Paul, M.; Fessi, H.; Laatiris, A.; Boulard, Y.; Durnad, R.; Deniau, M.; Astier, A.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *159*, 223.
91. Lopes, E. C.; Pohlmann, A. R.; Bassani, V.; Guterres, S. S.; *Pharmazie* **2000**, *55*, 527.
92. Tiyafoonchai, W.; Woiszwill, J.; Middaugh, R.; *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 902.
93. Weiss, V.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2001.
94. Fernández-Urrusuno, R.; Calvo, P.; Remunán-López, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1576.
95. Bapat, N.; Boroujerdi, M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1992**, *18*, 65.
96. Fontana, G.; Pitarresi, G.; Tomarchio, V.; Carlisi, B.; San Biagio, P. L.; *Biomaterials* **1998**, *19*, 1009.
97. Benoit, E.; Prot, O.; Maincent, P.; Bessièrre, J.; *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 585.
98. Barichello, J. M.; Morishita, M.; Takayama, K.; Nagai, T.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 471.
99. Schaffazick, S. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2001.
100. Zobel, H-P.; Junghans, M.; Maienschein, V.; Werner, D.; Gilbert, M.; Zimmermann, H.; Noe, C.; Kreuter, J.; Zimmer, A.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *49*, 203.
101. Gref, R.; Quellec, P.; Sanchez, A.; Calvo, P.; Dellacherie, E.; Alonso, M. J.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2001**, *51*, 111.
102. Gedde, U. W.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1990**, *16*, 2465.
103. Barkai, A.; Pathak, Y. V.; Benita, S.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1990**, *16*, 2057.
104. Venkataram, S.; Khohlokwane, M.; Wallis, S. H.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1995**, *21*, 847.
105. Kulkarni, A. R.; Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; *J. Microencapsulation* **2000**, *17*, 449.
106. Verger, M. L. L.; Fluckiger, L.; Kim, Y-I.; Hoffman, M.; Maincent, P.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 137.
107. Muller, C. R.; Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Lucca Freitas, L.; Pesce Da Silveira, N.; Dalla Costa, T.; Guterres, S. S.; *Pharmazie* **2001**, *56*, 864.
108. Magenheim, B.; Levy, M. Y.; Benita, S.; *Int. J. Pharm.* **1993**, *94*, 115.
109. Li, Y-P.; Pei, Y-Y.; Zhang, X-Y.; Gu, Z-H.; Zhou, Z-H.; Yuan, W-F.; Zhou, J-J.; Zhu, J-H.; Gao, X-J.; *J. Controlled Release* **2001**, *71*, 203.
110. Ryu, J-G.; Jeong, Y-II.; Kim, I-S.; Lee, J-H.; Nah, J-W.; Kim, S-H.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *200*, 231.
111. Radwan, M. A.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1995**, *21*, 2371.
112. Watanasrichaikul, S.; Rades, T.; Tucker, I. G.; Davies, N. M.; *Int. J. Pharm.* **2002**, *235*, 237.
113. Valero, J.; Egea, M. A.; Espina, M.; Gamisans, F.; Garcia, M. L.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1996**, *22*, 167.
114. Lacoulonche, F.; Gamisans, F.; Chauvet, A.; Garcia, M. L.; Espina, M.; Egea, M. A.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 983.
115. Pohlmann, A. R.; Weiss, V.; Mertins, O.; Pesce da Silveira, N.; Guterres, S. S.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *16*, 305.
116. Le Hir, A.; *Pharmacie Galénique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments*, 7^{me} ed., Masson: Paris, 1997.
117. Masson, V.; Maurin, F.; Devissaguet, J-Ph.; Fessi, H.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *139*, 113.
118. Schöler, N.; Zimmermann, E.; Katzfey, U.; Hahn, H.; Müller, R. H.; Liesenfeld, O.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 235.
119. Murakami, H.; Kobayashi, M.; Takeuchi, H.; Kawashima, Y.; *J. Controlled Release* **2000**, *67*, 29.
120. Pinto, J. F.; Müller, R. H.; *Pharmazie* **1999**, *54*, 506.
121. Lachman, L.; Lieberman, H. A.; Kanig, J. L. K.; *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 3rd ed., Lea & Febiger: Philadelphia, 1986.
122. Adams, G. D. J.; *Drying Technology* **1991**, *9*, 891.
123. Pombeiro, A. J. L. O.; *Técnicas e operações unitárias em química laboratorial*, 3^a ed., Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1998.
124. Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar, A.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E.; *J. Microencapsulation* **1998**, *15*, 107.
125. Schwarz, C.; Mehnert, W.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *157*, 171.
126. Zimmermann, E.; Müller, R. H.; Mäder, K.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 211.
127. Chasteigner, S.; Fessi, H.; Cavé, G.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; *S.T.P. Pharma Sci.* **1995**, *5*, 242.
128. Gürsoy, A.; Eroglu, L.; Ulutin, S.; Tasyurek, M.; Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-Ph.; *Int. J. Pharm.* **1989**, *52*, 101.
129. Guterres, S. S.; Weiss, V.; Lucca Freitas, L.; Pohlmann, A. R.; *Drug Delivery* **2000**, *7*, 195.
130. Broadhead, J.; Rouan, S. K. E.; Rhodes, C. T.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1992**, *18*, 1169.
131. Freitas, C.; Muller, R. H.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 145.

PARTE II: Continuação da revisão de literatura

1.1 Métodos de preparação das nanopartículas poliméricas

Existem vários métodos relatados para a preparação de sistemas constituídos por nanopartículas poliméricas que podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados (ALLÉMANN *et al.*, 1993; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998a; PINTO REIS *et al.*, 2006).

1.1.1 Polimerização de monômeros dispersos

COUVREUR e colaboradores, em 1982, desenvolveram nanoesferas constituídas por poli(cianoacrilato de alquila), as quais são preparadas por um processo de polimerização em emulsão, em que gotas de um monômero insolúvel em água são emulsificadas em uma fase aquosa ácida, contendo geralmente um tensoativo não-iônico ou um estabilizador. Empregando-se este método, geralmente, são obtidas nanoesferas com cerca de 200 nm (VAUTHLER-HOLTZSCHERER *et al.*, 1991; ALLÉMANN *et al.*, 1993; PUISIEUX *et al.*, 1994; MONTASSER *et al.*, 2000).

Por sua vez, AL KHOURI e colaboradores (1986) desenvolveram uma técnica de polimerização interfacial de monômeros (cianoacrilatos de alquila), para a preparação de nanocápsulas, com o objetivo de aumentar a eficiência da associação de fármacos lipofílicos. Esta técnica consiste na mistura de uma fase orgânica com uma fase aquosa. A fase orgânica é uma solução etanólica, que contém o monômero, um óleo, um tensoativo opcional e o fármaco lipofílico a ser encapsulado. Esta fase é lentamente injetada na fase aquosa, que contém um tensoativo não-iônico, sob agitação. A suspensão de nanocápsulas resultante possui partículas com diâmetro médio de 200 nm a 300 nm, com taxas de associação de 100 % para fármacos lipofílicos (ROBLOT-TREUPEL *et al.*, 1988; VAUTHLER-HOLTZSCHERER *et al.*, 1991; ALLÉMANN *et al.*, 1993).

Entretanto, os métodos que utilizam a polimerização *in situ* apresentam como desvantagem a presença de monômeros e oligômeros residuais, que possuem toxicidade em potencial, além da possibilidade de ocorrerem reações entre o fármaco e

o monômero, fato que pode dificultar o controle da massa molecular do polímero resultante, assim como pode inviabilizar a liberação da substância ativa. Por estas razões, as técnicas baseadas na utilização de polímeros pré-formados, bem definidos, têm recebido mais atenção (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998b).

1.1.2. Métodos baseados na utilização de polímeros pré-formados

Em 1986, FESSI e colaboradores propuseram o método de nanoprecipitação, no qual a mistura de um solvente miscível com a água (geralmente acetona ou etanol), contendo o fármaco a encapsular, um polímero [poli (ácido lático), poli(ϵ -caprolactona) ou poli(metacrilatos de metila)] e um tensoativo opcional, é vertida sobre um solvente que não dissolve o polímero (uma fase aquosa adicionada de tensoativo). As nanopartículas são formadas instantaneamente pela rápida difusão do solvente, o qual é removido por pressão reduzida. O mecanismo de formação das nanoesferas pode ser explicado pela turbulência interfacial gerada durante o deslocamento do solvente, devido à mútua miscibilidade entre este e a água. As gotas de solvente, provavelmente de tamanho nanométrico, são estabilizadas pelo tensoativo até que a difusão do solvente se complete, ocorrendo a agregação do polímero. Obtêm-se nanoesferas com diâmetro médio de 200 nm por este método (PUISIEUX *et al.*, 1994; ROBLOT-TREUPEL *et al.*, 1988; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998a; MONTASSER *et al.*, 2000).

Em trabalho posterior, FESSI e colaboradores (1989) adaptaram o método de nanoprecipitação para a obtenção de nanocápsulas, adicionando-se um óleo (Miglyol[®] ou benzoato de benzila) à fase orgânica (deposição interfacial). Em geral, as taxas de encapsulação obtidas são elevadas para fármacos lipofílicos. A formação das nanocápsulas baseia-se no fato de que quando a fase orgânica, contendo o polímero e o óleo, é vertida na fase aquosa (não-solvente), as vesículas são formadas por emulsificação espontânea, enquanto o solvente difunde no não-solvente. Assim, o polímero, insolúvel tanto no óleo quanto no não-solvente, é dessolvatado na interface dos dois componentes imiscíveis. Os tensoativos não são essenciais para a formação

das nanopartículas, mas são importantes para a estabilização da suspensão, de forma a prevenir a aglomeração das partículas, durante o armazenamento (PUISIEUX *et al.*, 1994; CALVO *et al.*, 1996; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998a). Segundo GALINDO-RODRIGUEZ e colaboradores (2004) o mecanismo de formação das nanopartículas, por nanoprecipitação, pode ser descrito através das interações entre água-solvente, água-polímero e solvente-polímero. Assim, as interações água/solvente e o movimento de difusão do solvente exercem uma importante função para explicar a variação de tamanho de partícula durante a preparação. Além disto, o aumento da concentração do polímero na fase orgânica resultou em aumento no tamanho das partículas formadas, pois uma fase orgânica mais viscosa proporcionaria uma mais alta resistência à transferência de massa, levando a uma difusão mais lenta da fase solvente/polímero, obtendo-se nanopartículas maiores. Em geral, os solventes que apresentam alta afinidade pela água tendem a promover a difusão do solvente e partição das cadeias poliméricas na fase aquosa, levando à formação de partículas menores (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

MÜLLER (2003) demonstrou a possibilidade de produção de suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo diclofenaco em escala piloto através de nanoprecipitação, com diâmetro médio de 201 ± 86 nm, valor este superior ao produzido em escala laboratorial de 100 mL (113 ± 2 nm).

Entretanto, o método de nanoprecipitação apresenta algumas limitações, tais como a impossibilidade de ser usado para fármacos que não são solúveis nestes solventes (miscíveis com a água) e a dificuldade de escolha do sistema fármaco/polímero/solvente/não-solvente, em que as partículas possam ser formadas e a substância ativa eficientemente encapsulada (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998a; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998b; AHLIN *et al.*, 2002).

ALLEMANN e colaboradores (1992) adaptaram um método utilizado para preparar pseudolátex, cujo princípio consiste na separação de um solvente, miscível em água (acetona), da solução aquosa através de um efeito *salting-out*. O polímero e o fármaco são dissolvidos em acetona e esta solução é emulsificada sob agitação

vigorosa em um gel aquoso contendo o agente de *salting-out* (cloreto de magnésio, de sódio ou de cálcio) e o estabilizador coloidal. A emulsão O/A formada é diluída com suficiente volume de água, a fim de aumentar a difusão da acetona na fase aquosa, induzindo a formação das nanoesferas. GALINGO-RODRIGUEZ e colaboradores (2004) sugeriram que uma nanopartícula é formada a partir de uma gota de emulsão, e assim, o tamanho da gota de emulsão diretamente determina o tamanho das nanopartículas formadas por *salting-out*.

Emulsificação-difusão, uma técnica mais recente, foi desenvolvida por LEROUX e colaboradores, em 1995, na qual nanoesferas foram preparadas utilizando-se um solvente parcialmente miscível com a água (álcool benzílico) e álcool polivinílico ou gelatina como estabilizadores. Este método é uma modificação do *salting-out*, que apresenta a vantagem de evitar o uso de sais e, portanto, elimina a necessidade de purificação intensiva (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998a). QUINTANAR-GUERRERO e colaboradores (1996), empregando carbonato de propileno como solvente parcialmente miscível com a água, avaliaram a influência de diferentes tensoativos não-iônicos e de outros estabilizadores na obtenção de nanoesferas de poli(ácido láctico). Verificaram que tamanho das nanopartículas obtidas é influenciado principalmente pela velocidade de emulsificação, tipo e concentração do tensoativo/agente estabilizante e do polímero. Estes resultados foram corroborados por KWON e colaboradores (2001), ao prepararem nanopartículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), através do mesmo método. Aumentando-se a velocidade de agitação, existe uma tendência à diminuição do tamanho das partículas formadas e a maior uniformidade de distribuição de tamanho. Da mesma forma, o aumento no tempo de agitação ocasiona tamanho de partícula e polidispersão menores. A diminuição do tamanho de partícula também pode ser obtida com a diminuição da concentração de polímero, devido a uma redução da viscosidade (COLOMBO *et al.*, 2001), e com o aumento da concentração do agente estabilizador (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

O método de emulsificação-difusão, diferentemente do método de nanoprecipitação (Figura 1), baseia-se na formação inicial de uma emulsão O/A, a

partir de um polímero e um fármaco em um solvente parcialmente miscível em água (fase interna) e de uma dispersão aquosa de um tensoativo (poloxamer 188) ou de outro estabilizador (gelatina, álcool polivinílico) (fase externa). Antes da formação da emulsão, ocorre saturação mútua entre a água e o solvente orgânico, para atingir o equilíbrio termodinâmico inicial de ambos os líquidos. Após a formação da emulsão, o solvente orgânico é deslocado para fase externa pela adição de um excesso de água, formando nanoesferas. Esta fase de diluição da emulsão deve ter uma agitação apenas suficiente para homogeneizar a mistura. Após, dependendo do ponto de ebulição, o solvente pode ser eliminado por destilação ou por filtração (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1996; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1997; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998a; COLOMBO *et al.*, 2001). Este método foi patenteado por QUINTANAR-GUERRERO e colaboradores (1999). Segundo estes autores, o mecanismo de formação das nanopartículas, através deste método, seria baseado na difusão do solvente a partir dos glóbulos, formados na etapa de emulsificação, carreando as moléculas de polímero para a fase aquosa, formando, assim, regiões de supersaturação, originando novos glóbulos e agregados de polímero. O sucesso do método depende da estabilidade e do tamanho das gotículas, produzidas no estágio inicial do processo (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1996; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1997). KWON e colaboradores (2001) também vincularam o processo de formação das nanopartículas, preparadas através do mesmo método, à diminuição do tamanho dos glóbulos formados, devido à rápida difusão do solvente. Por outro lado, CHOI e colaboradores (2002), mediante a avaliação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na emulsificação-difusão, evidenciaram que o mecanismo de formação das nanopartículas está relacionado com a difusão mútua da água para o solvente e do solvente para a água, assim como com a interação polímero-solvente. Suspensões de nanocápsulas também podem ser preparadas por este método, adicionando-se um óleo à fase interna, antes da emulsificação (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998b).

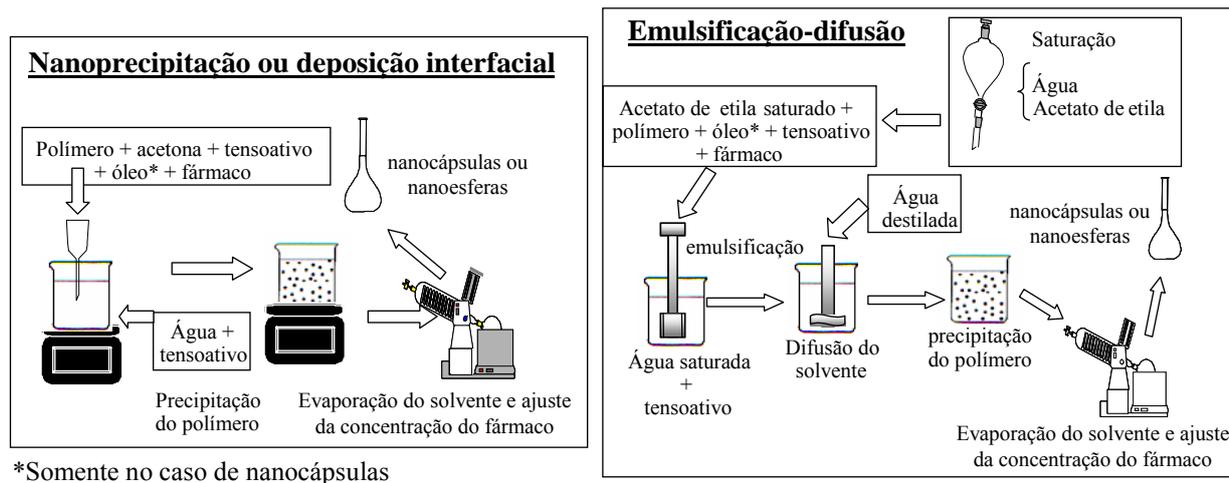


Figura 1. Esquema dos métodos de preparação empregados na presente tese: nanoprecipitação (nanoesferas); deposição-interfacial (nanocápsulas) ou emulsificação-difusão (nanocápsulas ou nanoesferas).

COLOMBO e colaboradores (2001) verificaram que a transposição de escala de laboratorial para piloto permitiu a obtenção de nanocápsulas de maneira eficiente e reprodutível. O equipamento usado na planta piloto (2 L) foi adequado para o propósito de escalonamento industrial de nanocápsulas (1000 L), de acordo com técnicas de engenharia química. MÜLLER (2003), através de um planejamento fatorial de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo diclofenaco, verificou que o aumento da quantidade de óleo (Miglyol 810[®]), bem como a diminuição dos estabilizantes (Epikuron 170[®] e Tween 80[®]) levou ao aumento do tamanho de partícula. Além disto, foi possível obter suspensão coloidal em escala piloto (700 mL), empregando o método de emulsificação-difusão, com diâmetro médio de 370 ± 51 nm, bastante inferior ao obtido em escala laboratorial de 25 mL (731 ± 40 nm), provavelmente devido ao aumento na velocidade de emulsificação.

TROTTA e colaboradores (2003) empregaram o método de emulsificação-difusão para a preparação de nanopartículas de lipídio sólido (monoestearato de glicerila), utilizando álcool benzílico ou lactato de butila como solventes. QUINTANAR-GUERRERO e colaboradores (2005) também adaptaram e otimizaram o método de emulsificação-difusão para a preparação de nanopartículas lipídicas, sendo que o diâmetro das partículas foi reduzido aumentando-se a temperatura, a

velocidade de agitação ou a quantidade do agente estabilizante, bem como pela diminuição da quantidade de lipídios. Além disto, a seleção do solvente e do agente estabilizante é fundamental para o sucesso do método.

Este método de preparação apresenta vantagens como o uso de solventes aceitáveis do ponto de vista farmacêutico, ser um método versátil e eficiente, pois pode proporcionar o controle do tamanho das partículas obtidas, altos rendimentos e reprodutibilidade. Adicionalmente, segundo os autores, pode possibilitar o controle da espessura da parede polimérica, a transposição de escala e a obtenção de altas eficiências de encapsulação (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998a; LEGRAND *et al.*, 1999; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 2005). Por outro lado, o método apresenta como desvantagens os altos volumes de água a serem eliminados da suspensão e a perda de fármacos solúveis em água para a fase externa, durante a emulsificação, e maior tempo de preparação (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998a; GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2005).

O diâmetro médio de partícula pode variar dependendo do método utilizado. MULLER (2003) observou que as partículas de poli(ϵ -caprolactona) contendo diclofenaco diferiram quanto ao tamanho ao comparar nanoprecipitação (190 a 264 nm) com emulsificação-difusão (702 a 1023 nm). Da mesma forma, GALINDO-RODRIGUEZ e colaboradores (2004) verificaram que as faixas de tamanho das nanopartículas de Eudragit L100-55[®] obtidas por *salting-out* (123-710 nm) e por emulsificação-difusão (108-715 nm) foram maiores comparadas com o método de nanoprecipitação (147-245 nm). Estes mesmos autores, em 2005, observaram que em escala piloto, as velocidades de agitação de 790 a 2000 rpm levaram à obtenção de nanoesferas de Eudragit L100-55[®] com tamanho variando de 557 a 174 nm através do método de *salting-out* e de 562 a 230 nm através de emulsificação-difusão. Em escala laboratorial, para estas mesmas velocidades, o diâmetro diminuiu de 719 nm para 279 nm, no caso do método de *salting-out*, e de 421 para 300 nm para o método de emulsificação-difusão. Considerando o método de nanoprecipitação, o diâmetro médio de partícula foi de 141 nm e de 105 nm, para as escalas laboratorial e piloto, respectivamente, e este método levou menos tempo de preparação (120 min) em

relação aos outros (300 a 350 min). Para os três métodos, as nanopartículas foram bem reproduzidas nas duas escalas, entretanto, com a transposição, ocorreu uma leve redução do tamanho de partícula e na taxa de associação do fármaco (ibuprofeno).

1.2. MICROPARTÍCULAS

Micropartículas são sistemas, geralmente poliméricos, que apresentam diâmetro na ordem de micrômetros (1 a 1000 μm), as quais podem ser classificadas, quanto à sua organização, em microcápsulas ou microesferas. Microcápsulas são sistemas reservatórios micrométricos, contendo um fármaco ou um núcleo envolvido por uma membrana ou um revestimento e, por sua vez, microesferas são sistemas matriciais micrométricos (THIES, 1996; BENOIT *et al.*, 1996). A localização e o estado de dispersão dos fármacos nas micropartículas poliméricas são fatores importantes que governam o modelo de liberação dos fármacos (KAWAGUCHI, 2000).

Diversos polímeros podem ser utilizados para a preparação das micropartículas, tais como polímeros biodegradáveis [poli(ácido lático), ASO *et al.*, 1994; BARAS *et al.*, 2000; poli(ácido lático-co-ácido glicólico), LIN *et al.*, 2005; poli(ϵ -caprolactona), YOUAN *et al.*, 2001], derivados de celulose [etilcelulose, GRATTARD *et al.*, 2002; carmelose (carboximetilcelulose), YAMADA *et al.*, 2001; hipromelose (hidroxipropilmetilcelulose)], polimetacrilatos (Eudragit[®] RS e RL, BARKAI *et al.*, 1990; KRAULAND *et al.*, 2004; Eudragit S[®], JAIN *et al.*, 2005), além de polissacarídeos como a quitosana (El-GIBALY *et al.*, 2002; AGNIHOTRI *et al.*, 2004; GAVINI *et al.*, 2006), polímeros naturais como a gelatina (FRANZ *et al.*, 1998), a albumina (TUNCAY *et al.*, 2000), e a caseína (KAWAGUCHI, 2000), entre outros.

O emprego dos sistemas microparticulados pode contemplar várias aplicações, como o controle de liberação de fármacos e/ ou liberação sustentada (CHO *et al.*, 2001; YAMADA *et al.*, 2001; Del BARRIO *et al.*, 2003; AGNIHOTRI e AMINABHAVI, 2004; COOK *et al.*, 2005), aumento da biodisponibilidade de

fármacos (KAWASHIMA *et al.*, 1993), redução da toxicidade gastrointestinal (CHAWLA *et al.*, 2000; BECK, 2005), tratamento de doenças do trato gastrointestinal (LAMPRECHT *et al.*, 2001), preparação de formas farmacêuticas gastroresistentes (TAKENAKA *et al.*, 1980), gastroretentivas (JAIN *et al.*, 2005) ou mucoadesivas (CILURZO *et al.*, 2005) e de formas farmacêuticas para administração nasal (VIDGREN *et al.*, 1992; GAVINI *et al.*, 2006), colônica (LAMPRECHT *et al.*, 2004) ou pulmonar (COOK *et al.*, 2005), veículos para a liberação de vacina oral (ANDRIANOV e PAYNE, 1998), proteção de fármacos contra a degradação e vetorização a sítios intestinais específicos do trato gastrointestinal (NORRIS *et al.*, 1998), provocar quimio-embolização (KAWAGUCHI, 2000), dentre outras.

A administração oral dos sistemas particulados é considerada uma das vias mais convenientes e custo-efetivas para a liberação de fármacos, apesar de serem absorvidos em baixa extensão, devido às barreiras fisiológicas. Dependendo do tamanho, as partículas podem ser absorvidas e atingir a circulação sistêmica, ou podem ser capturadas pela mucosa intestinal, permanecendo localmente, ou ainda podem aglomerar-se na camada de muco, não sendo absorvidas (NORRIS *et al.*, 1998).

Cabe ressaltar que formas farmacêuticas multiparticuladas apresentam vantagens em relação aos sistemas unitários, destacando-se uma distribuição mais uniforme e rápida ao longo do trato gastrointestinal, redução de danos locais, menor variação da biodisponibilidade interindividual, maior reprodutibilidade de doses individuais, bem como a redução do risco de toxicidade, quando comparado ao rompimento de um sistema de ação prolongado do tipo unitário (*dose dumping*) (LIN *et al.*, 1991; KAWASHIMA *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1998; KURKURI e AMINABHAVI, 2004).

Uma grande variedade de métodos de preparação de micropartículas tem sido desenvolvida, sendo que a escolha por um método particular é governada, em grande parte, pelas características de solubilidade do fármaco e do componente polimérico, bem como da duração do tratamento desejado (BODMEIER e CHEN, 1988; JAIN *et al.*, 1998). Muitos métodos de polimerização ou de co-polimerização resultam na formação de matriz macromolecular, os quais podem ser adaptados para o processo de

microencapsulação. Entretanto, a maioria das técnicas empregadas faz uso de polímeros pré-formados (ANDRIANOV e PAYNE, 1998).

Dentre os métodos empregados para a preparação de microesferas pode-se mencionar: 1) separação de fase (coacervação); 2) evaporação de solvente (emulsificação-evaporação), o qual pode ser realizado a partir de uma emulsão simples (O/A) ou múltipla (A/O/A), ou ainda emulsão não-aquosa (“O/O”); 3) extração de solvente (emulsificação-extração); 4) secagem por aspersão (*spray-drying*); 5) uso de fluidos supercríticos, dentre outros (BENOIT *et al.*, 1996).

Por outro lado, para a preparação de microcápsulas, os seguintes métodos podem ser empregados: 1) coacervação complexa; 2) separação de fases poliméricas; 3) polimerização interfacial; 4) secagem por aspersão (*spray-drying*); 5) leito fluidizado, dentre outros (THIES, 1996). A preparação de microcápsulas contendo um núcleo oleoso, rodeado por uma parede polimérica, também é possível, através, por exemplo, do método de evaporação de solvente do tipo emulsão “O/O” em água, em que o fármaco é suspenso em um óleo e emulsionado com uma solução do polímero (emulsão “O/O”) e, após, a mistura é emulsificada em uma solução aquosa de um tensoativo (O/O/A) (YOUAN *et al.*, 2001).

A caracterização físico-química das micropartículas, obtidas através de diferentes métodos, em geral, é feita segundo os parâmetros descritos na Tabela 1, mas outros aspectos também podem ser estudados, tais como a determinação da porosidade (TAKADA *et al.*, 1994), da área superficial e do tamanho de poros (BECK, 2005), além do potencial zeta das partículas (MU e FENG, 2001) e das propriedades tecnológicas (JAIN *et al.*, 2005).

Tabela 1. Parâmetros gerais de caracterização físico-química de sistemas microparticulados e alguns métodos que podem ser empregados.

Parâmetro a avaliar	Método de avaliação	Referências	
Distribuição de tamanho de partícula	Microscopia eletrônica de varredura	SUTINEN <i>et al.</i> , 1995	
	Espalhamento de luz	GRATTARD <i>et al.</i> , 2002	
	Microscopia de transmissão de luz	RUAN <i>et al.</i> , 2002	
Avaliação da morfologia de superfície externa e/ou interna	Microscopia eletrônica de varredura	RUAN <i>et al.</i> , 2002; BECK, 2005	
	Microscopia de força atômica	MU e FENG, 2001; BECK, 2005	
Taxa de encapsulação do fármaco	Extração e determinação quantitativa do teor total do fármaco nos sistemas e/ou determinação da quantidade de fármaco não- associada	BITZ <i>et al.</i> , 1996 HAN <i>et al.</i> , 2001 GIUNCHEDI <i>et al.</i> , 1995 QUAGLIA <i>et al.</i> , 2003	
	Cinética de liberação do fármaco associado	Diferentes métodos	PALMIERI <i>et al.</i> , 1994 GIUNCHEDI <i>et al.</i> , 1995
		Avaliação da organização estrutural e/ou distribuição do fármaco nos sistemas	Microscopia confocal
	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)		GAVINI <i>et al.</i> , 2006 BARKAI <i>et al.</i> , 1990
Difração de raios X	BECK, 2005		
Rendimento	Razão do peso das micropartículas obtidas relativo ao peso total dos componentes da formulação	WANG, 2002 BECK, 2005	
	Distribuição da massa molar do polímero	Cromatografia por exclusão de tamanho	ASO <i>et al.</i> , 1994 SANDOR <i>et al.</i> , 2001

1.3. Secagem por aspersão de sistemas nano e microparticulados (*spray-drying*)

A secagem por aspersão é uma operação muito bem aceita no campo farmacêutico, a qual pode ser usada também na produção de adjuvantes, na secagem de substâncias sensíveis ao calor, na granulação, na preparação de complexos de inclusão com β -ciclodextrinas, na modificação das propriedades farmacêuticas como o aumento da solubilidade e dissolução de substâncias fracamente solúveis

(TAKENAKA *et al.*, 1980; KAWASHIMA *et al.*, 1984; WAN *et al.*, 1991; BROADHEAD *et al.*, 1992). Ao contrário de muitos outros métodos clássicos de preparação de micropartículas, a secagem por aspersão (*spray-drying*) é uma técnica bastante rápida para a obtenção destes sistemas, em virtude de consistir de um processo de etapa única, além de ser passível de transposição de escala, ser menos dependente dos parâmetros de solubilidade do fármaco e do polímero, além de aplicável a uma grande variedade de materiais, incluindo substâncias termolábeis (JAIN *et al.*, 1998). Neste método, o líquido a secar é dividido na forma de gotículas, as quais, na câmara de secagem (torre), estarão sujeitas a um fluxo de ar quente (em co-corrente, contra-corrente ou misto) que promoverá a rápida secagem das mesmas. As partículas sólidas secas são, então, separadas e recolhidas, podendo apresentar-se sob a forma de pós finos, granulados ou aglomerados. Os pós obtidos são geralmente esféricos e porosos, sendo possível alterar e controlar suas inúmeras propriedades (tamanho de partículas, distribuição de tamanho de partículas, densidade, porosidade, capacidade de fluxo, friabilidade) (BROADHEAD *et al.*, 1992; POMBEIRO, 1998; WALTON *et al.*, 2000).

Entretanto, a secagem por aspersão pode apresentar a desvantagem de perda do produto devido à adesão das partículas na parede interna do equipamento, além da possibilidade de aglomeração das partículas. Objetivando-se amenizar estes problemas, uma outra técnica de *spray-drying*, denominada *double-nozzle*, foi desenvolvida, na qual uma solução aquosa de manitol, usada como antiaderente, é aspergida, simultaneamente, com a solução ou a dispersão (emulsão A/O) do fármaco na solução do polímero (JAIN *et al.*, 1998).

Vários parâmetros tecnológicos podem ser considerados para a preparação de partículas através deste método, dentre os quais podem ser citados a concentração do polímero, temperaturas de entrada e de saída do ar, velocidade do fluxo de alimentação e velocidade do fluxo de ar. Além disto, empregando-se a secagem por aspersão, de uma maneira geral, é possível obter microcápsulas ou microesferas dependendo do estado físico do fármaco na solução do polímero, utilizado para a preparação das micropartículas. Desta forma, microcápsulas são formadas pela aspersão de uma

suspensão do fármaco na solução polimérica, enquanto que, quando o fármaco está em solução juntamente com o polímero, microesferas são formadas (sistemas matriciais) (WAN *et al.*, 1992; CONTE *et al.*, 1994).

Entretanto, diferentes sistemas podem ser simultaneamente formados, uma vez que microesferas de etilcelulose, preparadas através de secagem por aspersão, apresentaram três diferentes estruturas, evidenciadas através de microscopia confocal, empregando-se como modelo albumina marcada com fluoresceína: esferas aparentemente ocas, com distribuição homogênea da proteína ao redor da parede; esferas preenchidas (matriciais), contendo uma dispersão mais homogênea da proteína, sem acumulação desta próxima à superfície e outras constituídas de pequenas partículas, com um alto teor de proteína. Além disto, foi verificado que os aspectos-chave que controlaram o processo de liberação foram a porosidade da matriz, a distribuição de tamanho das microesferas, a solubilidade das sondas no polímero e na água, além da difusão do meio de dissolução para dentro da matriz (GRATTARD *et al.*, 2002).

QUAGLIA e colaboradores (2003) verificaram que o tipo de líquido de alimentação (dispersão, emulsão A/O ou solução) contendo insulina e o polímero [poli(ácido lático-co-ácido glicólico)], além da co-encapsulação com aditivos (tensoativos não-iônicos e hidroxipropil- β -ciclodextrina), são parâmetros importantes, capazes de influenciar as características físico-químicas das micropartículas, preparadas através de secagem por aspersão, e a liberação do fármaco a partir destes sistemas. Os produtos formados apresentaram rendimentos entre 43 e 60 % e diâmetro médio de partícula entre 12 e 49 μm .

Em outro estudo, PALMIERI e colaboradores (1994) verificaram que micropartículas de Eudragit[®] RS, preparadas através de secagem por aspersão, apenas foram efetivas em controlar a liberação dos fármacos-modelo após a formação de comprimidos, através de compressão direta. Os fatores mais importantes a serem considerados para a otimização destas formulações, segundo os autores, incluem a

solubilidade do fármaco, a dureza dos comprimidos, a razão fármaco/polímero e a presença de plastificante.

MÜLLER e colaboradores (2000) empregaram pela primeira vez a secagem por aspersão, para obter formas sólidas de nanopartículas poliméricas contendo diclofenaco, utilizando 3 % (m/V) de dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem. Através de microscopia eletrônica, foi verificado que estes pós são formados por micropartículas, as quais são revestidas por nanopartículas contendo o fármaco. Estes produtos foram capazes de proteger a mucosa gastrintestinal de ratos contra os danos provocados pelo diclofenaco, da mesma forma que as suspensões de nanocápsulas (GUTERRES *et al.*, 2001; GUTERRES *et al.*, 1995a). Posteriormente, outros trabalhos demonstraram a aplicabilidade destes sistemas, utilizando como fármacos antiinflamatórios não-esteróides (WEISS, 2001; POHLMANN *et al.*, 2002; OBACH *et al.*, 2002; RAFFIN *et al.*, 2003; MULLER, 2003). OBACH (2002), estudando os perfis de liberação de indometacina a partir dos pós de nanocápsulas, nanoesferas e nanodispersão observou diferenças entre os mesmos, após aplicação de metodologias f1/f2, eficiência de dissolução e modelagem matemática. MÜLLER (2003) obteve pós de nanocápsulas contendo diclofenaco com características adequadas, utilizando o dióxido de silício coloidal como o melhor adjuvante, tanto para as suspensões preparadas por nanoprecipitação, quanto para aquelas preparadas por emulsificação-difusão. Além disto, este autor demonstrou a possibilidade da preparação de granulados, como intermediários para o enchimento de cápsulas de gelatina dura, a partir dos pós de nanocápsulas.

SHAM e colaboradores (2004) desenvolveram novos sistemas objetivando-se a liberação de fármacos no pulmão, baseado em matrizes de lactose contendo nanopartículas de gelatina ou de poli(cianoacrilato de butila), obtidas através de secagem por aspersão. A dispersão dos pós no ar demonstrou que a maior parte das partículas apresentou tamanho inferior a 5 µm, sendo apropriadas para a inalação. Após dispersão destes sistemas em água, foi verificado que o tamanho das nanopartículas aumentou após a secagem, sendo esta diferença significativa no caso das formulações preparadas com gelatina. GRENHA e colaboradores (2005) também

microencapsularam nanopartículas de quitosana, empregando manitol e lactose, através de secagem por aspersão, objetivando o desenvolvimento de sistemas de liberação pulmonar de proteínas.

Em 2004, BECK e colaboradores desenvolveram micropartículas nanorrevestidas, formadas por núcleos de dióxido de silício coloidal contendo o fármaco, revestidos por nanocápsulas, nanoesferas ou nanodispersão através de secagem por aspersão, visando uma nova aplicabilidade destes sistemas nanoestruturados como material de revestimento (BECK, 2005; BECK *et al.*, 2005). O diclofenaco ácido, o diclofenco sódico e a dexametasona foram utilizados como fármacos-modelo e o Eudragit S100[®] foi o polímero escolhido para o estudo, em função de sua solubilidade pH-dependente. O nanorrevestimento foi comprovado através de estudos de microscopia e da determinação da redução das áreas superficiais das micropartículas em relação ao núcleo não revestido. Os resultados de liberação *in vitro* dos fármacos associados demonstraram modificações nos seus perfis de dissolução, de acordo com o tipo de material nanoestruturado empregado, a natureza do fármaco e a presença de plastificante. Estudos *in vivo* demonstraram que as micropartículas nanorrevestidas foram capazes de reduzir a toxicidade gastrointestinal do diclofenaco, em relação à solução aquosa do fármaco. Além disto, experimentos de interação das micropartículas nanorrevestidas, contendo dexametasona, com células Caco-2 demonstraram a potencialidade destes sistemas em modificar a absorção deste fármaco em relação à solução aquosa, sem apresentarem citotoxicidade sobre esta linhagem celular (BECK, 2005).

1.4. MELATONINA

A melatonina (do grego *melanos* = preto e *tonos* = cor; BEYER *et al.*, 1998) foi isolada, na década de 1950, pelo dermatologista Aaron Lerner, a partir da glândula pineal bovina, a qual foi assim denominada por sua habilidade de clarear (CLAUSTRAT *et al.*, 2005) a pele escura produzida pelo pigmento químico melanina de certos peixes, répteis e anfíbios (EPSTEIN, 1997; BEYER *et al.*, 1998).

A melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina, Figura 2) é, portanto, um hormônio natural, da classe química indolamina, produzido principalmente pela glândula pineal, a partir da serotonina, via reações de acetilação catalisadas pela *N*-acetiltransferase e pela 5-hidroxiindol-*O*-metiltransferase. A rota biossintética da melatonina é regulada pela fotoperiodicidade do ambiente por meio de impulsos originados na retina, através de uma estrutura denominada relógio biológico (núcleo supraquiasmático do hipotálamo), responsável pelo ritmo circadiano, ou seja, está envolvida no ciclo dormir/despertar. Nos seres humanos, em adultos jovens, a concentração deste hormônio é baixa durante o dia (< 10 pg/mL), devido à inibição de sua secreção, quando a intensidade luminosa é elevada. Entretanto, durante a noite, sua concentração endógena média plasmática é cerca de 50 a 70 pg/mL. O nível plasmático de melatonina começa a aumentar a cerca de nove horas da noite, sendo o pico de concentração entre duas e quatro horas da madrugada, retornando à linha de base entre sete e nove horas da manhã (BÉNÈS *et al.*, 1997; BRZEZINSKI, 1997; HOFFMANN *et al.*, 1998; RANG *et al.*, 2001; REITER *et al.*, 2003; BARRENETXE *et al.*, 2004). O seu perfil plasmático é muito heterogêneo entre indivíduos, mas é bastante reprodutível em um mesmo indivíduo (CLAUSTRAT *et al.*, 2005).

A melatonina também é sintetizada secundariamente por outras células, como células enterocromafins, plaquetas e células mononucleares sangüíneas (LIEBMANN *et al.*, 1997), além de células presentes na retina, no trato gastrintestinal (REITER, 1998; TOSINI e FUKUHARA, 2003; CLAUSTRAT *et al.*, 2005), na pele, medula óssea e, provavelmente, por outras estruturas, cuja contribuição sistêmica é insignificante. Embora a melatonina tenha sido intensamente detectada no reino animal, recentemente, tem sido encontrada em plantas. Esta substância também está presente em bactérias (CLAUSTRAT *et al.*, 2005).

É metabolizada principalmente no fígado, onde sofre uma 6-hidroxilação, seguida de conjugação, a um sulfato ou glicuronato, sendo o sulfato de 6-hidroxi-melatonina o seu principal metabólito urinário, em humanos (REITER, 2003; BARRENETXE *et al.*, 2004). Atualmente, tem-se pesquisado intensamente os processos fisiológicos que são controlados pela melatonina, pois pouco se conhece

ainda a este respeito (KANDIMALLA *et al.*, 1999a; RANG *et al.*, 2001), mas se sabe que é um modulador biológico do humor, do sono, da fisiologia reprodutiva, do ritmo circadiano e de funções imunológicas (BEYER *et al.*, 1998; EPSTEIN, 1997; ESQUIFINO *et al.*, 2004).

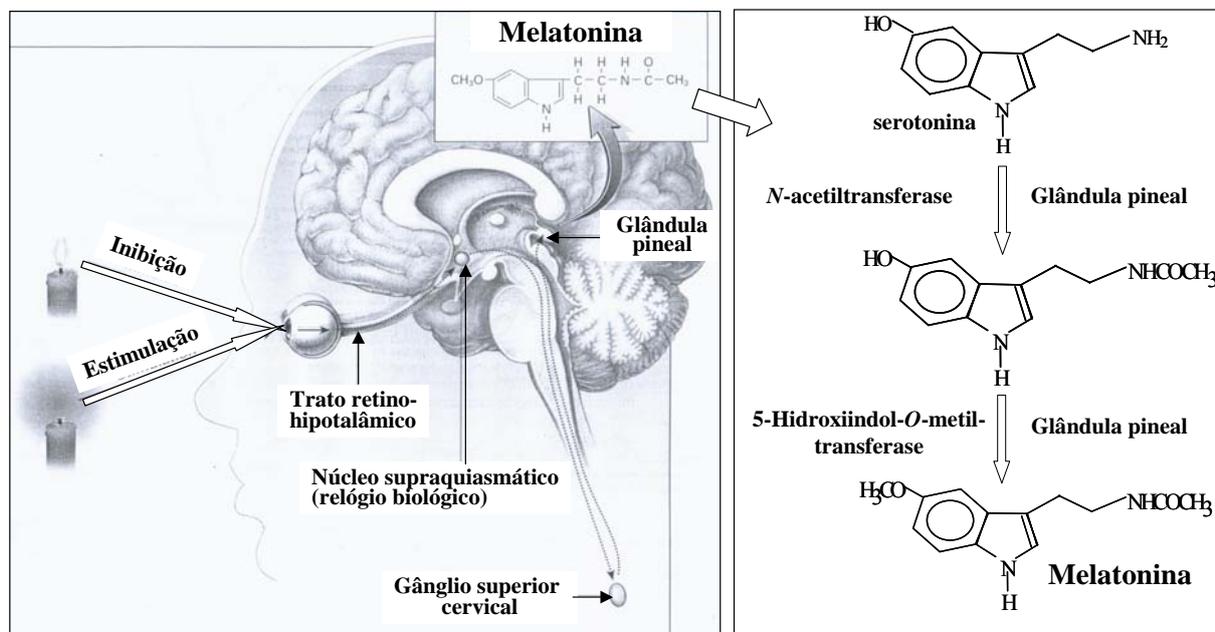


Figura 2. Fisiologia da secreção da melatonina, 5-metoxi-*N*-acetiltryptamina (adaptado de Epstein, 1997 e de BEYER *et al.*, 1998).

Em humanos, existe uma estreita relação entre os altos níveis plasmáticos de melatonina e a propensão rítmica ao sono (BARRENETXE *et al.*, 2004). Entretanto, a introdução da luz artificial tem comprometido significativamente a quantidade de melatonina produzida pela glândula pineal humana, quando utilizada indiscriminadamente, durante os períodos normais de “escuridão” (REITER, 2003). Intensidades de luz de 2000 a 2500 lux por 2 h (02:00 a 04:00 h da madrugada), suprimem completamente a secreção da melatonina, enquanto que, geralmente, as intensidades de luz doméstica (50-300 lux) têm um modesto efeito supressivo (CLAUSTRAT *et al.*, 2005). Entretanto, quando os períodos regularmente alternados de dia/noite (12:12 h de luz/escuridão) são perturbados, também são afetados o ritmo do relógio biológico e a síntese cíclica de melatonina. O grau de inibição da síntese da melatonina pelo uso inapropriado da luz depende do seu comprimento de onda e da

intensidade, além da fase circadiana em que a exposição ocorre (REITER, 2003). Outro importante fator que influencia a quantidade de melatonina sintetizada é a idade (REITER, 2003). Os níveis de melatonina endógena e de sulfato de 6-hidroxi-melatonina são elevados durante a infância, começando a diminuir próximo à puberdade, caindo a concentrações mínimas na senescência. Esta diminuição da secreção de melatonina dependente da idade, observada em idosos, pode estar relacionada a uma função permissiva no desenvolvimento de vários processos degenerativos e carcinogênicos (GARCÍA-PATTERSON *et al.*, 1996; BEYER *et al.*, 1998; REITER *et al.*, 2002).

A utilização de melatonina exógena tornou-se bastante disseminada nos anos noventa, como uma novidade, na medicina alternativa, embora existam alguns estudos que comprovem a sua eficácia (RANG, 2001). Este hormônio tem sido usado extensivamente como suplemento alimentar ou como medicamento de auto-administração para distúrbio do sono, em países onde é livremente disponível (*over-the-counter* - OTC), sendo também empregado sob prescrição (ARENDRT, 2003). Desta forma, a melatonina vem sendo empregada no controle de distúrbios do ciclo circadiano, os quais estão associados ao aumento de problemas de saúde em humanos (RANG, 2001; ARENDRT, 2003). A melatonina exerce efeitos cronobióticos em uma larga faixa de doses, incluindo desde níveis fisiológicos (250 µg) a farmacológicos (1 a 10 mg; REITER, 2003). Produtos disponíveis no comércio podem apresentar-se nas formas de cápsulas e de comprimidos, nas dosagens que variam geralmente de 0,5 mg a 5,0 mg por unidade (SUHNER *et al.*, 1999; BRZEZINSKI, 1997; PDR, 1997; JAN *et al.*, 2000). Podem ser encontradas formulações de liberação imediata, como por exemplo cápsulas contendo 3 mg do fármaco (Twin Laboratories Inc.) ou formulações de liberação controlada, como CircadinTM (comprimidos - 2 mg, Neurin Pharmaceuticals) e comprimidos produzidos pelo Twin Laboratories Inc (comprimidos de 2 mg) (JAN *et al.*, 2000). No *Physicians' Desk Reference* (1997) os seguintes produtos estão relatados: *Melatonin* 3 mg comprimidos e *Melatonin Spray* (baseado em lipossomas), do AC Laboratory; *Melatonin* 1,5 mg, *Melatonin* 500 µg e *Melatonin* SR, da Par Pharmaceutical; Vitatonin (melatonina e outros antioxidantes), de CPH

International. Quando utilizada para diminuir a latência ao sono e/ou prolongá-lo, a melatonina deve ser administrada, aproximadamente, 30 minutos antes de deitar-se (REITER, 2003).

Têm aumentado as evidências de que as propriedades cronobióticas da melatonina, quando adequadamente administrada, propiciam tratamento efetivo para distúrbios relacionados ao ciclo dormir/despertar, síndrome da fase do sono retardada, *jet-lag* (defasagem de tempo de longas viagens) e problemas de sono em trabalhadores por turnos. O emprego de melatonina tem mostrado melhorar distúrbios do sono em pessoas cegas, sendo muitas vezes o tratamento de escolha, além de ser um alvo terapêutico de distúrbios do sono relacionados à idade, principalmente causados pela dificuldade de percepção luminosa e ao declínio das funções do sistema circadiano (ARENDRT, 2003; BARRENEXTE *et al.*, 2004; ARENDRT e SKENE, 2005). Também tem existido um consenso de que a melatonina exógena é benéfica para tratamento de crianças com distúrbio crônico do ciclo dormir/acordar, as quais têm dificuldades de desenvolvimento neural e neuropsiquiátricos (JAN *et al.*, 2000).

A potencial toxicidade da melatonina tem sido considerada extremamente baixa, tanto em animais (10 a 250 mg/kg; 800 mg/kg) quanto em humanos (1 a 300 mg/kg) (VIJAYALAXMI *et al.*, 2002; 2004). Em um estudo realizado em humanos, que receberam 1 g de melatonina diariamente, durante um mês, foram verificadas apenas algumas alterações em certos hormônios pituitários (NORDLUND e LERNER, 1977). Leve efeito sedativo tem sido descrito para a melatonina em testes neurocomportamentais, incluindo redução da vigilância visual e auditiva, sonolência e eficiência reduzida na condução de tarefas (VIJAYALAXMI *et al.*, 2004). Desta forma, estudos têm sugerido que, a curto prazo, a melatonina é segura e efetiva para alterar o sono e o ritmo circadiano (ARENDRT, 2003). Entretanto, ainda existe uma insuficiência de dados referentes a sua segurança mais a longo-prazo, o que pode trazer restrições quanto ao seu emprego clínico (DeMURO *et al.*, 2000; ARENDRT, 2003). Além disto, a dose ótima e a formulação para as aplicações devem ser melhor esclarecidas (ARENDRT e SKENE, 2005).

Além das funções reguladoras relacionadas ao ritmo biológico, na última década, vários efeitos potenciais têm sido descritos e amplamente estudados para a melatonina, tais como sedativo, anticonvulsivante, analgésico, contraceptivo, antidepressivo, antiinflamatório, anticancerígeno, além de imunoestimulante e, mais recentemente, antioxidante (BRZEZINSKI, 1997; HOFFMANN *et al.*, 1998; VIJAYALAXMI *et al.*, 2002; ESQUIFINO *et al.*, 2004; BOUTIN *et al.*, 2005; HARDELAND *et al.*, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado que a melatonina possui uma ação inibitória sobre o crescimento de diferentes tipos de células cancerosas humanas, principalmente de tumores dependentes de hormônio sexual, tais como os de origem na mama e ovário (GARCÍA-PATTERSON *et al.*, 1996; BRAINARD *et al.*, 1999; PETRAKA *et al.*, 1999; KANISHI *et al.*, 2000; VIJAYALAXMI *et al.*, 2002). Entretanto, estudos clínicos adicionais, objetivando definir a dose efetiva, o planejamento do tratamento e o tipo de tumor, devem ainda ser realizados a fim de avaliar o valor clínico da melatonina como um fármaco anticancerígeno (GARCÍA-PATTERSON *et al.*, 1996).

Estudos também têm evidenciado que a melatonina, administrada em altas doses, pode inibir a ovulação de mulheres, tendo potencial uso como contraceptivo, em combinação com progesterona (GARCÍA-PATTERSON *et al.*, 1996). Além disto, foi demonstrado, *in vitro*, que este hormônio estimula, em concentrações micromolares (10^{-5} a 10^{-4} mol.L⁻¹), a proliferação e a síntese de colágeno tipo I em células de osso humano (HOB-M) e células osteoblásticas (SV-HFO), sugerindo seu uso potencial em situações em que a formação de osso é desejada, tais como osteoporose e fraturas. Entretanto, pouco se conhece ainda a respeito do mecanismo desta ação mitogênica da melatonina sobre as células ósseas (NAKADE *et al.*, 1999).

Outra linha de estudos de interesse, baseia-se na interação entre melatonina, opióides e analgesia, a qual tem sido suspeitada há vários anos, uma vez que, durante à noite, quando o nível de melatonina é alto, muitos pacientes são menos sensíveis à dor e requerem menos analgésico. Entretanto, devido ao fato de poder se comportar como um agonista-antagonista misto dos receptores opióides, existe dúvida quanto ao

emprego da melatonina, em simples co-administração a narcóticos, tal como a morfina, para potencializar a eficácia analgésica destes (EBADI *et al.*, 1998).

Alguns dos efeitos da melatonina são mediados por interações com dois bem caracterizados receptores de membrana acoplados à proteína-G (MT₁ ou Mel_{1a} e MT₂ ou Mel_{1b}; BARRENETXE *et al.*, 2004; BOUTIN *et al.*, 2005), os quais estão localizados principalmente no cérebro (núcleo supraquiasmático, cerebelo, córtex, hipocampo, hipotálamo e artérias cerebrais) e na retina, mas também são encontrados em tecidos periféricos (KANDIMALLA *et al.*, 1999a; RANG *et al.*, 2001; BARRENETXE *et al.*, 2004). Um terceiro sítio protéico de ligação da melatonina, ainda pouco caracterizado, a quinona 2-redutase (QR2 ou MT3) citosólica, foi descoberto, e, embora controverso, parece apresentar uma função de destoxificação (BOUTI *et al.*, 2005). A caracterização farmacológica dos receptores da melatonina, no sistema nervoso central, tem estimulado a síntese de agonistas e de antagonistas destes receptores, objetivando o entendimento do mecanismo de ação do hormônio (BARRENETXE *et al.*, 2004). Além disto, interações da melatonina com receptores nucleares e com proteínas intracelulares podem também ocorrer (CLAUSTRAT *et al.*, 2005). Outros efeitos são freqüentemente atribuídos à natureza química antioxidante desta indolamina, observados geralmente a concentrações altas, não-fisiológicas (BOUTI *et al.*, 2005), embora existam algumas evidências de que a quantidade de melatonina endogenamente produzida possa ser relevante como antioxidante fisiológico (CLAUSTRAT *et al.*, 2005). Desta forma, curiosamente, dependendo de suas ações, a melatonina é ativa em concentrações subnanomolares até milimolares, embora circule a um pico de concentração noturna inferior à nanomolar (BOUTI *et al.*, 2005).

1.4.1. Lipoperoxidação e atividade antioxidante da melatonina

Cerca de 1 a 5 % do oxigênio inspirado é convertido em formas parcialmente reduzidas de oxigênio (os radicais livres ou as espécies reativas de oxigênio), muitos dos quais são extremamente tóxicos. O oxigênio molecular é monovalentemente

reduzido ao radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual, em presença da enzima superóxido dismutase (SOD), pode ser convertido ao intermediário reativo H_2O_2 . Na maioria das células, principalmente naquelas do sistema nervoso central, H_2O_2 é destoxificado pelas enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase selênio-dependente (GPx). A GPx utiliza H_2O_2 e hidroperóxidos como substratos durante a conversão de glutathiona reduzida (GSH) à oxidada (GSSG), sendo a última reciclada à forma reduzida pela enzima glutathiona redutase (GRD). Entretanto, na presença íons de metais de transição (Fe^{2+} ou Cu^{1+}), H_2O_2 pode sofrer a reação de Fenton ou de Haber-Weiss, formando-se o radical hidroxila ($\cdot OH$). Alternativamente, o $O_2^{\cdot-}$ pode interagir com radical do óxido nítrico ($NO\cdot$), formando o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual eventualmente produz o radical $\cdot OH$ (Figura 3). O radical $\cdot OH$ é potencialmente citotóxico, sendo capaz de prontamente interagir com moléculas orgânicas, tais como proteínas, fosfolipídios, ácidos nucleicos (DNA mitocondrial e nuclear) e carboidratos, causando danos irreversíveis. As membranas celulares são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo por serem formadas basicamente de lipídios insaturados e de proteínas. Desta forma, o radical $\cdot OH$ ataca uma molécula orgânica (ácido graxo poliinsaturado da membrana ou lipoproteína), seqüestrando um átomo de hidrogênio de um átomo de carbono, o qual reage rapidamente com O_2 , formando radical peroxila ($LOO\cdot$). Este último radical seqüestra um novo átomo de hidrogênio, gerando um novo radical de carbono, desenvolvendo uma reação em cadeia, denominada lipoperoxidação. É uma reação complexa e pode ser de auto-propagação, o que significa que, um vez iniciada, pode, teoricamente, levar à oxidação de todos os lipídios da célula, podendo, portanto, tornar-se altamente destrutiva (REITER, 1998; BEYER *et al* 1998; BRIDI *et al.*, 1999). Além do $\cdot OH$, o $ONOO^-$ e o oxigênio singlete (1O_2), formado sob condições foto-oxidativas, também podem começar o processo de lipoperoxidação (REITER, 1998). Este processo resulta em diversos produtos tóxicos, incluindo o malondialdeído (MDA) e peróxidos lipídicos, sendo o primeiro o principal e o mais estudado produto da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados; em função de sua alta citotoxicidade, podendo interagir com DNA e

proteínas, e ter ação inibitória sobre enzimas protetoras, atua como um potencial promotor de tumor ou um agente de co-carcinogênese, além de aterogênico. O MDA, por ser o produto final da lipoperoxidação, serve como um índice do dano oxidativo (TAYSI *et al.*, 2003; DEL RIO *et al.*, 2005).

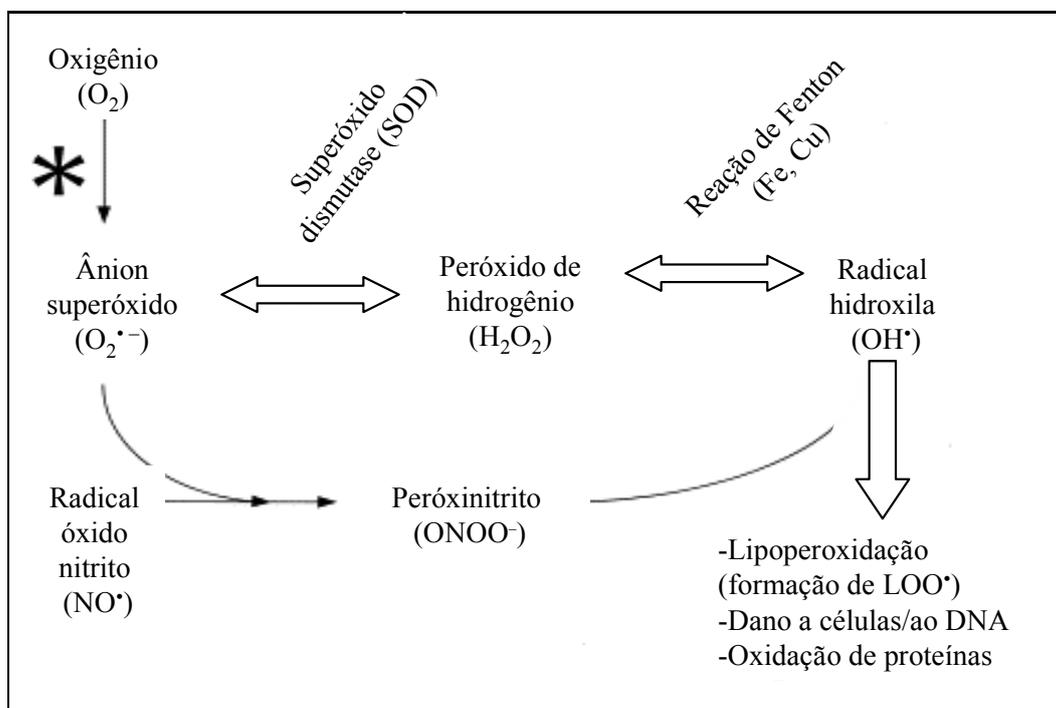


Figura 3. Geração de radicais livres (adaptado de BEYER *et al.*, 1998).

A lipoperoxidação é um processo fisiológico contínuo, sendo importante na renovação das membranas. Entretanto, um aumento deste processo pode danificar células ou alterar processos fisiológicos (BRIDI, 1999). Favoravelmente, o organismo é dotado de sistemas de defesa antioxidante, os quais envolvem enzimas, como SOD, CAT e GPx, capazes de limitar a formação de radicais livres ou de neutralizá-los, quando formados, e ainda substâncias que os sequestram diretamente (“scavengers”), incluindo pequenas moléculas antioxidantes obtidas pela ingestão, principalmente, de frutas e de vegetais (hidrofílicos: ascorbato e GSH, ou lipofílicos: tocoferóis, flavonóides e carotenóides). Além disto, existem enzimas envolvidas na redução de formas oxidadas de moléculas antioxidantes, como a GRd, e uma “maquinaria” celular responsável por manter o ambiente reduzido, incluindo a glicose-6-fosfato-

desidrogenase, a qual regenera o NADPH (BEYER *et al.* 1998; BECKMAN e AMES, 1998) que mantém a glutathiona reduzida.

Recentemente, tem sido relatado que melatonina, endógena e exógena, pode ajudar a neutralizar os radicais livres antes de exercerem as suas ações tóxicas (BEYER *et al.* 1998). De fato, em ratos e em humanos jovens, os níveis séricos de melatonina têm sido correlacionados com a capacidade sanguínea de neutralizar radicais livres, de maneira que, quanto maior o nível de melatonina no soro, têm sido verificado um maior “*status*” antioxidante total (REITER *et al.*, 2002).

Desta forma, diversas pesquisas, realizadas *in vitro* e/ou *in vivo*, têm demonstrado a efetiva atividade antioxidante da melatonina (MELCHIORRI *et al.*, 1995; MARSHALL *et al.*, 1996; REITER *et al.*, 1997; MORISHIMA *et al.*, 1998; KARBOWNIK *et al.*, 2000; CABRERA *et al.*, 2000; ORTIZ *et al.*, 2001; CHUNG e HAN, 2003; HARDELAND *et al.*, 2006), tendo sido sugerido possuir efeitos contra o envelhecimento e em doenças relacionadas à idade. Os benefícios clínicos potenciais do uso de melatonina como antioxidante sugerem que esta possa ser efetiva no tratamento de muitas condições patofisiológicas, incluindo vários tipos de câncer e doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e de Parkinson (REITER, 1998; BEYER *et al.*, 1998; PAPPOLLA *et al.*, 2002; TAYSI *et al.*, 2003; MATSUBARA *et al.*, 2003; FENG *et al.*, 2006). A melatonina tem revelado maior atividade, em muitos modelos, quando comparada a antioxidantes potentes conhecidos, como as vitaminas C e E e a GSH (BEYER *et al.*, 1998; REITER, 1998). Por outro lado, em certos estudos, sua potência antioxidante também tem sido inferior a alguns compostos, como outras indolaminas, dependendo do modelo testado (MARSHALL *et al.*, 1996; CHAN e TANG, 1996).

As propriedades antioxidantes da melatonina podem ser derivadas de dois mecanismos: ação antioxidante direta sobre espécies reativas de oxigênio e/ou pela inibição da geração destas, apresentando também uma ação antioxidante indireta. Desta forma, vários estudos têm demonstrado sua eficiente ação em seqüestrar o $\cdot\text{OH}$, o H_2O_2 , o ácido hipocloroso (HOCl), o $^1\text{O}_2$, o ONOO^- , o ácido peróxido nitroso e,

possivelmente, o LOO[•] (REITER *et al.*, 1998; KARBOWNIK *et al.*, 2001; REITER *et al.*, 2002; REITER, 2003). A melatonina atua como doadora de elétrons, tornando-se um radical (cátion radical indolila ou radical melatonila), primeiramente destoxificando radicais reativos, e ao mesmo tempo, não sofre auto-oxidação no processo de reciclagem redox ou na presença de metais de transição (REITER, 1998; KARBOWNIK *et al.*, 2001). Desta forma, ao contrário dos antioxidantes clássicos, tais como vitamina C, E e GSH, que sofrem ciclismo redox, a melatonina, sendo uma molécula rica em elétrons, pode interagir com radicais via uma reação aditiva para formar diversos produtos finais estáveis, os quais são eliminados na urina. Conseqüentemente, não sofreria ciclismo redox e, portanto, não funcionaria como um pró-oxidante (TAN *et al.*, 2000 *apud* MAHARAJ *et al.*, 2002*).

De fato, estudos têm demonstrado que a melatonina não apresenta efeitos pró-oxidantes *in vitro* (MARSHALL *et al.*, 1996; CHAN e TANG, 1996). De acordo com CHAN e TANG (1996), a mais baixa capacidade antioxidante da melatonina (5-metoxiindolamina) em relação às 5-hidroxiindolaminas (serotonina e *N*-acetilserotonina) pode ser balanceada pela falta de efeito pró-oxidante da melatonina, em oposição à moderada ação pró-oxidante das últimas, verificada utilizando o modelo de dano ao DNA induzido por bleomicina-ferro. Contraditoriamente, alguns estudos descreveram efeitos pró-oxidantes *in vitro* para a melatonina, dependendo da concentração e do tempo de incubação (OSSENI *et al.*, 2000; BARRENETXE *et al.*, 2004).

A melatonina aumenta a atividade de enzimas antioxidantes, como SOD, GPx, GRd, γ -glutamilcisteína sintetase, glicose 6-fostato desidrogenase e CAT, aumentando, assim, a capacidade de defesa endógena do organismo e, ao mesmo tempo, pode diminuir a atividade de enzimas pro-oxidantes, como óxido nítrico sintetase e lipoxigenases (REITER, 1998; KARBOWNIK *et al.*, 2001; REITER *et al.*,

*TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C. REITER, R.J. Significance of Melatonin in Antioxidant Defense System: Reaction and Products. **Biological Signals and Receptors**, v. 9, p. 137-159, 2000 *apud* MAHARAJ, D.S., ANOOPKUMAR-DUKIE, S., GLASS, B.D., ANTUNES, E.M., LACK, B., WALKER,R.B., DAYA, S. The Identification of the UV Degradants of Melatonin and their Ability to Scavenge Free Radicals. **Journal of Pineal Research**, 32, 257-261, 2002.

2002; HARDELAND *et al.*, 2006). O mecanismo envolvido na regulação de enzimas antioxidantes pela melatonina, *in vivo*, ainda não foi precisamente determinado, mas estudos têm demonstrado sua capacidade de influenciar a expressão gênica de enzimas antioxidantes, alterando os níveis de RNAm para estas enzimas (RODRIGUEZ *et al.*, 2004). A melatonina também influencia favoravelmente a produção e a geração de GSH, o principal antioxidante intracelular. Além disto, este hormônio de estrutura pequena, sendo lipofílico e ao mesmo tempo um pouco solúvel em meio aquoso, facilmente atravessa as barreiras biológicas e prontamente entra nas células, compartimentos ou fluidos corporais, incluindo a barreira hematoencefálica, sendo largamente distribuído dentro do organismo (citossol, núcleo, membranas celulares e mitocôndria), onde pode seqüestrar radicais livres tanto em ambiente celular lipídico quanto aquoso (REITER *et al.*, 1996; REITER *et al.*, 1997; KARBOWNIK *et al.*, 2001; VIJAYALAXMI *et al.*, 2004; CLAUSTRAT *et al.*, 2005; HARDELAND *et al.*, 2006). Concentrações altas de melatonina podem ser encontradas na mitocôndria, onde é capaz de aumentar a eficiência da cadeia de transporte de elétrons, com a conseqüente redução da geração de radicais livres, fato que se torna especialmente importante, uma vez que esta organela é o maior sítio de geração de radicais livres e de estresse oxidativo (KARBOWNIK *et al.*, 2001; REITER *et al.*, 2002).

O fato da melatonina penetrar no cérebro é particularmente interessante, uma vez que este órgão é altamente suscetível ao dano oxidativo, devido a sua alta concentração de ácidos graxos facilmente oxidáveis, possuir regionalmente altas concentrações de ácido ascórbico e ferro e apresentar relativamente baixo nível de sistema de defesa antioxidante, além de consumir grande quantidade de O₂ (cerca de 20 % do total inalado), apesar de representar apenas cerca de 2 % do peso corporal (REITER *et al.*, 1997; REITER, 1998). Estudos têm demonstrado também a habilidade da melatonina em estabilizar membranas, pois protege contra a diminuição da fluidez das membranas (qualidade de facilidade ao movimento), causada, possivelmente, pela oxidação de ligações duplas lipídicas e de cadeias laterais de aminoácidos, acarretando mudanças na sua dinâmica funcional (REITER, 1998).

LIVREA e colaboradores (1997) avaliaram a ação contra a peroxidação lipídica de melatonina incorporada em lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina, nas doses de 5 a 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. As concentrações de 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ não foram efetivas em reduzir a peroxidação lipídica. Por outro lado, o fármaco nas doses de 30 a 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ causou curtos períodos de inibição da lipoperoxidação, aumentando com a dose, mas não de forma linear. Foi verificado também um sinergismo de ação pela combinação de melatonina com α -tocoferol, a 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, o qual já havia sido relatado para substâncias como ascorbato e GSH.

A melatonina, administrada na dose de 5 ou 10 mg/kg, também reduziu a peroxidação lipídica no fígado de rato, induzida por irradiação γ , a qual é muito empregada na terapia de câncer. Verificou-se que a redução do nível de malondialdeído foi dose-dependente da melatonina (TAYSI *et al.*, 2003).

SAIJA e colaboradores (2002) investigaram a interação da melatonina com modelos lipossomais de membranas e a possível implicação em seu efeito protetor, contra danos oxidativos provocados por radiação UV. Estes resultados *in vitro* sugeriram que o efeito fotoprotetor da melatonina pode ser, ao menos parcialmente, resultante de sua capacidade de seqüestrar radicais livres, incluindo o óxido nítrico, além de poder atuar absorvendo radiação UV. Através de calorimetria exploratória diferencial, foi evidenciada também a capacidade da melatonina de interagir com as bicamadas de dimiristoilfosfatidilcolina, causando um significativo efeito fluidificante, o que pode ser um mecanismo cooperativo na proteção contra danos peroxidativos às membranas, ao lado de sua capacidade de atravessar as biomembranas, possibilitando também a proteção de componentes intracelulares.

VURAL e colaboradores (2001) avaliaram o efeito antioxidante da melatonina, administrada intraperitonealmente, na dose de 10 mg/kg/dia, em ratos diabéticos, uma vez que o estresse oxidativo exerce uma função no desenvolvimento da doença e nas complicações associadas a mesma. Os resultados sugeriram que a melatonina possa ser útil no tratamento de diabetes devido às propriedades antioxidantes, além de controlar o nível de glicose no sangue.

SIU e colaboradores (1999) verificaram que a presença de indolaminas, tal como a melatonina, foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica, induzida por óxido nítrico, em homogeneizados de retina de rato. A vitamina E apresentou um efeito sinérgico com as indolaminas no combate ao dano oxidativo retinal.

CABRERA e colaboradores (2000) avaliaram o efeito da melatonina sobre o dano oxidativo em cérebro de rato, induzido por ácido quinolínico, o qual é um metabólito relacionado a diversas doenças neurológicas em humanos. Em experimentos *in vitro*, o acúmulo de produtos da peroxidação lipídica foi significativamente reduzido pela melatonina (0,5 a 3 mmol.L⁻¹) de forma dose-dependente. A administração de melatonina, intraperitonealmente (10 mg/kg), 30 minutos antes da administração do ácido quinolínico, e após 4 e 20 horas, reduziu significativamente a peroxidação lipídica. A melatonina também administrada intraperitonealmente a ratos, na dose de 10 mg/kg a cada 6 horas, durante 15 dias, reduziu os danos oxidativos provocados pelo carcinogênico ácido δ -aminolevulínico sobre o DNA e preveniu a redução da fluidez das membranas mitocondrial e microsomal renais, bem como foi efetiva em diminuir os produtos da peroxidação lipídica na circulação sistêmica (KARBOWNIK *et al.*, 2000).

SHEN e colaboradores (2002) verificaram que a melatonina (0,1, 1,0 e 10 mg/kg/10 dias) reduziu efetivamente a peroxidação lipídica em tecido cerebral de ratos de meia-idade, induzida pela administração de peptídeo β -amilóide, o qual possui uma ação causal na doença de Alzheimer. Foi observado também um aumento da atividade de enzimas antioxidantes, o que pode contribuir para a melhoria do aprendizado e memória desses animais. Resultados também sugeriram que o aumento, relatado à idade, na vulnerabilidade do tecido cerebral à oxidação, em camundongos com senescência acelerada, pode ser modificado pela melatonina, provavelmente por sua habilidade de seqüestrar radicais livres e estimular a atividade de enzimas antioxidantes (OKATANI *et al.*, 2002).

GÓMEZ e colaboradores (2005) verificaram efeitos protetores da melatonina, em hipocampo de ratos, contra danos celulares causados por estresse oxidativo

induzido por alumínio, quando administrada intraperitonealmente na dose de 10 mg/kg/dia durante 11 semanas (veículo= 0,9 % de solução salina contendo 2 % de etanol). A melatonina aumentou os níveis de GSH, aumentou a atividade das enzimas SOD e CAT, mas não alterou significativamente a atividade da GSH redutase e da GPx. Além disto, foi observado um aumento nos níveis de RNAm das enzimas SOD, CAT e GPx, após a administração de melatonina, o que, para as duas primeiras, foi correlacionado com o aumento de suas atividades.

TÚNEZ e colaboradores (2005) avaliaram os efeitos da administração de melatonina e dimetilsulfóxido sobre o estresse oxidativo de fígado e cérebro, além da insuficiência hepática causados pela administração de tioacetamida a ratos. Uma dose diária de melatonina (3 mg/kg, dissolvida em 0,9 % de NaCl contendo 5 % de etanol) ou dimetilsulfóxido (2 g/kg) foi intraperitonealmente administrada, sozinha ou em combinação com tioacetamida, começando 3 dias antes e continuando por 2 dias após a injeção da hepatotóxina. Os resultados demonstraram que uma ação antioxidante e neuro-/hepato-protetora pela administração de melatonina e também de dimetilsulfóxido em menor extensão, foi obtida mediante a diminuição nas mudanças provocadas pela tioacetamida, como o aumento dos níveis de amônia e da peroxidação lipídica, redução dos níveis de GSH e da atividade da CAT, dentre outros.

Estudos têm demonstrado também que a administração de melatonina a ratos têm diminuído efeitos tóxicos de certos fármacos, envolvidos com a geração de espécies reativas de oxigênio, como, por exemplo, a redução da ototoxicidade de cisplatina (LOPEZ-GONZALEZ *et al.*, 2000), a diminuição da toxicidade cardíaca da doxorubicina (MORISHIMA *et al.*, 1998; MORISHIMA *et al.*, 1999; XU *et al.*, 2001; AHMED *et al.*, 2005). Outra aplicação da melatonina que tem sido extensivamente pesquisada é em modelos de isquemia/reperfusão, uma vez que a geração de radicais livres tem sido associada aos danos provocados nos tecidos cerebral e gastrointestinal mediante esta condição, e a administração da melatonina tem diminuído estes danos bem como reduzido o edema induzido (CABEZA *et al.*, 2001; CUZZOCREA *et al.*, 2001; KONDOH *et al.*, 2002; CHEUNG, 2003; TORII *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004).

1.4.2. Desenvolvimento de formulações contendo melatonina

Quando administrada por via oral, a melatonina possui uma curta meia-vida biológica (30 a 65 min) e apresenta uma baixa e variada biodisponibilidade, provavelmente devido ao importante metabolismo de primeira passagem e/ou absorção variável (BÉNÈS *et al.*, 1997; DeMURO *et al.*, 2000; BARRENETXE *et al.*, 2004). De fato, os poucos dados relatados na literatura têm sugerido significativas variações na farmacocinética da melatonina em humanos. DeMURO e colaboradores (2000) verificaram que a melatonina, administrada oralmente em humanos, apresentou uma biodisponibilidade absoluta de aproximadamente 15 % e tempo de meia-vida entre $60,8 \pm 13,2$ minutos (dose de 2 mg) e $65,0 \pm 11,3$ minutos (dose de 4 mg).

Em função destas características, a melatonina não é adequada para incorporação em formas farmacêuticas de liberação imediata convencionais (LEE *et al.*, 1999; EL-GIBALY *et al.*, 2003). Além disto, possui baixa solubilidade em água e características de dissolução lenta (Kumar *et al.*, 2003; LUI e FAN, 2005). Desta forma, sistemas de liberação controlada de melatonina, para serem utilizados por via oral (LEE *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1996a; LEE *et al.*, 1996b; BÉNÈS *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1998; HOFFMANN *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999; EL-GIBALY *et al.*, 2002; EL-GIBALY *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2003), transdérmica (BÉNÈS *et al.*, 1997; KANDIMALLA *et al.*, 1999a; KANDIMALLA *et al.*, 1999b; DUBEY *et al.*, 2006), transmucosal (BÉNÈS *et al.*, 1997) ou ainda intranasal (MAO *et al.*, 2004) têm sido desenvolvidos, tendo em vista suas inúmeras potencialidades terapêuticas. De fato, alguns estudos demonstraram que formulações de liberação controlada de melatonina foram clinicamente mais úteis em manter o sono e em tratamento de distúrbios do ritmo circadiano, quando comparadas a formulações de liberação imediata (LEE *et al.*, 1998), as quais são mais efetivas na indução do sono (JAN *et al.*, 2000).

LEE e colaboradores (1995) avaliaram a liberação de melatonina, em humanos, a partir de cápsulas contendo formulações de liberação imediata e formulações de liberação controlada, constituídas de misturas de melatonina, hipromelose (hidroxipropilmetilcelulose) e povidona (polivinilpirrolidona), aplicadas

em grânulos de açúcar, e revestidas com etilcelulose (Aquacoat[®]). A dose total administrada de melatonina foi 0,5 ou 1,0 mg. As formulações foram planejadas para liberar 0,1 mg de melatonina imediatamente e 0,4 mg a partir dos grânulos de açúcar, visando à liberação controlada acima de oito horas, mantendo a concentração de melatonina superior à fisiológica. As análises revelaram que menos de 20 % da dose administrada alcançaram a circulação sistêmica, fato que pode ser resultante do intenso metabolismo hepático e/ou da incompleta liberação do fármaco.

Em 1999, LEE e colaboradores também prepararam comprimidos com matriz de hipromelose, contendo melatonina, sendo revestidos com misturas de Eudragit[®] RS-30D, talco e plastificante. Os perfis de liberação da melatonina, a partir dos comprimidos, foram avaliados em fluidos gástrico e intestinal artificiais. De acordo com os resultados, a velocidade de liberação do fármaco (pouco solúvel em água) foi independente do pH do meio, sendo a liberação dada pela sua difusão através da matriz gelatinosa, seguida pela erosão do gel. Verificaram que, com o aumento da viscosidade da hipromelose, a velocidade de liberação da melatonina tendeu a diminuir, assim como para o revestimento, sendo possível, obter comprimidos de liberação sustentada deste fármaco otimizando a formulação.

Em um outro estudo, microesferas de álcool estearílico contendo melatonina foram preparadas, visando o estudo das características da liberação do fármaco, em meio gástrico e intestinal artificiais. As microesferas apresentaram-se esféricas e com diâmetro entre 250 e 750 μm . Os resultados demonstraram que a velocidade de liberação da melatonina diminuiu com o aumento da quantidade de álcool esteárico, enquanto que aumentou como o aumento da quantidade de aditivos incorporados (polietilenoglicol 4000 e triestearato de alumínio), além de ser influenciada por parâmetros do processo de preparação, como velocidade de agitação e de resfriamento. O perfil de liberação da melatonina a partir das microesferas foi independente do pH do meio, entretanto, a quantidade liberada de fármaco em meio gástrico foi maior em relação àquela liberada em meio intestinal, para um dado período, independente dos parâmetros de processo. O efeito “*burst*” de liberação inicial foi atribuído ao fármaco situado na superfície externa das microesferas. Observou-se também que as

microesferas contendo melatonina, geleificadas juntas, usando quitosana ou alginato de sódio, também podem ser úteis para controlar a velocidade de liberação da mesma (LEE *et al.*, 1998).

EL-GIBALY e colaboradores (2002) desenvolveram microcápsulas do tipo flutuante (*floating*) contendo melatonina através de interação iônica de quitosana com um tensoativo negativamente carregado, o sulfossuccinato sódico de dioctila. Foi verificado que as partículas possuem um núcleo oco esférico, contendo o fármaco no estado cristalino, o qual apresentou eficiência de incorporação entre 31,2 e 59,74 %, dependendo da composição da formulação. Os perfis de dissolução da melatonina a partir destes sistemas seguiram uma cinética próxima a ordem zero, em fluido gástrico simulado, apresentando 50 % de liberação entre 1,75 e 6,7 horas, enquanto que as micropartículas não-flutuantes (*non-floating*), preparadas com quitosana e tripolifosfato de sódio, liberaram rapidamente o fármaco. Estes mesmos autores, em 2003, desenvolveram microcápsulas de quitosana do tipo “*buoyant*” contendo melatonina e estudaram o efeito protetor destas (2,5 mg/kg/8 semanas) contra à toxicidade induzida por aflatoxina B1 em fígado de rato. Os resultados indicaram que a taxa de apoptose e os indicadores de estresse oxidativo (malondialdeído, óxido nítrico) foram significativamente reduzidos, enquanto que os níveis de antioxidantes hepáticos (glutathione, zinco, enzimas antioxidantes) foram significativamente aumentados devido à co-administração de aflatoxina e melatonina livre ou microencapsulada. Entretanto, a melatonina associada às microcápsulas (66,82 %) foi mais efetiva na redução da taxa apoptótica em comparação à melatonina em solução (36,12 %), como indicado pela redução da atividade da caspase-3, bem como redução dos níveis de malondialdeído e óxido nítrico. Os níveis de glutathione e glutathione reductase também foram mais elevados para a formulação em comparação à solução, provavelmente devido à liberação sustentada do fármaco a partir das micropartículas.

A melatonina tem sido também associada a α -, β - ou γ -ciclodextrinas (BONGIORNO *et al.*, 2002; LIU e FAN, 2005), sendo que seu anel indol representa uma estrutura lipofílica adequada para a formação de complexos de inclusão, dentro da cavidade hidrofóbica destes compostos (BONGIORNO *et al.*, 2002). KUMAR e

colaboradores (2003) prepararam comprimidos constituídos de bicamada, em que uma fração de fármaco foi associada a β -ciclodextrinas e a outra incorporada em matrizes de hipromelose e Carbopol[®] 971 P, para se alcançar uma liberação rápida inicial, seguida de uma liberação sustentada da melatonina, por um período de oito horas.

Estudos do *clearance* nasal de microesferas de amido contendo melatonina, demonstraram, através de cintilografia, que mais de 80 % da radioatividade proveniente destas formulações permaneceu na mucosa nasal após 2 horas da administração, comparado com somente 30% da radioatividade oriunda da solução do fármaco. Além disto, uma elevada biodisponibilidade absoluta da melatonina (84 %) foi alcançada (MAO *et al.*, 2004).

Mais recentemente, a influência da encapsulação da melatonina em micropartículas lipídicas (lipoesferas), dispersadas em um creme O/A, sobre sua fotostabilidade foi avaliada, empregando-se um simulador solar. A degradação da melatonina não encapsulada, misturada com microesferas sem fármaco, foi de 19,6 %, enquanto que, com a encapsulação em lipoesferas de triestearina, a diminuição do teor foi de apenas 5,6 %, após 2 horas de irradiação. Entretanto, as lipoesferas de tripalmitina não foram efetivas em proteger o fármaco, apresentando 18,9 % de degradação (TURSILLI *et al.*, 2005). Segundo os autores, o efeito de fotostabilização dos sistemas estudados correlacionou com as suas capacidades de modulação da difusão da melatonina.

WANG e colaboradores (2005) desenvolveram nanopartículas de selênio complexadas com melatonina, visando avaliar o efeito protetor hepático em camundongo contra lipopolissacarídeo do bacilo Calmette-Guérin, após administração intragástrica. Esta associação é interessante pois o selênio aumenta a atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase. Os resultados indicaram que os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico diminuíram e a atividade de enzimas antioxidantes aumentou devido à administração do complexo, sendo o efeito protetor maior em relação à administração dos dois componentes individualmente.

Recentemente, DUBEY e colaboradores (2006) prepararam lipossomas elásticos, empregando fosfatidilcolina e desoxicolato de sódio, com eficiência de encapsulação máxima de $67 \pm 2 \%$ para a melatonina e com diâmetro médio de 118 ± 10 nm. Variando-se a concentração de melatonina de 0,1 a 2,0 % (m/m), a eficiência de encapsulação do fármaco permaneceu entre 62 ± 4 e $67 \pm 2 \%$, sendo que, nas concentrações de 1,2 e 2,0 %, cristais de fármaco foram observados. Estudos de permeação, em pele humana, demonstraram que os lipossomas elásticos aumentaram o fluxo transdérmico da melatonina, com diminuição do *lag-time* e com bom coeficiente de permeabilidade. O fluxo obtido foi próximo de 5 a 12 vezes maior do que aqueles alcançados com lipossomas convencionais (148 ± 9 nm; eficiência de encapsulação= $49 \pm 5 \%$) ou com a solução de melatonina, respectivamente.

**CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de suspensões e de produtos
secos de nanocápsulas contendo melatonina**

2.1. Introdução

A parte inicial do trabalho foi dedicada ao desenvolvimento e à caracterização físico-química de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo melatonina (0,5 mg/mL), empregando-se o método clássico de deposição interfacial de polímeros pré-formados. A composição das formulações foi avaliada, variando-se o tipo de núcleo oleoso, os tipos de tensoativos, o tipo de polímero e o tipo de sistema formado (nanocápsulas, nanoesferas ou nanoemulsão). Poliésteres [poli(ϵ -caprolactona) e poli(lactídeo)] e derivados polimetacrilatos (Eudragit S100[®] e Eudragit RS100[®]) foram empregados como polímeros.

Além disto, foi realizada a secagem por aspersion da formulação selecionada, objetivando-se verificar a possibilidade de preparação de pós de nanocápsulas contendo melatonina, bem como a habilidade destes sistemas em controlar a liberação do fármaco e aumentar a estabilidade física em relação às suspensões nanoparticuladas.

PUBLICAÇÃO 2: Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin

Artigo publicado no Journal of the Brazilian Chemical Society

(J. Braz. Chem. Soc., v. 17, nº 3, p. 562-569, 2006)

Development of Nanocapsule Suspensions and Nanocapsule Spray-Dried Powders Containing Melatonin

Scheila R. Schaffazick,^a Adriana R. Pohlmann,^{a,b} Graziela Mezzalana^a and Sílvia S. Guterres^{*,a}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre-RS, Brazil

^bDepartamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, 91501-970 Porto Alegre-RS, Brazil

Suspensões de nanocápsulas contendo melatonina foram preparadas pelo método de deposição interfacial e caracterizadas (tamanho, morfologia e eficiência de encapsulação). Foram avaliadas as influências do tipo de polímero, de óleo e de tensoativo sobre as características dos produtos. A eficiência de encapsulação da melatonina variou de 30% a 56% e a natureza do polímero foi o parâmetro de maior influência. De acordo com a maior eficiência de encapsulação, nanocápsulas preparadas com Eudragit S100[®] foram selecionadas para secagem por aspersão, objetivando-se aumentar a estabilidade física das suspensões e controlar a liberação da melatonina. O pó obtido apresentou eficiência de encapsulação de 93% e não sofreu nenhuma alteração morfológica após 12 meses de armazenamento. Este sistema apresentou perfil de liberação controlado, comparativamente ao fármaco puro, o qual foi ajustado ao modelo monoexponencial. O mecanismo de liberação da melatonina foi baseado em intumescimento e dissolução do polímero.

Nanocapsule suspensions containing melatonin were prepared by interfacial deposition method and characterized (size, morphological aspect and encapsulation efficiency). The formulation parameters studied were the oil nature, the type of surfactants and the type of polymer. The melatonin-encapsulation efficiency ranged between 30% and 56% and polymer nature was the parameter that more influenced the characteristics of suspensions. According to the highest encapsulation efficiency, the nanocapsules prepared with Eudragit S100[®] were selected to be spray-dried in order to improve the physical stability of suspension and to control the release of melatonin. The melatonin-loaded nanocapsule spray-dried powder presented encapsulation efficiency of the 93% and no morphological alterations were observed after 12 months of storage. This system showed a controlled release profile in comparison to the dissolution of the pure melatonin. The release profile was fitted to monoexponential model and the melatonin release mechanism was based on swelling and dissolution of the polymer.

Keywords: melatonin, nanocapsules, nanoparticles, spray-dried powders

Introduction

Melatonin, *N*-acetyl-5-methoxytryptamine (Figure 1), is a hormone secreted at night-time by the pineal gland of mammals and it is involved in the regulation of the sleep-wake cycle, as well as in several biological functions, such as the modulation of mood, the control of seasonal reproduction in animals, the circadian rhythm regulation, the normal patterns of sleep,¹ and the neuroimmuno-modulation in humans.² The administration of the exogenous

melatonin has been employed for circadian rhythm disorders as jet-lag and insomnia.¹ Beyond the potent antioxidant activity, the melatonin is a free radical scavenger,³ protects against lipid peroxidation in several models⁴ and against oxidative stress observed in some neurodegenerative diseases such as Alzheimer.⁵ It also protects against ischemia/reperfusion injury⁶ and presents anti-tumor activities.⁷

However, melatonin has a very short half-life, low and variable bioavailability, presumably due to extensive first-pass metabolism and/or variable absorption, when administered orally. For these reasons melatonin is not a good candidate for conventional oral immediate-release

* e-mail: nanoc@farmacia.ufrgs.br

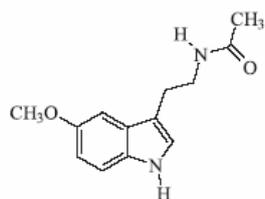


Figure 1. Melatonin structure (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine).

formulations.^{8,9} Indeed, exogenous melatonin in sustained release formulations were reported to be clinically more useful to maintain sleep and treat circadian rhythm disorders when compared to immediate release formulations. In this way, sustained release dosage forms to deliver melatonin have been investigated.⁸⁻¹⁴ Lee *et al.*⁸ obtained sustained release formulations of melatonin using hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. According to the studies conducted by Lee and Mim,¹¹ the sustained release formulations of melatonin using alginate beads may be an alternative for oral delivery of this drug. El-Gibaly *et al.*⁹ have developed buoyant melatonin-loaded chitosan microcapsules presenting sustained release characteristics. They verified that these microcapsules were more effective in reducing the aflatoxin B1-induced apoptotic rate than free melatonin.

The interest in nanoparticulate systems for controlling release of drugs has been growing in pharmaceutical field for parenteral, oral or topical administration. Nanoparticles are defined as colloidal polymeric particles containing a drug, including nanocapsules and nanospheres. Nanocapsules are carriers composed of an oil core surrounded by a polymeric wall, whereas nanospheres consists of a polymeric matrix.¹⁵⁻¹⁷ Both colloids are stabilized by surfactants at the particle/water interface. These systems can be prepared by methods based on the polymerization of dispersed monomers or the dispersion of a preformed polymer.¹⁸

For i.v. route, nanoparticle suspensions have been developed for drug targeting delivery, improving the therapeutic index,^{15,17,19} whereas for oral administration, polymeric nanoparticles have been studied for protecting the mucosa from the toxicity of drugs,²⁰ for sustaining the release of drugs²¹ and for improving of the bioavailability of drugs.²² However, these aqueous suspensions present disadvantages because during the storage physico-chemical instability due to the agglomeration and the sedimentation of particles^{23,24} and microbiological contamination can occur. In the literature, approaches employing freeze-drying^{23,25,26} and spray-drying techniques^{27,28} have been reported in order to improve the stability of nanoparticles by means of the conversion of the suspension into powders. In previous studies we obtained oral solid forms containing

non-steroidal anti-inflammatory drug-loaded nanoparticles, using spray-drying technique and colloidal silicon dioxide (Aerosil 200®) as drying adjuvant.^{27,28} The morphological analysis of these systems demonstrated that the spray-dried powders presented spherical microparticles showing nanoparticles on their surfaces.

Recently we have associated melatonin into nanoparticles systems, prepared by the nanoprecipitation technique. These nanoparticles provided an important increase in the effect of melatonin against lipid peroxidation of the microsomes and phosphatidylcholine liposomes.²⁹ Taking these results into account, the aim of the present work is to prepare and to characterize nanocapsule suspensions containing melatonin, studying the influence of the formulation composition on the physico-chemical properties of these colloids. For comparison, nanospheres and nanoemulsion were also prepared. The formulations were characterized in terms of the macroscopic and microscopic aspects, the particle mean diameters, the pH values, the melatonin contents and the encapsulation efficiencies. The possibility of preparing melatonin-loaded nanocapsule spray-dried powders with the aim of improving the stability of these aqueous systems and controlling the release of this drug has been also investigated.

Experimental

Chemicals and reagents

Melatonin was obtained from Sigma (St. Louis, USA). Poly(ϵ -caprolactone) [MW= 60,000 g mol⁻¹] and poly(lactide) (Resomer® R 206) were supplied by Aldrich (Strasbourg, France) and Boehringer Ingelheim (Germany), respectively. Eudragit S 100® and Eudragit RS 100® were obtained from Almapal (São Paulo, Brazil). Caprylic/capric triglyceride and mineral oil were obtained from Brasquim (Porto Alegre, Brazil) and Fraccionata (Porto Alegre, Brazil), respectively. Sorbitan monostearate (Span 60®), sorbitan monooleate (Span 80®) and polysorbate 80 (Tween 80®) were acquired from Delaware (Porto Alegre, Brazil). Poloxamer 188 (Pluronic® F68) was obtained from Sigma (St. Louis, USA). All other chemicals and solvents used were of pharmaceutical grade. All reagents were used as received.

Preparation of nanocapsule suspensions by interfacial deposition of a preformed polymer

Nanocapsules containing melatonin were prepared as described by Fessi *et al.*³⁰ Briefly, the lipophilic solution consisted of 0.8 mL oil (caprylic/capric triglyceride or mineral oil), 250 mg polymer [poly(ϵ -caprolactone), poly(lactide), Eudragit® S100 or Eudragit®

RS100)], melatonin (0.5 mg mL⁻¹), 192 mg surfactant (Span 60® or Span 80®) and 67 mL acetone. This organic phase was added with magnetic stirring into an aqueous solution (133 mL) containing 192 mg surfactant (Tween 80® or Pluronic F68®). The solvents were removed by evaporation under reduced pressure and the final volume of suspension was adjusted to a total volume of 25 mL. Nanospheres and nanoemulsion were also prepared as described above for nanocapsules, omitting the oil and the polymer, respectively.

Characterization of suspensions

The physicochemical analysis of nanoparticles was carried out immediately after preparation. The pH values of suspensions were determined using potentiometer B474 (Micronal, Brazil) after preparation. The particle size was measured by photon correlation spectroscopy (PCS). For PCS measurements, 20 µL of each suspension were diluted to 10 mL. Measurements were made at room temperature (20 °C) and fixed angle of 90°, using a Brookhaven Instruments standard setup (BI-200M goniometer, BI-9000AT digital correlator and a BI9863 detection system). A Spectra Physics He-Ne laser (model 127, $\lambda_0 = 632,8$ nm) was used as light source.²⁸ The morphological analysis was conducted by transmission electron microscopy (TEM; Jeol, JEM 1200 ExII) operating at 80 kV. For this analysis, the diluted suspension was deposited in Formvar-Carbon support film on specimen grid (Electron Microscopy Sciences) and negatively stained with uranyl acetate solution (2% m/v).

Determination of drug content for nanoparticle suspensions

Melatonin was assayed by high-performance liquid chromatography.²⁹ The system consisted of a UV/visible detector, pump and auto-injector S 200 Perkin Elmer (Shelton, USA) and Nova-Pak® C₁₈ 3.9 x 300 mm Waters column. The mobile phase consisted of acetonitrile/water (55:45). The total sample volume injected was 20 µL and melatonin was detected at 229 nm. Free melatonin (non-associated) was determined in the ultrafiltrate after separation of the nanoparticles by ultrafiltration-centrifugation technique (Ultrafree-MC 10,000 MW, Millipore), at 15,300 x g for 10 min. Total melatonin was measured using HPLC after the dissolution of colloidal suspension by acetonitrile. The melatonin associated with the nanoparticles (encapsulation efficiency) was calculated from the difference between the total and free drug concentrations measured in the nanoparticles suspension and in the ultrafiltrate, respectively.

Preparation of nanocapsule spray-dried powders

To the suspension of nanocapsules was added 3% (m/v) of colloidal silicon dioxide and the mixture was fed into a mini-spray-dryer Büchi MSD 190 (Flawil, Switzerland) with a two-component nozzle and co-current flow.²⁷ The inlet temperature at the drying chamber was maintained around 150 °C ± 4 °C and outlet temperature was 107 ± 4 °C. The spray rate feed was 3 mL min⁻¹. The spray-dried powders were prepared in triplicate.

Characterization of nanocapsule spray-dried powder

The yields of the spray-dried powders were calculated by the sum of the weights of all components, discounting the content of water in the suspensions. After stirring the powders in acetonitrile for 90 minutes, at room temperature, followed by centrifugation and filtration (membrane GVWP, 0.45 µm, Millipore) the encapsulation efficiency of melatonin was determined by HPLC (Waters, USA - pump 600 controller; 2487 Dual λ absorbance detector; 717 plus autosampler). The Merck column LiChrospher® RP-18 (250 x 4 mm; Germany) was employed. The mobile phase consisted of acetonitrile/water (55:45). The total sample volume injected was 20 µL and melatonin was detected at 229 nm. The encapsulation efficiency (%) of spray-dried powder was calculated from the correlation of the theoretical and the experimental melatonin concentrations. The spray-dried powders, after gold sputtering, were examined under scanning electron microscopy (SEM) (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800) at 20 kV, using different magnifications, according to the methodology previously described in the literature.^{16,27} The moisture (%) was determined using Karl Fischer titration (Schott Titroline Alpha). The particle size distribution was determined by laser diffractometry using a Malvern laser sizer (Mastersizer 2000). Average particle size was expressed as volume mean diameter ($d_{4,3}$) in µm. The span was also calculated and it is defined as $(d_{(v,90)} - d_{(v,10)})/d_{(v,50)}$, where $d_{(v,90)}$, $d_{(v,10)}$ and $d_{(v,50)}$ are the diameters at 90%, 10% and 50% cumulative volume, respectively. Thus, the span gives a measure of the range of the volume distribution relative to the median diameter.

In vitro drug release studies from spray-dried powders

The *in vitro* melatonin release test of the nanocapsule spray-dried powders was carried out using a flow-through cell technique. The apparatus is constituted by recycling flow-through cells (Desaga, Wiesloch, Germany) containing as a fluid inlet a bed of glass beads, and connected to a peristaltic pump (Desaga, Wiesloch,

Germany). The flow rate was 1 mL min⁻¹. The test was carried out using pH 7.4 phosphate buffer solution. The dissolution medium (37 ± 0.5 °C) was placed in an external vessel, connected with the cell through the pump. An exact amount of each powder (equivalent to 2 mg of melatonin) was placed in the cells for the release tests (n=3). The collected samples, at predetermined time intervals, were filtered through a membrane (GVWP, 0.45 µm, Millipore). The drug release/dissolved was assessed through HPLC analysis, as described above. The dissolution profiles of the drug were analyzed by mathematical models using the MicroMath Scientist® Program.

Physical stability evaluation of formulations

The nanocapsule suspension prepared using Eudragit® S100 and its corresponding spray-dried powders were stored, at room temperature and protected from light, for 12 months. The physical aspect of these formulations was evaluated after preparation and after 12 months of storage.

Results and Discussion

Influence of the formulation composition on the physico-chemical characteristics of melatonin loaded-nanocapsule suspensions

The parameters of the formulations studied were the oil nature, the type of surfactant and the type of polymer. The melatonin-loaded polymeric nanocapsules were obtained by interfacial deposition of preformed polymers using different components. All formulations presented macroscopic homogeneous aspect like a milky white bluish opalescent fluid (Tyndall effect) in agreement with the results previously reported in the literature for other nanocapsule systems.^{15,24,31}

Tables 1 and 2 show the physico-chemical characteristics of nanocapsule suspensions containing melatonin. These systems presented colloidal sizes between 204 and 280 nm, corroborating results previously observed for nanocapsules prepared by interfacial deposition.^{15,24,26,31} The suspensions showed acid pH values (3.97-5.62) and the total concentrations of melatonin were recovered as expected (0.5 mg mL⁻¹).

Table 1. The influence of the type of the surfactant on physicochemical characteristics of poly(ε-caprolactone)-nanocapsule suspensions containing melatonin (0.5 mg mL⁻¹), using caprylic/capric triglyceride as oil core

Surfactants	Total Conc. (mg mL ⁻¹)	Melatonin Encapsulated (%)	Size (nm)	pH
Sorbitan monooleate/ Pluronic F68®	0.50	33	280 ± 14	5.62
Sorbitan monostearate/ polysorbate 80	0.45	36	264 ± 48	4.37
Sorbitan monooleate/ polysorbate 80	0.49	37	264 ± 24	5.38

Regarding the melatonin-encapsulation efficiencies, the values ranged between 33 and 56%, depending on the composition of the formulations (Table 1 and 2). Concerning the influence of oil core, the melatonin-encapsulation efficiency for the caprylic/capric triglyceride (37%) was slightly higher than that for the mineral oil (31%). Moreover, the oil nature did not influence the size of the poly(ε-caprolactone)-nanocapsules containing melatonin (caprylic/capric triglyceride = 264 ± 24 nm; mineral oil = 266 ± 40 nm).

Nanocapsules can be stabilized by steric or electrostatic repulsion, depending on the nature of the surfactant. Surfactants are necessary to obtain small and stable oil droplets.³² In this way, surfactants can affect the physico-chemical properties of the nanoparticles, such as size and drug loading.^{32,33} However, in this work, the nature of surfactants (Table 1) did not present a major influence on the size of particles and on the drug encapsulation for poly(ε-caprolactone)-nanocapsules containing melatonin.

The melatonin-encapsulation efficiency was mainly influenced by the polymer nature (Table 2). The formulations prepared with polymethacrylates (Eudragit® RS100 and Eudragit® S100) presented the encapsulation efficiencies of 45% and 56% (Table 2), respectively, while using polyesters [poly(ε-caprolactone) and poly(lactide acid)] these values were around 37%. These results could be attributed to the difference of the drug affinity for the polymeric materials.

It was verified that melatonin-encapsulation efficiencies into Eudragit® S100-nanocapsules (56%) are higher than for nanoemulsion formulations (33%) that have been prepared in the absence of the polymer (Table 3).

Table 2. The influence of the type of the polymer on physicochemical characteristics of nanocapsule suspensions containing melatonin (0.5 mg mL⁻¹), prepared using polysorbate 80, sorbitan monooleate, and caprylic/capric triglyceride as oil core

Polymer	Total Conc. (mg mL ⁻¹)	Melatonin Encapsulated (%)	Size (nm)	pH
Poly(ε-caprolactone)	0.49	37	264 ± 24	5.38
Poly(lactide)	0.48	38	216 ± 36	4.08
Eudragit RS100®	0.51	45	204 ± 30	4.29
Eudragit S100®	0.52	56	236 ± 20	3.97

In the case of poly(ϵ -caprolactone), no significant increase in drug entrapment has been verified comparing the systems prepared with the polymer (37%) or in its absence (33%). Comparing the size of the nanocapsules (204-264 nm; Table 2) and nanoemulsion (246 nm; Table 3), it can be observed that the presence of polymers in the former did not influence the diameter of the particles. Similar results were observed for poly(ϵ -caprolactone)-nanocapsules (236 nm) and nanoemulsion (216 nm) containing indomethacin, prepared using Miglyol[®] 840.³⁴

The formulations prepared with poly(ϵ -caprolactone) or Eudragit[®] S100 (nanospheres and nanocapsules) presented similar encapsulation efficiencies (Table 3). On the other hand, the absence of an oil core in nanospheres led to smaller particles (126 and 182 nm) compared to the nanocapsules (236 and 264 nm). These differences of size between nanocapsules and nanospheres have also been reported for other similar systems.^{26,35}

According to Figure 2, the TEM micrographs of melatonin-loaded Eudragit[®] S100-nanocapsules present spherical shape as well as homogeneous size distribution. Observing these images, the particles show size around 200 nm confirming the results obtained by PCS (Table 2).

Nanocapsule spray-dried powders

Based on the highest melatonin-encapsulation efficiency, the nanocapsules prepared with Eudragit[®] S100 (Table 2) were selected to be spray-dried in order to obtain nanocapsule spray-dried powder containing melatonin. In this way, the process yields were $74 \pm 2\%$, similar to those described in our previous works for non-steroidal anti-inflammatory drugs spray-dried powders using silicon dioxide as drying adjuvant.²⁷ The encapsulation efficiency of melatonin in these powders was $93 \pm 3\%$, and moisture content was lower than 2%.

Concerning the morphological analysis of spray-dried powders performed by SEM (Figures 3a, 3c, 3e), the microparticles presented spherical shape and relatively narrow diameter distribution. The microparticles presented $d_{(4,3)}$ of 5.8 μm and $d_{(v,90)}$, $d_{(v,50)}$ and $d_{(v,10)}$ were 10.3 μm , 4.9 μm and 2.4 μm , respectively. The relatively narrow

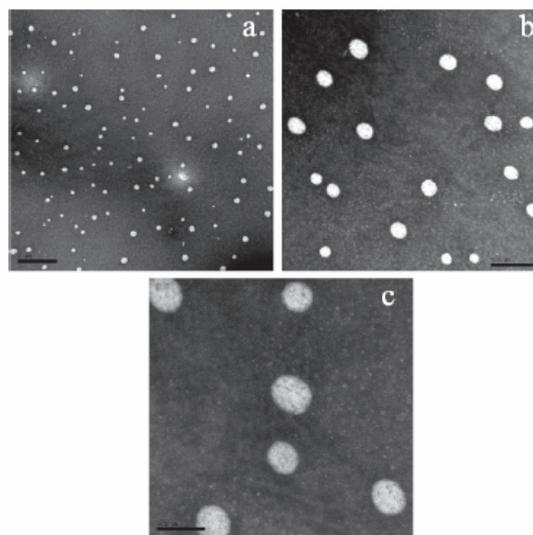


Figure 2. Transmission electron microscopy images of Eudragit S100[®]-nanocapsule suspension containing melatonin [bar = 1 μm (a), 0.5 μm (b), 0.2 μm (c)].

diameter distribution observed by SEM analysis was confirmed by the low span value (1.6)³⁶ and it was in accordance with the range obtained for other microparticle systems prepared by spray-drying technique.³⁷

Through SEM analysis, at higher magnification (Figures 3b, 3d), nanostructures were observed on the surfaces of the microparticles. These results can be confirmed comparing these Eudragit[®] S100-nanocapsule spray-dried surfaces (Figures 3b, 3d) with particle surfaces of raw silicon dioxide spray-dried (Figure 3f) powder. The nanostructures presented size about 200 nm (Figures 3b, 3d) similar to those observed for the corresponding original suspension by PCS (Table 2 and Figure 2).

Physical stability evaluation

Regarding the stability, after 3.5 months of preparation at room temperature, the Eudragit[®] S100-nanocapsule suspension presented precipitates on the wall of flasks, demonstrating its physical instability as a function of the storage time. After 12 months, this suspension presented two

Table 3. Influence of the presence of polymer and/or oil, on physicochemical characteristics of several colloidal formulations containing melatonin (0.5 mg mL⁻¹), prepared using polysorbate 80 and sorbitan monooleate as surfactants

Polymer	System	Oily core	Total Conc. (mg mL ⁻¹)	Melatonin encapsulated (%)	Size (nm)	pH
Eudragit S100 [®]	Nanospheres	-	0.46	54	126 \pm 12	3.88
Eudragit S100 [®]	Nanocapsules	Triglyceride ^a	0.52	56	236 \pm 20	3.97
Poly(ϵ -caprolactone)	Nanospheres	-	0.48	39	182 \pm 8	5.04
Poly(ϵ -caprolactone)	Nanocapsules	Triglyceride ^a	0.49	37	264 \pm 24	5.38
-	Nanoemulsion	Triglyceride ^a	0.49	33	246 \pm 4	5.15

^aCaprylic/capric triglyceride.

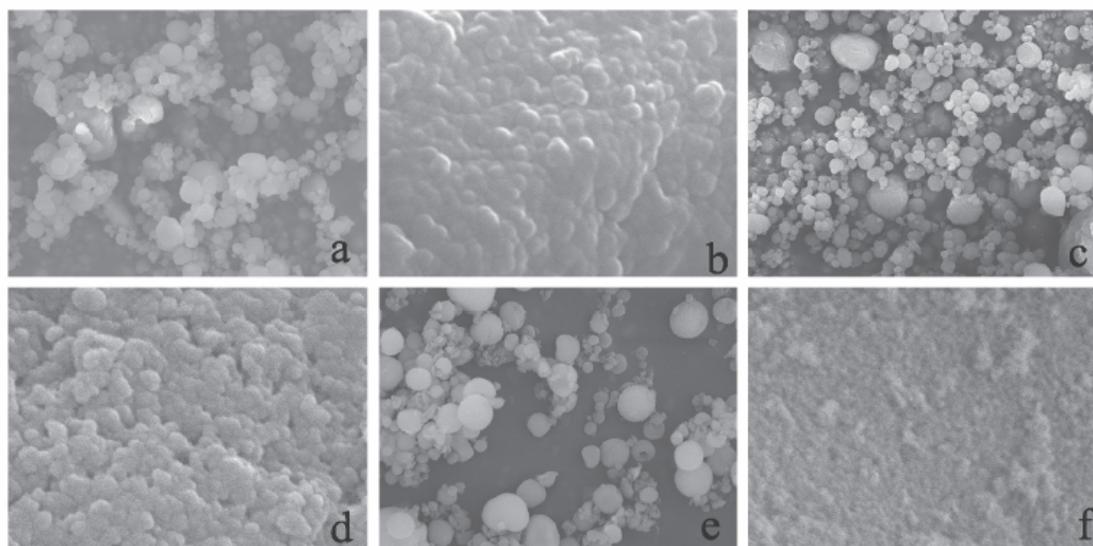


Figure 3. Images obtained by scanning electron microscopy (SEM) of the Eudragit S100[®] nanocapsule spray-dried powder containing melatonin, after preparation (a,b) and after 12 months of storage (c,d) and silicon dioxide spray-dried (e, f). [a, c, e (1,000 X) – the photo width corresponds to 132 μm]; [b, d, f (45,000 X) – the photo width corresponds to 2.93 μm].

particle populations, one presenting mean diameter of 283 ± 55 nm and the other presenting size larger than 1000 nm, showing particle agglomeration (initial diameter is 236 ± 20 nm, Table 2). On the other hand, this spray-dried nanocapsule formulation presented stable macroscopic aspect after 12 months of storage. In addition, comparing the initial microscopic aspect of the powders (Figures 3a and 3b) with that observed after 12 months of storage (Figures 3c and 3d), no morphological alterations were verified.

In vitro release profiles

Figure 4 shows the release profile of melatonin from the Eudragit[®] S100-nanocapsule spray-dried powder and the dissolution of the pure drug. Mathematical modeling (zero order, first order, biexponential) was applied to obtain information about the kinetics of melatonin dissolution and release behavior. After fitting these models, the model was selected based on the highest correlation coefficient (r) and highest model selection criterion (MSC), as well as the best curve fitting. MSC is a modified Akaike information criterion provided by the MicroMath Scientist[®] Program that allows the comparison of various data sets fitted to a selected model. Greater MSC values indicate more appropriate fits. According to these criteria, both zero order and biexponential models failed to fit the dissolution and release profiles. The monoexponential (first order) was the best model to describe the dissolution and release profiles for both pure and encapsulated drug (Figure 4). In this way, it was observed

that the release rate of melatonin-loaded nanocapsule spray-dried powder has been modified in comparison with the dissolution profile of the pure melatonin in pH 7.4 phosphate buffer solution. In this medium, after two hours 96% and 71% of melatonin were dissolved from pure drug and released from nanocapsule spray-dried powder, respectively. For the pure melatonin, the dissolution rate constant (k) was 0.023 ± 0.003 min^{-1} , while for melatonin-loaded spray-dried powder it was 0.010 ± 0.001 min^{-1} , showing a slower melatonin dissolution from the powder than from the pure drug.

In order to gain some insight into the drug release mechanism, a very simple and semi-empirical equation to describe drug release from polymeric systems, the power law (Krosmeier-Peppas model), was also applied ($f_t = a \cdot t^n$). In this equation, f_t is the drug dissolved fraction at time t , n is the release exponent, indicative of the mechanism of the drug release and a is the constant incorporating structural and geometric characteristics of the drug dosage form.³⁸ For spherical systems, when the exponent n assumes a value of 0.43, between 0.43 and 0.85, 0.85 or greater than 0.85 the drug release rate is governed by Fickian diffusion, anomalous transport, Case-II transport, or super Case-II transport, respectively. The parameters a and n were obtained from the initial portion of the curve (% released $\leq 60\%$; Figure 5), according to the literature.^{39,40} In this work, the power law presents the corresponding fit: $f_t = 1.001 t^{0.908}$, $r = 0.998$ (MSC = 5.09). This calculated exponent n shows that melatonin release mechanism is based on super Case-II transport (non-Fickian model). In this way, the

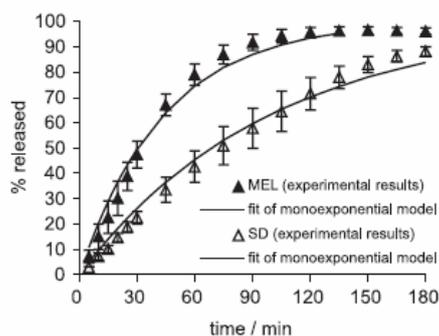


Figure 4. The release profile of melatonin-loaded nanocapsule spray-dried powder (SD) in comparison with the dissolution of the pure drug (MEL), in pH 7.4 phosphate buffer solution.

melatonin release can be explained by the superposition of swelling, relaxation and dissolution of the polymer, which dissolves in pH values above 7.0.⁴¹

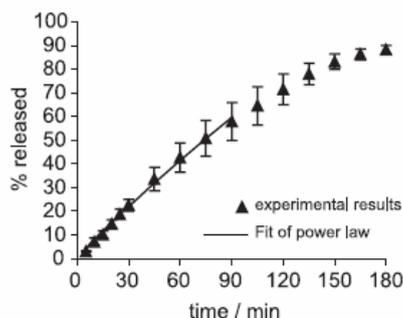


Figure 5. Fit of experimental melatonin release from Eudragit® S100-nanocapsule spray-dried powder by Krosmeier-Peppas model (drug release limited up to 60%).

Conclusions

Results from this investigation showed that homogeneous nanocapsule suspensions containing melatonin can be prepared using preformed polymers by interfacial deposition technique. The physico-chemical characteristics of these systems have been altered depending on the composition of the formulations. In addition, the melatonin loaded-nanocapsule spray-dried powder prepared using silicon dioxide has been successfully obtained. This powder improved the physical stability of the product compared to the original nanocapsule aqueous suspension. The melatonin-loaded nanocapsule spray-dried powder showed a controlled release profile in comparison to the dissolution of the pure melatonin. The monoexponential model was the best one to describe the dissolution and release profiles. Moreover, regarding the parameters calculated using the power law, it was suggested that the melatonin release from Eudragit® S100-nanocapsule spray-dried powder was governed by swelling, relaxation and dissolution of the polymer.

Acknowledgments

We thank financial support received from CNPq, FAPERGS, CAPES, Rede Nanobiotec-CNPq/MCT-Brazil.

References

- Beyer, C. E.; Steketee, J. D.; Saphier, D.; *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1265; Reiter, R. J.; *Best Pract. Res. Clin. Endoc. Metab.* **2003**, *17*, 273; Cajochen, C.; Kräuchi, K.; Wirz-Justice, A.; *J. Neuroendocrinol.* **2003**, *15*, 432.
- Liebmann, P.; Wöler, A.; Felsner, P.; Hofer, D.; Schauenstein, K.; *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1997**, *112*, 203.
- Brömme, H. J.; Mörke, W.; Peschke, E.; Ebel, H.; Peschke, D.; *J. Pineal Res.* **2000**, *29*, 201.
- Leaden, P.; Barrionuevo, J.; Catalá, A.; *J. Pineal Res.* **2002**, *32*, 129; Saija, A.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Pellegrino, M. L.; Tita, B.; Caruso, S.; Castelli, F.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *53*, 209; Teixeira, A.; Morfim, M. P.; Cordova, C. A. S.; Charão, C. C. T.; Lima, V. R.; Creczynski-Pasa, T. B.; *J. Pineal Res.* **2003**, *35*, 262.
- Pappolla, M. A.; Simovich, M. J.; Bryant-Thomas, T.; Chyan, Y.-J.; Poeggler, B.; Dubobovich, M.; Bick, R.; Perry, G.; Cruz-Sanchez, F.; Smith, M. A.; *J. Pineal Res.* **2002**, *32*, 135.
- Reiter, R. J.; Tan, D.-X.; *Cardiovasc. Res.* **2003**, *58*, 10.
- Vijayalaxmi, C. R. T.; Reiter, R. J.; Herman, T. S.; *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 2575.
- Lee, B.-J.; Ryu, S.-G.; Cui, J.-H.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 493.
- El-Gibaly, I.; Meki, A. M. A.; Abdel-Ghaffar, S. K.; *Int. J. Pharm.* **2003**, *260*, 5.
- Lee, B.-J.; Parrot, K. A.; Ayres, J. W.; Sack, R. L.; *Int. J. Pharm.* **1995**, *124*, 119.
- Lee, B.-J.; Mim, G.-H.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *144*, 37.
- Lee, B.-J.; Parrot, K. A.; Ayres, J. W.; Sack, R. L.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1996**, *22*, 269.
- Lee, B.-J.; Choe, J. S.; Kim, C.-K.; *J. Microencapsul.* **1998**, *15*, 775.
- El-Gibaly, I.; *Int. J. Pharm.* **2002**, *249*, 7.
- Couvreur, P.; Barrat, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C.; *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **2002**, *19*, 99.
- Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Lucca-Freitas, L.; Pohlmann, A. R.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 726.
- Legrand, P.; Barrat, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J.-P.; *S. T. P. Pharma Sci.* **1999**, *9*, 411.
- Vauthier-Holtzcherer, C.; Benabbou, S.; Spenehauer, G.; Veillard, M.; Couvreur, P.; *STP Pharma Sci.* **1991**, *1*, 109; Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 1113.
- Couvreur, P.; Dubernet, C.; Puisieux, F.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995**, *41*, 2.

20. Guterres, S. S.; Müller, C. R.; Michalowski, C. B.; Pohlmann, A. R.; Dalla-Costa, T.; *STP Pharma Sci.* **2001**, *11*, 229.
21. Verger, M.L.-Le.; Fluckiger, L.; Kim, Y.-H.; Hoffman, M.; Maincent, P.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 137.
22. Allémann, E.; Leroux, J.-C.; Gurny, R.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *34*, 171.
23. Saez, M.; Gusmán, M.; Molpeceres, J.; Aberturas, M. R.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 379.
24. Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Lucca-Freitas, L.; Guterres, S. S.; *Acta Farm. Bonaerense* **2002**, *21*, 99.
25. Molpeceres, J.; Aberturas, M.R.; Chacón, M.; Berges, L.; Guzmán, M.; *J. Microencapsul.* **1997**, *14*, 777.
26. Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Dalla-Costa, T.; Guterres, S. S.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, *56*, 501.
27. Müller, C. R.; Bassani, V. L.; Pohlmann A. R.; Michalowski, C. B.; Petrovick, P. R.; Guterres, S. S.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2000**, *26*, 343; Guterres, S. S.; Weiss, V.; Lucca-Freitas, L.; Pohlmann, A. R.; *Drug Deliv.* **2000**, *7*, 195; Müller, C. R.; Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Lucca-Freitas, L.; Silveira, P.; Dalla-Costa, T.; Guterres, S. S.; *Pharmazie* **2001**, *56*, 864; Beck, R. C. R.; Pohlmann, A. R.; Benvenuti, E. V.; Costa, T. D.; Guterres, S. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1233.
28. Pohlmann, A. R.; Weiss, V.; Mertins, O.; Pesce da Silveira, N.; Guterres, S. S.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *16*, 305.
29. Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A.R.; de Cordova, C. A. S.; Creczynski-Pasa, T. B.; Guterres, S. S.; *Int. J. Pharm.* **2005**, *289*, 209.
30. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-Ph; Ammoury, N.; Benita, S.; *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, r1.
31. Santos-Magalhães, N. S.; Pontes, A.; Pereira, V. M. W.; Caetano, M. N. P.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *208*, 71.
32. Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barratt, G.; *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 614.
33. Magenheimer, B.; Benita, S.; *S. T. P. Pharma Sci.* **1991**, *1*, 221; Paul, M.; Fessi, H.; Laataris, A.; Boulard, Y.; Durand, R.; Deniau, M.; Astier, A.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *159*, 223.
34. Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 530.
35. Teixeira, M.; Alonso, M. J.; Pinto, M. M. M.; Barbosa, C. M.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *59*, 491.
36. Chen, J.; Davis, S. S.; *J. Microencapsul.* **2002**, *19*, 191.
37. Oneda, F.; Ré, M. I.; *Powder Technol.* **2003**, *130*, 377.; Oliveira, B. F.; Santana, M. H. A.; Ré, M. I.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2005**, *22*, 353.
38. Krosmeier, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E. M.; Buri, P.; Peppas, N. A.; *Int. J. Pharm.* **1983**, *15*, 25.
39. Costa, P.; Lobo, J. M. S.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 123; Siepmann, J.; Peppas, N.A.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *48*, 139.
40. Sezer, A. D.; Akbuga, J.; *Int. J. Pharm.* **1995**, *121*, 113; Bonferoni, M. C.; Rossi, S.; Ferrari, F.; Bertoni, M.; Bolhuis, G. K.; Caramella, C.; *J. Control. Release* **1998**, *51*, 231.
41. Kibbe, A.H.; *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd ed., American Pharmaceutical Association: Washington, 2000.

Received: August 14, 2005

Published on the web: April 12, 2006

CAPÍTULO 3: Suspensões de nanocápsulas, nanoemulsão e nanodispersão de tensoativos contendo melatonina: preparação, caracterização e estudo de estabilidade

3.1 Introdução

No presente capítulo, a concentração de melatonina nas suspensões de nanocápsulas (1,5 mg/mL) foi aumentada, em relação ao capítulo anterior, e a estabilidade físico-química foi avaliada, sob diferentes condições de armazenamento, durante três meses.

O estudo da estabilidade é importante levando-se em conta o fato de que a melatonina pode sofrer oxidação, apresentando fotossensibilidade (ANDRISANO *et al.*, 2000), e que as suspensões de nanopartículas podem também apresentar problemas de estabilidade físico-química durante o armazenamento (COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a).

O objetivo deste capítulo foi, então, verificar por quanto tempo as suspensões de nanocápsulas são estáveis, levando-se em conta as taxas de associação, os teores totais de fármaco, os valores de pH e diâmetros médios de partículas, além de verificar se a luz natural ou a temperatura têm influência sobre estes parâmetros. A poli(ϵ -caprolactona), o Eudragit RS100[®] e o Eudragit S100[®] foram os polímeros utilizados no estudo. A estabilidade da nanoemulsão e da dispersão dos tensoativos contendo melatonina também foi estudada, para fins comparativos.

PUBLICAÇÃO 3: Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: preparation, characterization and stability evaluation

Artigo aceito para publicação no periódico Die Pharmazie

**Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin:
Preparation, characterization and stability evaluation**

S. R. Schaffazick¹, A. R. Pohlmann², S. S. Guterres^{1*}

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.*

²*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.*

Corresponding author:

Prof. Sílvia S. Guterres

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752,
90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55 51 33165411 Fax: 55 51 33165437

e-mail: nanoc@farmacia.ufrgs.br

Abstract

In our previous work, we have demonstrated that melatonin-loaded polymeric nanoparticles provided an important increase in the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation. Hence, in this work, the aim was to study the stability of nanocapsules containing melatonin (1.5 mg/mL) prepared by interfacial deposition, using different polymers. For comparison, the stability of the nanoemulsion and nanodispersion was also evaluated. These nanoparticulated systems presented diameters ranged between 134 and 325 nm. The associated melatonin concentrations ranged between 29 % and 50 %, depending on the composition of the nanocarriers. The stability evaluation of formulations was performed at room temperature and protected from or exposed to the natural light or at 50 °C and protected from the light. The stability of the nanocarriers was evaluated in terms of the macroscopic aspects, the total contents of melatonin, associated melatonin concentrations, pH and sizes of particles. The compositions of the nanocarriers and the condition of the storage influenced the stability of melatonin.

Key words: melatonin; nanocapsules; nanoemulsion; nanodispersion; physicochemical stability

1. Introduction

Melatonin (*N*-acetyl-5methoxytryptamine) is a lipophilic hormone mainly produced and secreted by the pineal gland (Barrenetxe et al. 2004). It was characterized after isolation from bovine pineal tissue about 50 years ago. Melatonin is synthesized and secreted during the dark phase of the day (Reiter 2003), and presents an important role in the biologic regulation of circadian rhythms, sleep, mood, aging, reproduction (Epstein 1997) and immunoenhancing effect (Esquifino et al. 2004). Furthermore, it is also a potent antioxidant, a free radical scavenger, a protector of nuclear DNA and membrane lipids against oxidative damage (lipid peroxidation), altering the activities of antioxidant enzymes and improving the total antioxidant defense capacity of the organism (Reiter et al. 1997; Reiter 2003). Hence, the pharmacological effects of melatonin have been investigated in sleep disorders (Siegrist et al. 2001), Alzheimer disease (Matsubara et al. 2003), alleviation of stress (Kirby et al. 1999), diabetes (Nishida et al. 2002), ischemia/reperfusion injury (Cuzzocrea and Reiter 2001), epilepsy (Gupta et al. 2004), cancer (Reiter 2003) and radiation protection (Vijayalaxmi et al. 2004).

Melatonin has a very short half-life, low and variable bioavailability presumably due to an extensive first-pass metabolism and/ or a variable absorption, when orally administered (Lee et al. 1999; El-Gibaly et al. 2003). In addition, melatonin is a poorly aqueous soluble hormone and presents slow dissolution characteristics (Kumar et al. 2003). For these reasons melatonin is not a good candidate for conventional oral immediate-release formulations (Lee et al. 1999; El-Gibaly et al. 2003). So, sustained release formulations containing melatonin have been developed for oral (Lee et al. 1995; Lee and Min 1996a; Lee et al. 1996b; Lee et al. 1998; El-Gibaly et al. 2002; El-Gibaly et al. 2003; Kumar et al. 2003), intranasal (Mao et al. 2004), transdermal, transmucosal (Bénès et al. 1997) and transepidermal (Kandimalla et al. 1999) administration. Modified release bi-layered tablets containing melatonin using β -cyclodextrin

(Kumar et al. 2003), microparticles (Lee et al. 1998; El-Gibaly 2002; Mao et al. 2004) and hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets (Lee et al. 1999) have been successfully prepared. Polymeric nanoparticles, submicronic systems, have been extensively studied as drug carriers. Nanocapsules are a particular type of nanoparticles composed by an oily core surrounded by a polymeric wall, stabilized by surfactants at the particle/water interface (Legrand et al. 1999; Couvreur et al. 2002; Schaffazick et al. 2003a). The potential uses of nanocapsules include the protection of drugs against inactivation in the gastrointestinal tract and the improvement of bioavailability of drugs (Allémann et al. 1998), the protection of gastrointestinal mucosa from toxicity of drugs (Guterres et al. 1995a; Guterres et al. 2001; Müller et al. 2001; Schaffazick et al. 2003b), the improvement of therapeutic index (Couvreur et al. 2002), the controlled release of drugs (Ferranti et al. 1999; Couvreur et al. 2002), the delivery of poorly water-soluble compounds (Legrand et al. 1999; Teixeira et al. 2005), the reduction of systemic side effects (Losa et al. 1993) and the improvement of antioxidant effect (Palumbo et al. 2002).

Recently, we have developed new melatonin delivery systems, based on its association in polymeric nanoparticles (Schaffazick et al. 2005; Schaffazick et al. 2006). The melatonin-loaded Eudragit S100[®]-nanoparticle suspensions provided an important increase in its antioxidant effect against the lipid peroxidation of the phosphatidylcholine liposomes and liver microsomes (Schaffazick et al. 2005).

However, the nanoparticle aqueous suspensions present physico-chemical instability during the storage due to the aggregation of particles (Molpeceres et al. 1997), the degradation of components such as the polymer (Guterres et al. 1995b; Calvo et al. 1996; Abdelwahed et al. 2006) or the decrease of the associated drug content (Lacoulonche et al. 1999; Abdelwahed et al. 2006).

Concerning the stability of melatonin, there is a lack of information about its storage at high temperatures. Cavallo and Hassan (1995) studied the melatonin stability in aqueous solution

(1.0-113.0 µg/mL) stored into sterile and pyrogen-free glass vacuum vials at -70 °C, at 4 °C and at room temperature. They verified that there was no loss of potency of melatonin up to 6 months. According to Daya et al. (2001) the melatonin content in aqueous solution (50 µg/mL) stored at pH range from 1.2 to 12, at room temperature or 37 °C, presented a decline lower than 30 % after 21 days. After UV irradiation, the major degradants of melatonin (Figure 1) were identified as *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynurenamine (**1**) and 6-hydroxymelatonin (**2**) (Maharaj et al. 2002). Those products retained the antioxidant capacity against lipid peroxidation in rat brain homogenate caused by quinolinic acid. According to Andrisano et al. (2000), the presence of oxygen is essential for the melatonin photodegradation and it is fast at pH 9, decreasing with the decrease in the pH of the solution. The possible mechanism for this degradation involves the photo-oxidation of the indole ring giving an endoperoxide, which rapidly rearranges to the stable product (**1**) (Figure 1).

Taking all of these into account, the aim of the present work was to prepare nanocapsules containing melatonin (1.5 mg/mL) using as polymer the poly(ε-caprolactone) and the polymethacrylates Eudragit S100[®] or Eudragit RS100[®], as well as to evaluate the stability of those systems stored at room temperature and protected from or exposed to natural light or at 50 °C and protected from the light. In order to compare the influence of the presence of the polymer in the formulations, the stability of melatonin was also carried out for drug-loaded nanoemulsion and drug-loaded nanodispersion, which nanocarriers correspond to a submicronic emulsion and to a submicronic dispersion of surfactants, respectively. The formulations were evaluated considering the total concentrations of melatonin, the associated drug concentrations, the pH values, the macroscopic aspects and the particle mean diameters.

2. Investigations, results and discussion

2.1. Characterization of nanocapsule suspensions

All formulations presented macroscopic homogeneous aspect and acid values of pH. The formulations containing oil core (nanocapsules and nanoemulsion) presented aspect of a milky white bluish opalescent fluid (Tyndall effect), while the nanodispersion of the surfactants presented bluish few opalescent aspect (almost transparent). The nanocarrier sizes were lower than 350 nm (Table 1), in agreement with the diameters usually found for nanocapsule formulations (Legrand et al., 1999). The total contents of melatonin (98 % to 105 % m/v) were close to the theoretical concentration (1.5 mg/mL) for all formulations (Table 1). Regarding the associated melatonin with nanocapsules, the values ranged from 38 % to 50 % (m/v) depending on the type of polymer employed. In our previous work (Schaffazick et al. 2006), the melatonin-loaded nanocapsules (0.5 mg/mL), prepared using the polymethacrylates, presented higher values of associated melatonin (45 % for Eudragit RS100[®] and 56 % for Eudragit S100[®]) if compared to the polyesters [around 37 % for both poly(ϵ -caprolactone) and poly(lactide)]. The increase in the concentration of melatonin from 0.5 mg/mL (Schaffazick et al. 2006) to 1.5 mg/mL did not result in an important change in the drug associated concentration (Table 1). On the other hand, the presence of the polymer in the nanocapsules promoted a significant increase in the drug associated concentration with the nanocarriers if compared to the nanoemulsion or nanodispersion, especially for the formulations prepared with the polymethacrylates (Table 1).

2.2. Stability study

2.2.1 Macroscopic aspects

The melatonin-loaded nanodispersion stored at 50 °C and under natural light presented slightly yellowish aspect after 1.5 month, probably due to the degradation of the melatonin. After 1.5 month, Eudragit RS100[®]-nanocapsules stored under natural light also presented

similar aspect. The other nanocapsule suspensions presented milky white opalescent aspects during the whole period, rendering difficult any visualization of the yellowish aspect. In addition, no formulation showed any precipitate after 3 months of storage.

2.2.2 Total contents of melatonin

The total contents of melatonin remained constant after 1 month of storage for all nanocapsule suspensions at all experimental conditions (Figure 2A, 2B, 2C). However, after 2 months a significant decrease of the drug recovery was verified, except in the case of poly(ϵ -caprolactone) formulation stored at room temperature and exposed to natural light. After this period, the decrease in the total content of drug ranged from 2 ± 2 % to 8 ± 3 % (room temperature), from 5 ± 3 % to 13 ± 3 % (natural light) and from 7 ± 3 % to 13 ± 3 % (50 °C). After 3 months, significant decreases in the total content of drug were observed: from 12 ± 2 % to 21 ± 2 % (room temperature), from 15 ± 1 % to 22 ± 5 % (natural light) and from 17 ± 2 % to 21 ± 2 % (50 °C). In the case of the nanoemulsion, a significant decrease in the drug content had already been observed after 1 month for formulations stored under natural light (8 ± 3 %) and at 50 °C (8 ± 4 %) (Figure 2D). On the other side, for nanoemulsion stored at room temperature, a significant decrease of the melatonin content was observed exclusively after 2 months (7 ± 5 %). In the case of the nanodispersion (Figure 2E), decreases of 9 ± 6 % and 7 ± 4 % in the melatonin contents were also observed after storage under natural light and at 50 °C after 1 month, respectively. For the nanodispersion stored at room temperature, the melatonin content significantly decreased after 2 months of storage (11 ± 3 %). After 3 months, the decreases in the content of melatonin for nanodispersion (15 ± 5 % to 19 ± 3 %) and for nanoemulsion (16 ± 1 % to 19 ± 3 %) were similar to those observed for nanocapsules.

Observing these results, it was verified that the decreases in the content of melatonin were slightly accelerated by the natural light and by the increase in the temperature (Figure 2).

Despite the partial encapsulation of melatonin (Table 1), the presence of the polymer (Eudragit RS100[®] and Eudragit S100[®]) in the nanocapsule formulations retarded in 1 month the decrease in the total content of the drug in comparison with the nanodispersion and the nanoemulsion (Figure 2), for formulations stored under natural light or at 50 °C. For the poly(ϵ -caprolactone) formulation, a significant decrease of drug content was observed exclusively after 3 months of storage at room temperature and at natural light, retarding the degradation of melatonin in 2 months as compared to the other nanocarrier systems. Tursilli et al. (2006) have also verified that the composition of the formulation influenced the photostability of melatonin associated with lipid microparticle carrier systems, observing that only the cream containing melatonin-loaded tristearin-phosphatidylcholine particles showed to improve the photostability of melatonin.

2.2.3. Values of pH

For the formulations prepared with poly(ϵ -caprolactone) or Eudragit RS100[®], the pH values significantly decreased after 30 days of the storage under all conditions (Figure 3A, 3B). For Eudragit S100[®], the formulations did not show significant changes in the pH values, after 90 days of storage (Figure 3C). In the case of nanodispersion and nanoemulsion (Figure 3D, 3E) the pH significantly decreased after 30 days of storage under all conditions, except for the nanodispersion stored at 50 °C that did not show significant changes after 90 days. The changes in the pH values of the formulations were probable due to the degradation of the formulation components in function of the time. Calvo et al. (1996) explained that the decreases in the pH values of the poly(ϵ -caprolactone)-nanoparticle suspensions were due to

the possible hydrolysis of the triglyceride (oil), leading to the release of free fatty acids, besides the production of free ϵ -hydroxycaproic acid as a result of polymer degradation.

2.2.4. Associated melatonin concentrations

The Figure 4 shows the associated melatonin concentrations during three months. For the formulations stored at room temperature, the associated melatonin concentrations with nanocapsules ranged from 49 % to 54 %, from 40 % to 45 %, and from 38 % to 45 % for Eudragit S100[®], Eudragit RS100[®] and poly(ϵ -caprolactone), respectively (Figure 4A, 4B, 4C). Therefore, for the formulations prepared with Eudragit S100[®] or Eudragit RS100[®] the associated drug did not present a major variation after 90 days of storage at room temperature, while the associated melatonin with poly(ϵ -caprolactone)-nanocapsules presented the tendency to increase in function of time, probably due to the adsorption of the drug on the polymer (Figure 4A). In the case of nanoemulsion and nanodispersion stored at room temperature (Figure 4D, 4E), the associated drug ranged from 36 % to 27 % and 31 to 22 %, respectively, showing a decrease in the associated melatonin with these nanocarriers in function of time. These results indicated that the polymeric wall had an important role in stabilizing the associated melatonin concentrations during storage.

The formulations prepared with Eudragit S100[®] or Eudragit RS100[®] (Figure 4B, 4C) presented decreases of the associated melatonin after 2 months of storage under natural light and after 1 month of storage at 50 °C for Eudragit RS100[®]. The nanoemulsion and the nanodispersion (Figure 4D, 4E) had already showed a partial loss of the associated melatonin after 1 month of storage under natural light and at 50 °C.

2.2.5. Mean size of nanocarriers

Comparing the particles sizes after preparation and after 90 days of storage, the nanocapsules and nanoemulsion did not present a significant variation on the mean sizes (Figure 5A, 5B,

5C, 5D). These results showed that the nanocapsules or nanoemulsion did not agglomerate during this period independently on the condition of storage, showing physical stability. However, for the nanodispersion (Table 1, 134 ± 3 nm), the nanocarriers had already presented significant increase in the mean diameter after 2 months, when stored under natural light (178 ± 4 nm) and at 50 °C (183 ± 9 nm). Furthermore, a significant increase of the mean size of the nanodispersion stored at room temperature (188 ± 8 nm) occurred after 3 months (Figure 5E).

In conclusion, it was possible to obtain relatively stable nanocapsule suspensions containing 1.5 mg/mL of melatonin, using poly(ϵ -caprolactone), Eudragit S100[®] or Eudragit RS100[®] as polymers. The associated drug with nanocarriers, the total drug contents and the size of the particles were stable up to 30 days for all melatonin loaded-nanocapsule suspensions. After 60 days, a significant decrease in total content of melatonin in nanocapsule suspensions (Eudragit RS100[®] and Eudragit S100[®]) occurred, except for the poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules. The melatonin-loaded nanoemulsion and nanodispersion presented significant decreases of the drug content already after 1 month, when stored at light and at temperature of the 50 °C. The degradation of melatonin was slightly accelerated by the natural light and the temperature. The presence of the polymers (nanocapsules) increased the associated melatonin concentrations with the nanocarriers and the chemical stability of melatonin during the storage, as well as for maintaining the balance between free and associated melatonin concentrations similar to those obtained after preparation.

3. Experimental

3.1. Materials

Melatonin was obtained from Acros Organics (Belgium). Poly(ϵ -caprolactone) (MW= 65,000 g/mol) was supplied by Aldrich (Strasbourg, France). Eudragit S100[®] and Eudragit RS100[®] were obtained from Almapal (São Paulo, Brazil). Caprylic/capric triglyceride was obtained from Brasquim (Porto Alegre, Brazil) and sorbitan monooleate was supplied by Sigma (St. Louis, USA). Polysorbate 80 (Tween 80[®]) was acquired from Delaware (Porto Alegre, Brazil). All other chemicals and solvents used were of pharmaceutical grade. All reagents were used as received.

3.2. Preparation of the nanocapsule suspensions, nanoemulsion and nanodispersion

Nanocapsules containing melatonin (1.5 mg/mL) were prepared by interfacial deposition of preformed polymers, as described by Fessi et al. (1989). Briefly, the lipophilic solution consisted of 0.8 mL of oil (caprylic/capric triglyceride), 250 mg of polymer [poly(ϵ -caprolactone), Eudragit S100[®] or Eudragit RS100[®]], 37.5 mg of melatonin, 192 mg of Span 80[®] (surfactant) and 67 mL of acetone. This organic phase was added under magnetic stirring into an aqueous solution (133 mL) containing 192 mg of surfactant (Tween 80[®]). The acetone was removed and the water concentrated by evaporation under reduced pressure and the final volume of suspension was adjusted to 25 mL. The formulations were prepared in triplicate. The nanoemulsion and the nanodispersion (1.5 mg/mL) were prepared as described above omitting the polymer for the former and omitting both the polymer and the oil for the latter.

3.3. Determination of particle sizes and pH

The particle sizes were measured as previously described (Pohlmann et al., 2002), by photon correlation spectroscopy (PCS). For PCS measurements, 20 μ L of each formulation were diluted to 10 mL with water (MilliQ[®]). Measurements were made at room temperature (20 °C) using a Brookhaven Instruments standard setup (BI-200M goniometer, BI-9000AT

digital correlator and a BI9863 detection system). A Spectra Physics He-Ne laser (model 127, $\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$) was used as light source. The scattered light was observed at a fixed angle of 90° .

The pH values of formulations were determined using potentiometer B474 (Micronal, Brazil), after calibration with both 4.0 and 7.0 standard pH solution.

3.4. Determination of drug content

Melatonin was assayed by liquid chromatography (HPLC: Waters, USA; pump 600 controller; 2487 Dual λ absorbance detector; 717 plus autosampler), using a Merck column LiChrospher[®] RP-18 ($5\mu\text{m}$; $250 \times 4 \text{ mm}$, Germany). The mobile phase consisted of acetonitrile/water (55:45 v/v). The total sample volume injected was $20 \mu\text{L}$ and melatonin was detected at 229 nm . Free melatonin (non-associated) was determined in the ultrafiltrate after separation of the nanocarriers by ultrafiltration-centrifugation technique (Ultrafree-MC[®] 10,000 MW, Millipore), at $12,000 \text{ rpm}$ for 10 min . Total content of melatonin was determined using HPLC after dissolution of the components by acetonitrile. The associated melatonin with the nanocarriers was calculated from the difference between the total and free drug concentrations determined in the formulations and in the ultrafiltrates, respectively. The analytical method was validated (linearity: $R^2 = 0.9998$ for 2.5 to $17.5 \mu\text{g/mL}$; accuracy= $101 \pm 1 \%$; precision: relative standard deviation= 1.4% - 1.8% for repeatability and relative standard deviation= 3.1% for intermediate precision).

3.5. Stability study

The melatonin-loaded formulations (1.5 mg/mL : nanocapsule suspensions, nanoemulsion or nanodispersion) were stored up to 90 days under different experimental conditions: a) at room temperature protected from the natural light; b) at room temperature exposed to natural light; and c) at $50 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ protected from the natural light. The experiments were carried out in triplicate. Samples were withdrawn at predetermined time intervals (0 , 30 , 60 and 90 days)

and analyzed in order to determine the particle sizes, pH, drug content and associated melatonin with the nanocarriers.

3.6. Statistical analyses

The statistical analyses of the data was carried out by the Student's *t*-test and significance was taken as $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We acknowledged the financial support from CNPq, FAPERGS, CAPES, Rede Nanobiotec-CNPq/MCT-Brazil. We thank Dr. Nadya P. da Silveira and MSc. Graziela Mezzalira for PCS measurements.

REFERENCES

- Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H (2006) A pilot study of freeze-drying of poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. *Int J Pharm* 309: 178-188.
- Allémann E, Leroux J-C, Gurny R (1998) Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Adv Drug Deliv Rev* 34: 171-189.
- Andrisano V, Bertucci C, Battaglia A, Cavrine (2000) Photostability of drugs: photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. *J Pharm Biomed Anal* 23: 15-23.
- Barrenetxe J, Delagrange P, Martínez JA (2004) Physiological and metabolic functions of melatonin. *J Physiol Biochem* 60: 61-72.
- Bénès L, Claustrat B, Horrière F, Geoffriau M, Konsil J, Parrott KA, DeGrande G, McQuinn RL, Ayres JW (1997) Transmucosal, oral controlled-release, and transdermal drug administration in human subjects: A crossover study with melatonin. *J Pharm Sci* 86: 1115-1119.
- Calvo P, Vila-Jato JL, Alonso MJ (1996) Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J Pharm Sci* 85(5): 530-536.
- Cavallo A, Hassan M (1995) Stability of melatonin in aqueous solution. *J Pineal Res* 18: 90-92.
- Couvreur P, Barrat G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C (2002) Nanocapsule technology: A review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 19: 99-134.
- Cuzzocrea S, Reiter RJ (2001) Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/ reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 426: 1-10.

Daya S, Walker RB, Glass BD, Anoopkumar-Dukie S (2001) The effect of variations in pH and temperature on stability of melatonin in aqueous solution. *J Pineal Res* 31: 155-158.

El-Gibaly I (2002) Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. *Int J Pharm* 249: 7-21.

El-Gibaly I., Meki AMA, Abdel-Ghaffar SK (2003) Novel B melatonin-loaded chitosan microcapsules: in vitro characterization and antiapoptosis efficacy for aflatoxin B1-induced apoptosis in rat liver. *Int J Pharm* 260: 5-22.

Esquifino AI, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP (2004) Circadian organization of the immune response: A role for melatonin. *Clin Applied Immunol Rev* 4: 423-433.

Epstein FH (1997) Mechanisms of disease-melatonin in humans. *New Engl J Med* 336: 186-195.

Ferranti V, Marchais H, Chabenat C, Orecchioni AM, Lafont O (1999) Primidone-loaded poly- ϵ -caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles. *Int J Pharm* 193: 107-111.

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JPh, Ammory N, Benita S (1989) Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 55: r1-r4.

Gupta M, Aneja S, Kohli K (2004) Add-on melatonin improves quality of life in epileptic children on valproate monotherapy: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Epilepsy Behav* 5: 316-321.

Guterres SS, Fessi H, Barratt G, Puisieux F, Devissaguet J-P (1995a) Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-Steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharm Res* 12(10): 1-3.

Guterres SS, Fessi H, Barratt G, Devissaguet J-P, Puisieux P (1995b) Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *Int J Pharm* 113: 57-63.

Guterres SS, Muller CR, Michalowski CB, Pohlmann AR, Dalla Costa T (2001) Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *STP Pharma Sci* 11: 229-233.

Kandimalla KK, Kanikkannan N, Singh M (1999) Optimization of a vehicle mixture for the transdermal delivery of melatonin using artificial neural networks and response surface method. *J Control Release* 61: 71-82.

Kirby AW, Clayton M, Rivera P, Comperatore C.A (1999) Melatonin and the reduction or alleviation of stress. *J Pineal Res* 27: 78-85.

Kumar A, Agarwal SP, Khanna R (2003) Modified release bi-layered tablet of melatonin using β -cyclodextrin. *Pharmazie* 58 (9): 642-644.

Lacoulonche F, Gamisans F, Chauvet A, Garcia ML, Espina M, Egea MA (1999) Stability and in vitro drug release of flurbiprofen-loaded poly- ϵ -caprolactone nanospheres. *Drug Dev Ind Pharm* 25: 983-993.

Lee B-J, Parrot KA, Ayres JW, Sack RL (1995) Design and evaluation of an oral controlled release delivery system form melatonin in human subjects. *Int J Pharm* 124: 119-127.

Lee B-J, Mim G-H (1996a) Oral controlled release of melatonin using polymer-reinforced and coated alginate beads. *Int J Pharm* 144: 37-46.

Lee B-J, Parrot KA, Ayres JW, Sack RL (1996b) Development and characterization of an oral controlled-release delivery system for melatonin. *Drug Dev Ind Pharm* 22: 269-274.

Lee B-J, Choe JS, Kim C-K (1998) Preparation and characterization of melatonin-loaded stearyl alcohol microspheres. *J Microencapsul* 15: 775-787.

Lee B-J, Ryu S-G, Cui J-H (1999) Formulation and release characteristics of hydroxypropyl methylcellulose matrix tablet containing melatonin. *Drug Dev Ind Pharm* 25: 493-501.

Legrand P, Barrat G, Mosqueira V, Fessi H (1999) Devissaguet J.P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. *STP Pharma Sci* 9: 411-418.

Losa C, Marchal-Heussler L, Orallo F, Vila Jato, JL, Alonso MJ (1993) Design of new formulations for topical ocular administration: Polymeric nanocapsules containing metipranolol. *Pharm Res* 10: 80-87.

Maharaj DS, Anoopkumar-Dukie S, Glass BD, Antunes EM, Lack B, Walker RB, Daya S (2002) The identification of the UV degradants of melatonin and their ability to scavenge free radicals. *J Pineal Res* 32: 257-261.

Mao S, Chen J, Wei Z, Liu H, Bi D (2004) Intranasal administration of melatonin starch microspheres. *Int J Pharm* 272: 37-43.

Matsubara E, Shoji M, Murakami T, Kawarabayashi T, Abe K (2003) Alzheimer's disease and melatonin. *Int Congr Ser*, 1252: 395-398.

Molpeceres J, Aberturas MR, Chacón M, Berges L. Guzmán, M (1997) Stability of cyclosporine-loaded poly- ϵ -caprolactone nanoparticles. *J Microencapsul* 14: 777-787.

Müller CR, Schaffazick S.R, Pohlmann AR, Freitas LL, Silveira P, Costa TD, Guterres SS (2001) Spray-dried diclofenac-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie* 56(11): 864-867.

Nishida S, Segawa T, Murai I, Nakagawa S (2002) Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Δ -5 desaturase activity. *J Pineal Res* 32: 26-33.

Palumbo M, Russo A, Cardile V, Renis M, Paolino D, Puglisi G, Fresta M (2002) Improved antioxidant effect of idobenone-loaded polyethyl-2-cyanacrylate nanocapsules tested on human fibroblasts. *Pharm Res* 19: 71-78.

Pohlmann AR, Weiss V, Mertins O, Pesce da Silveira N, Guterres SS (2002) Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *Eur J Pharm Sci* 16: 305-312.

Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Muñoz-Hoyos A (1997) Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 60: 2255-2271.

Reiter RJ (2003) Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endoc Metab* 17: 273-285.

Schaffazick SR, Guterres SS, Lucca-Freitas L, Pohlmann AR (2003a) Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova* 26: 726-737.

Schaffazick SR, Pohlmann AR, Dalla-Costa T, Guterres SS (2003b) Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *Eur J Pharm Biopharm* 56: 501-505.

Schaffazick SR, Pohlmann AR, de Cordova CAS, Creczynski-Pasa TB, Guterres SS (2005) Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. *Int J Pharm* 289: 209-213.

Schaffazick SR, Pohlmann AR, Mezzalana G, Guterres SS. (2006) Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. *J Braz Chem Soc* 17(3): 562-569.

Siegrist C, benedetti C, Orlando A, Beltrán JM, Tuchscher L, Noseda MJ, Brusco LI, Cardinali DC (2001) Lack of changes in serum prolactin, FSH, TSH, and estradiol after melatonin treatment in doses that improve sleep and reduce benzodiazepine consumption in sleep-disturbed, middle-aged, and elderly patients. *J Pineal Res* 30: 34-42.

Teixeira M, Alonso MJ, Pinto MMM, Barbosa CM (2005) Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur J Pharm Biopharm* 59: 491-500.

Tursilli R, Casolari A, Iannuccelli V, Scalia S (2006) Enhancement of melatonin photostability by encapsulation in lipospheres. *J Pharm Biomed Anal* 40: 910-914.

Vijayalaxmi, Reiter RJ, Tan D-X, Herman TS, Thomas CR (2004) Melatonin as a radioprotective agent: a review. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys* 59: 639-653.

Table 1– Physicochemical characteristics of the nanocapsule suspensions, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin, after preparation (n=3).

Formulations	Total content of melatonin (mg/mL)	Associated melatonin (%)	Size (nm)	pH
Eudragit S100 [®] -nanocapsules	1.51 ± 0.05	50 ± 2	229 ± 56	4.4 ± 0.5
Eudragit RS100 [®] -nanocapsules	1.48 ± 0.01	43 ± 2	135 ± 38	5.0 ± 0.1
Poly(ε-caprolactone)-nanocapsules	1.47 ± 0.05	38 ± 1	245 ± 56	6.0 ± 0.0
Nanoemulsion	1.58 ± 0.02	33 ± 2	325 ± 18	5.9 ± 0.3
Nanodispersion	1.56 ± 0.05	29 ± 2	134 ± 3	5.5 ± 0.3

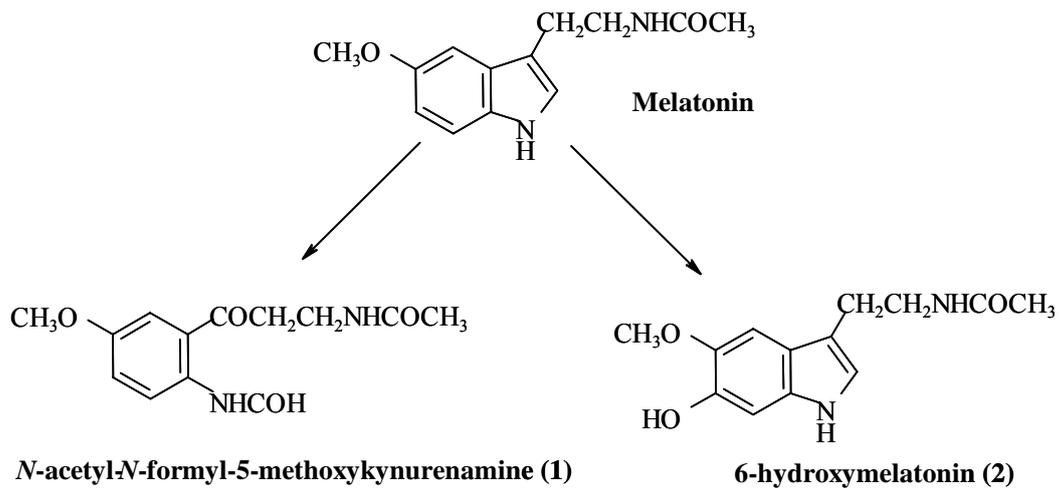


Figure 1. Degradation pathway of melatonin proposed by Maharaj and co-workers (2002).

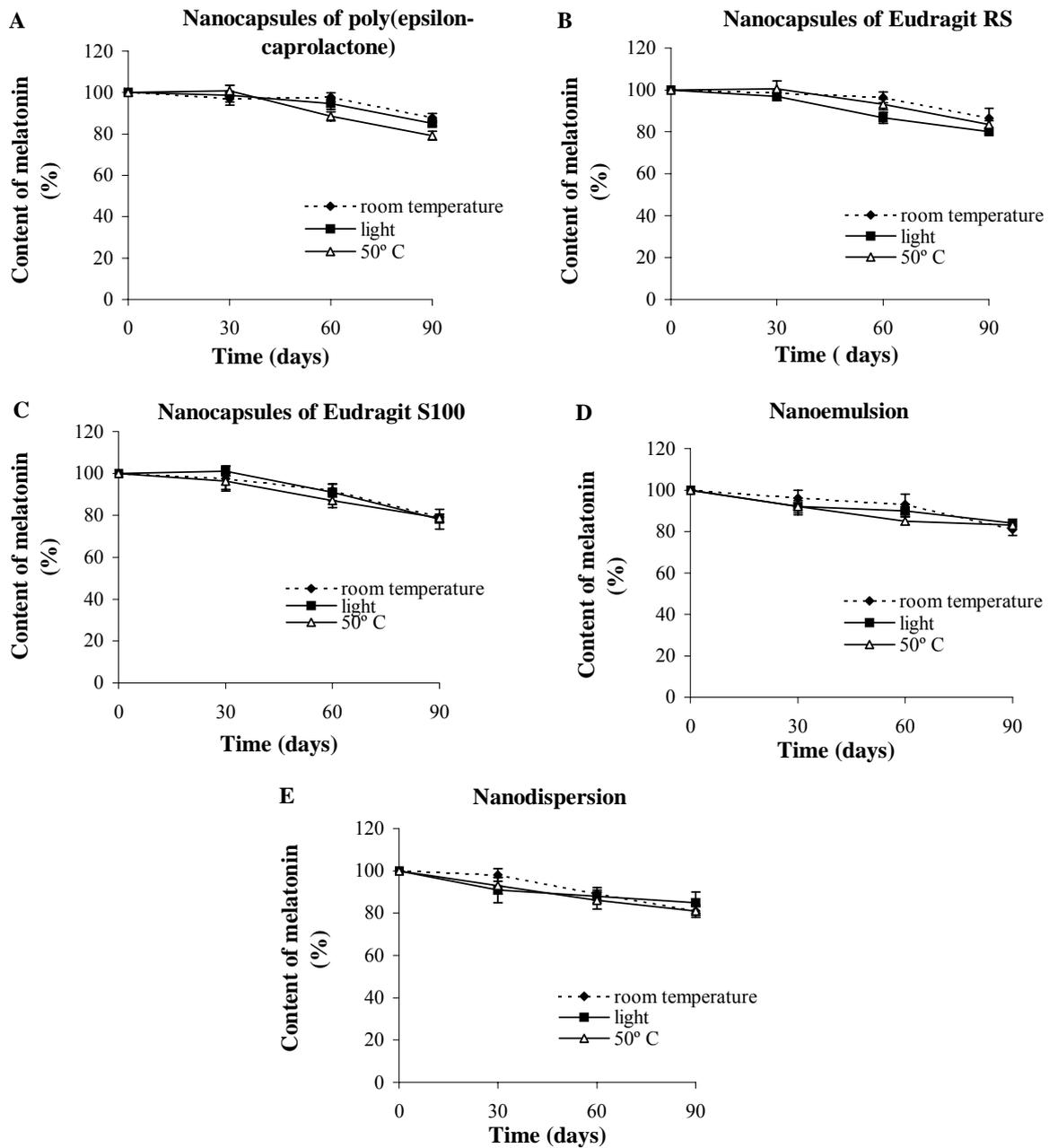


Figure 2. Content of melatonin associated with nanocarrier systems stored at room temperature, at natural light and at 50°C.

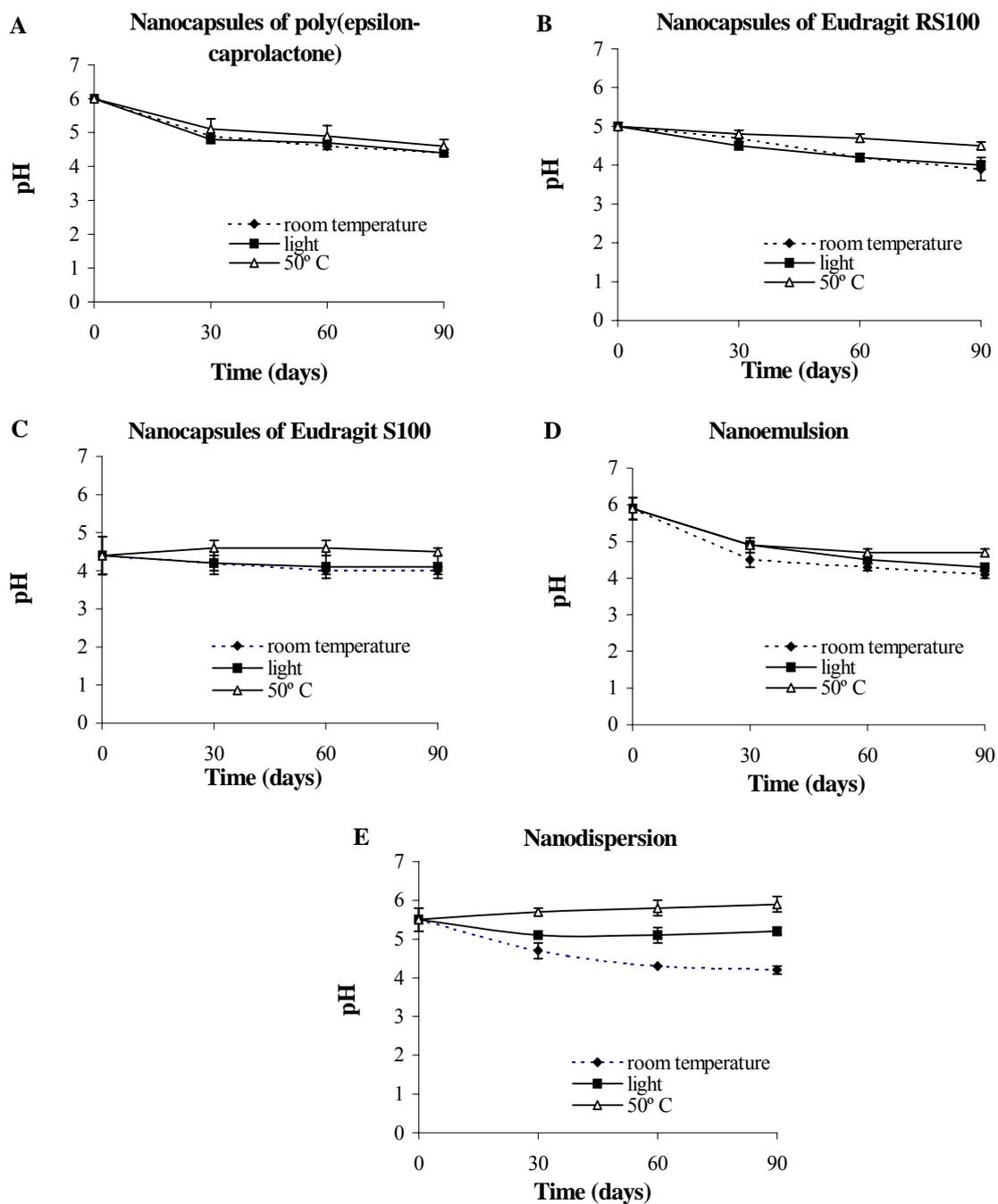


Figure 3. pH of the nanocarrier systems containing melatonin in function of time.

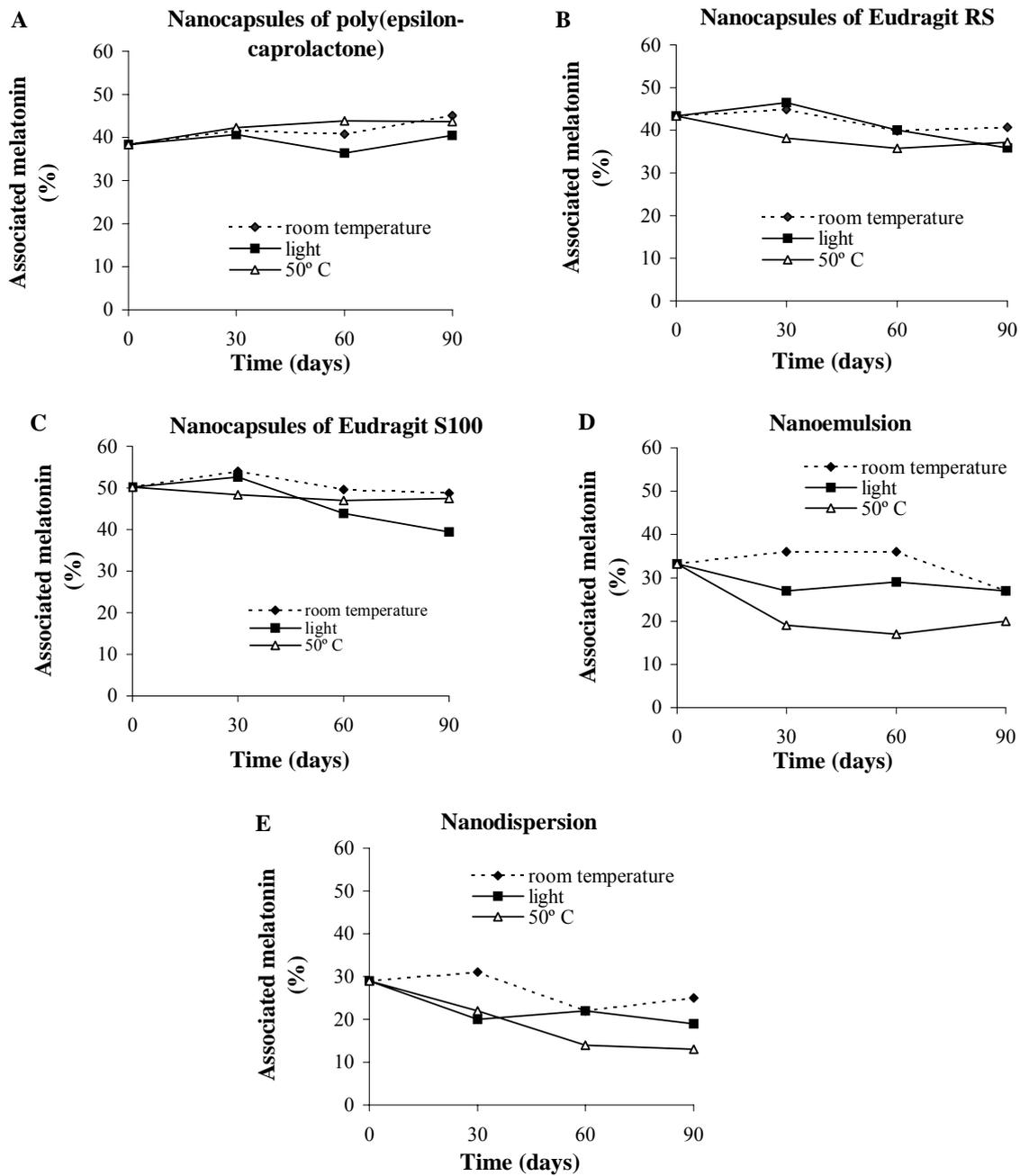


Figure 4. Associated melatonin with the nanocarrier systems in function of the time.

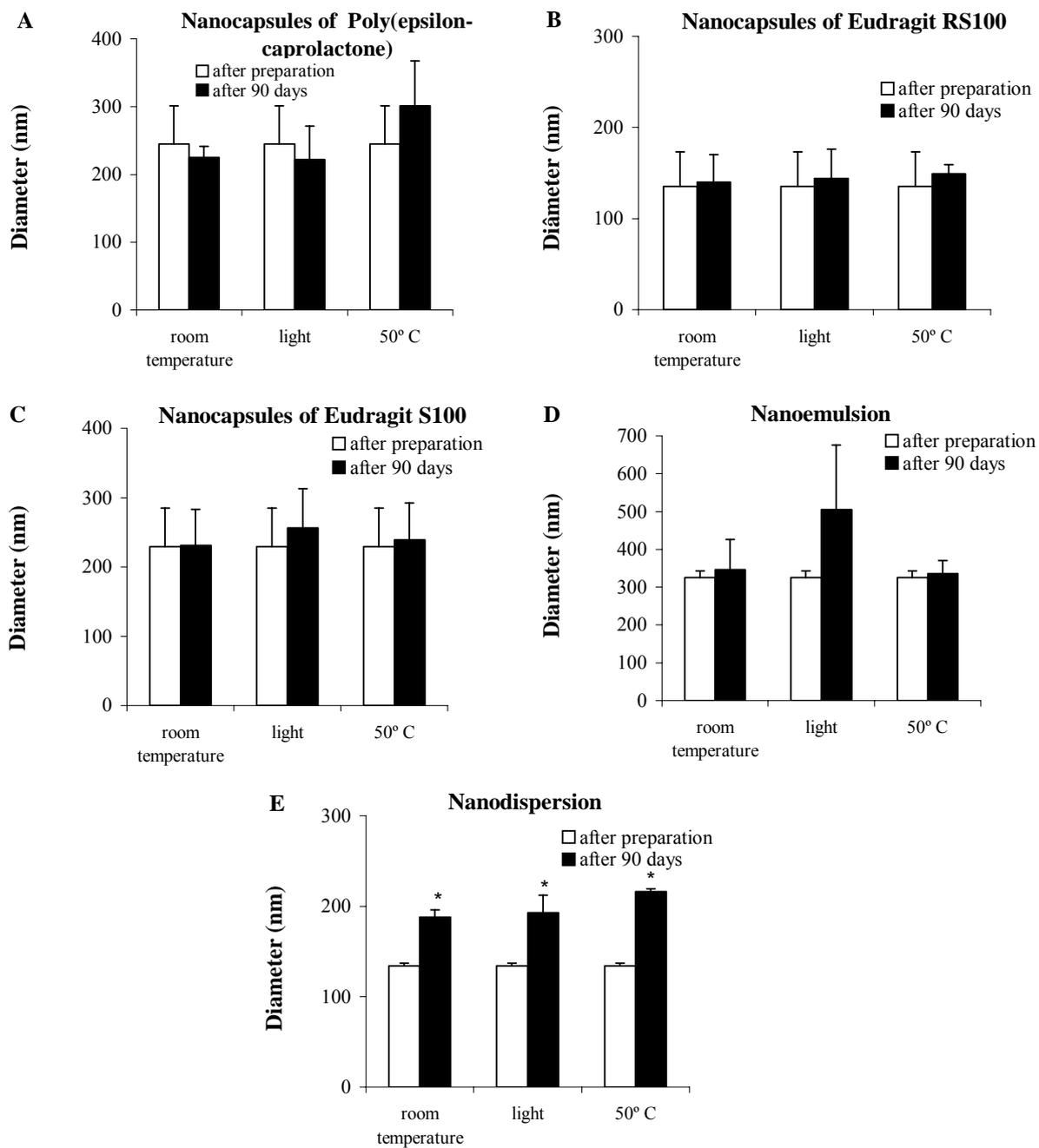


Figure 5. Diameters of the nanocarrier systems containing melatonin, after preparation and after 90 days.

CAPÍTULO 4: Avaliação dos métodos de deposição interfacial e de emulsificação-difusão na preparação de nanocápsulas contendo melatonina

4.1 Introdução

Nesta etapa do trabalho, objetivou-se comparar as características físico-químicas de suspensões de nanocápsulas contendo melatonina (1,5 mg/mL), preparadas através do método clássico de deposição interfacial ou da técnica de emulsificação-difusão, ambos baseados em polímeros pré-formados, variando-se também a composição das formulações. Torna-se interessante a comparação destes métodos pois apresentam mecanismos de formação das partículas distintos (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998b), o que pode resultar em sistemas com diferentes características físico-químicas.

Para este fim, realizou-se um delineamento fatorial 2^3 , sendo o método de preparação, o tipo de óleo e a associação de tipos de tensoativos os fatores avaliados, em dois níveis qualitativos diferentes. As taxas de associação, os valores de pH, as análises morfológicas, os potenciais zeta, os diâmetros médios de partículas e as polidispersões foram os parâmetros analisados. A estabilidade físico-química destes sistemas também foi estudada, durante dois meses à temperatura ambiente e com proteção da luz.

O Eudragit S100[®] não pôde ser testado por esta técnica pois é insolúvel em acetato de etila, solvente que vem sendo utilizado, por este grupo de pesquisa, no método de emulsificação-difusão.

O Eudragit RS[®] foi o polímero selecionado para o estudo uma vez que com a sua utilização foi possível a preparação de suspensões de nanocápsulas homogêneas através dos dois métodos, utilizando as mesmas quantidades dos componentes. Além disto, este polímero é interessante pois, em função de sua carga positiva, pode ser capaz de aumentar a interação entre o nanocarreador e o muco negativamente carregado do trato gastrointestinal, o que em tese poderia resultar em aumento de biodisponibilidade (Ubrich *et al.*, 2005), visando, então, a aplicações futuras das nanocápsulas contendo melatonina.

PUBLICAÇÃO 4: Caracterização e estudo de estabilidade físico-química de nanocápsulas contendo melatonina, preparadas através dos métodos de deposição interfacial e de emulsificação-difusão

Artigo submetido a periódico científico

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE
NANOCÁPSULAS CONTENDO MELATONINA PREPARADAS ATRAVÉS DOS
MÉTODOS DE DEPOSIÇÃO INTERFACIAL E DE EMULSIFICAÇÃO-DIFUSÃO**

Scheila R. Schaffazick, Alessandra Badejo, Lali R. Zancan, Sílvia S. Guterres*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre-
RS, Brazil. Telephone: 55 51 33165500, Fax: 55 51 33165437 (*e-mail:
nanoc@farmacia.ufrgs.br)

Adriana R. Pohlmann

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, CP 15003, 91501-970, Porto Alegre-RS, Brazil.

CHARACTERIZATION AND PHYSICOCHEMICAL STABILITY STUDY OF MELATONIN-LOADED NANOCAPSULES PREPARED BY INTERFACIAL DEPOSITION OR EMULSIFICATION-DIFFUSION METHODS

Abstract

The aim of this work was to compare melatonin-loaded Eudragit RS100[®]-nanocapsule suspensions prepared by interfacial deposition or emulsification-diffusion techniques in a 2³ factorial-design. The type of oil core and the kind of surfactants were also varied. For comparison, formulations without drug were also prepared. The particles were evaluated in terms of total content and associated melatonin, mean size and polydispersion, zeta potential, pH, morphological analysis and physicochemical stability. The method of preparation and/or the formulation compositions influenced mean size, polydispersion, pH and zeta potential of the nanocapsules. The physicochemical stability of nanocapsule suspensions was affected by the type of surfactant and by the presence of melatonin.

Keywords: melatonin; nanocapsules; preformed polymers;

INTRODUÇÃO

A melatonina é um hormônio lipofílico produzido principalmente pela glândula pineal, durante à noite¹. Apresenta várias funções como a regulação biológica do ritmo circadiano, do sono, do humor, da reprodução e da resposta imune. Melatonina exógena tem sido usada para o tratamento de distúrbios do ritmo circadiano, como jet-lag e insônia, e, recentemente, foi demonstrada sua potente atividade antioxidante, atuando como seqüestradora de radicais livres, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes e a capacidade de defesa do organismo, reduzindo a lipoperoxidação². Paralelamente, diversos efeitos farmacológicos da melatonina têm sido relatados e incluem o seu uso em distúrbios do sono³, na diminuição do estresse⁴, em danos produzidos por isquemia/reperfusão⁵, em câncer⁶, na neuroproteção⁷, dentre outros.

Por outro lado, a melatonina possui meia-vida biológica curta, baixa e variada biodisponibilidade, provavelmente devido ao metabolismo de primeira passagem e/ou absorção variada, quando oralmente administrada⁸. Em função disto, não é adequada para ser administrada em formulações convencionais de liberação imediata. Desta forma, sistemas de liberação controlada contendo melatonina têm sido desenvolvidos⁹ para a sua administração oral, transdérmica, transmucosa ou nasal.

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que possuem diâmetro inferior a 1 μm , dentre os quais incluem-se as nanocápsulas, que são sistemas vesiculares, formados por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, geralmente oleoso, estabilizado por tensoativos ou agentes estabilizantes na interface partícula/água¹⁰. Associações de tensoativos (alta e baixa hidrofília) iônicos ou não-iônicos são utilizadas para maior redução e controle do tamanho das partículas e aumento da estabilidade destes sistemas¹¹. O fármaco pode estar dissolvido no núcleo oleoso e/ou adsorvido ao polímero¹². Estes sistemas têm sido pesquisados para a vetorização de fármacos, aumentando o índice

terapêutico¹³, para liberação controlada de fármacos^{13,14}, para proteção de fármacos lábeis no trato gastrintestinal e aumento da biodisponibilidade¹⁵, na veiculação de substâncias pouco solúveis^{10,16}, na proteção da mucosa gastrintestinal de fármacos agressores¹⁷ e na possibilidade de seu uso como material de revestimento de sistemas particulados¹⁸.

Existem diversos métodos descritos para a preparação de nanocápsulas que podem ser classificados, de uma forma geral, em métodos baseados na polimerização de monômeros dispersos e em métodos que empregam polímeros pré-formados^{12,13}. A preparação de nanocápsulas através de polímeros pré-formados evita algumas desvantagens dos processos de polimerização interfacial, tais como a falta de controle da massa molecular e da polidispersão do polímero obtido, presença de monômeros tóxicos residuais e reações cruzadas com o fármaco ou, ainda, a possibilidade de inativação do último^{13,19}. Dentre os métodos que utilizam polímeros sintéticos pré-formados destacam-se o método clássico de deposição interfacial (adaptado do método de nanoprecipitação), descrito por Fessi e colaboradores²⁰, e, mais recentemente, o método de emulsificação-difusão descrito por Leroux e colaboradores²¹, o qual foi patenteado e estudado por Quintanar-Guerrero e colaboradores^{19,22}. O primeiro é baseado no uso de solventes miscíveis com a água (por exemplo: acetona ou etanol) e o último emprega solventes parcialmente miscíveis com a água (por exemplo: álcool benzílico, acetato de etila ou carbonato de propileno)¹⁹. Estes dois métodos têm sido considerados simples, reprodutíveis e passíveis de transposição de escala, visando à aplicabilidade industrial dos sistemas nanoparticulados^{13,23,24}.

O interesse pelo método de emulsificação-difusão tem crescido em função das vantagens que pode proporcionar, como usar solventes aceitáveis do ponto de vista farmacêutico, ser um método versátil e eficiente, possibilitar o controle do tamanho das partículas obtidas e da espessura da parede polimérica, através do aumento da concentração do polímero^{10,19}. Entretanto, apresenta algumas desvantagens como os altos volumes de água a serem

eliminados da suspensão, maior tempo de preparação e a possibilidade de perda de fármacos solúveis em água para a fase externa, durante a emulsificação^{10,19,24}.

Até o momento, existem poucos relatos científicos referentes à comparação sistemática entre as características físico-químicas das partículas obtidas através dos métodos de nanoprecipitação e de emulsificação-difusão^{24,25}, principalmente utilizando estritamente as mesmas composições quali-quantitativas das formulações. A comparação entre métodos de preparação é importante pois, dependendo do princípio de formação das partículas, dos componentes e das condições empregadas na preparação, pode-se obter sistemas com características físico-químicas diferenciadas, de forma que o sistema polimérico nanoestruturado possa ser melhor planejado de acordo com o efeito e o local de ação desejado para o fármaco associado.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa associou a melatonina a nanopartículas poliméricas, preparadas com polímeros pré-formados^{26,27}, demonstrando que estes sistemas foram capazes de aumentar a atividade antioxidante da melatonina em comparação à sua solução, em modelos de peroxidação lipídica de lipossomas de fosfatidilcolina e de microssomas hepáticos²⁶. Tendo em vista esta vantagem, obtida mediante o emprego destes sistemas, torna-se interessante o desenvolvimento e a caracterização de novos sistemas poliméricos nanoestruturados contendo melatonina, visando futuras aplicações biológicas.

O polímero selecionado para este estudo foi o Eudragit RS100[®] uma vez que é policatiônico, propriedade que pode ser vantajosa para a administração oral de sistemas carreadores de fármacos, devido à possibilidade de aumento da interação destas partículas com o muco negativamente carregado do trato gastrointestinal, resultando em aumento da biodisponibilidade do fármaco associado²⁸. Desta forma, o presente trabalho visa comparar as características físico-químicas de suspensões de nanocápsulas de Eudragit RS100[®] contendo melatonina, obtidas através dos métodos de deposição interfacial e de emulsificação-difusão,

utilizando diferentes matérias-primas, objetivando a determinação dos fatores que influenciam a obtenção de sistemas de forma controlada, propiciando a seleção do método e da composição para o “design” de novas formulações. Para este fim, foi realizado um delineamento fatorial 2^3 para verificar a influência dos diferentes fatores (método, tipo de óleo e de tensoativos) e da interação entre os mesmos em relação aos teores totais e as taxas de associação da melatonina, os diâmetros médios de partículas e as polidispersões, os valores de potencial zeta e de pH. A estabilidade físico-química das suspensões também foi avaliada, durante 60 dias.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Melatonina, Eudragit RS 100[®] [poli(acrilato de etila-co-metacrilato de metila-co-cloreto de metacrilato de trimetilamonioetila) 1:2:0,1] e os triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico foram obtidos da Acros Organics (Bélgica), da Röhm GmbH (Germany) e da Brasquim (Porto Alegre, Brazil), respectivamente. Polissorbato 80 (Tween 80[®]) e 2-octildodecanol (Eutanol G[®]) foram adquiridos da Delaware (Porto Alegre, Brazil), e Epikuron 170[®] (lecitina, com cerca de 70 % de fosfatidilcolina) da Lucas Meyer (Hamburgo, Alemanha). Monooleato de sorbitano (Span 80[®]) e poloxamer 188 (Pluronic F68[®]) foram obtidos da Sigma (St. Louis, USA). Todas as matérias-primas e os solventes utilizados apresentaram grau farmacêutico e foram empregados como recebidos.

Preparação das suspensões de nanocápsulas através de deposição interfacial de polímero pré-formado

Conforme o método²⁰, 250 mg de polímero (Eudragit RS100[®]), 192 mg de tensoativo (Span 80[®] ou Epikuron 170[®]), 0,8 mL de óleo (triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico ou Eutanol G[®]) e 37,5 mg de melatonina em 67 mL de acetona (fase orgânica), foram mantidos sob agitação até a dissolução total dos componentes. Em seguida, a fase orgânica foi adicionada lentamente sobre a fase aquosa (133 mL), contendo 192 mg de tensoativo (Tween 80[®] ou Pluronic F68[®]), sendo a mistura mantida sob agitação moderada, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após, procedeu-se à evaporação sob pressão reduzida até o volume final de 25 mL (1,5 mg/mL de melatonina). As suspensões contendo melatonina foram preparadas em triplicata (n=3). Para comparação, suspensões sem fármaco foram preparadas da mesma forma como acima descrito (n=1).

Preparação das suspensões de nanocápsulas através de emulsificação-difusão

De acordo com o método¹⁹, acetato de etila e água destilada foram mutuamente saturados previamente. O Eudragit RS100[®] (250 mg), 0,8 mL de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico ou de Eutanol G[®], a melatonina (37,5 mg) e 192 mg de Span 80[®] ou de Epikuron 170[®] foram dissolvidos em 25 mL de acetato de etila saturado com água (fase interna). Após, esta solução foi emulsificada em uma fase aquosa externa saturada com acetato de etila (100 mL), contendo 192 mg de Tween 80[®] ou de Pluronic F68[®], à velocidade de agitação de 11.000 rpm por 5 minutos (Ultra-Turrax T 25[®], IKA Labortechnik). Na etapa seguinte, cerca de 250 mL de água destilada foram adicionados à emulsão sob agitação a 240-288 rpm (RW 20.n, IKA Labortechnik). Após 40 minutos, procedeu-se a evaporação sob pressão reduzida até o volume final de 25 mL (1,5 mg/mL de melatonina). As suspensões contendo melatonina foram preparadas em triplicata (n=3). Formulações sem fármaco também foram preparadas da mesma forma como descrito acima (n=1).

Determinação das concentrações totais e associadas de melatonina

A concentração de melatonina associada às nanocápsulas (taxa de associação) foi determinada através da diferença entre as concentrações total e livre do fármaco presentes nas formulações. A concentração total de melatonina foi determinada após a dissolução das nanoestruturas em acetonitrila. Por sua vez, a concentração de fármaco livre no sistema (não associado) foi determinada no ultrafiltrado, após a ultrafiltração-centrifugação das suspensões (Ultrafree[®] - GMPC 10.000 NMWL Filter Unit – Millipore; 12000 rpm/10 min). O método de doseamento foi baseado em cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, USA; pump 600 controller; 2487 Dual λ absorbance detector; 717 plus autosampler), utilizando coluna de fase reversa C₁₈ (Merck column LiChrospher[®] RP-18, 5 μ m, 250 x 4 mm, Germany) e detecção a 229 nm. A fase móvel empregada consistiu de acetonitrila/água na proporção de 55:45 (v/v), o fluxo de 0,7 mL/min e o volume de injeção de 20 μ L²⁷. Este método analítico foi validado

apresentando-se linear ($R^2 = 0,9998$ para concentrações de 2,5 a 17,5 $\mu\text{g/mL}$), exato (101 ± 1 %) e preciso (repetibilidade: desvio padrão relativo= 1,4 % - 1,8 %; precisão intermediária: desvio padrão relativo= 3,1 %).

Determinação dos diâmetros e dos potenciais zeta

Os diâmetros médios, as polidispersões (PI) e os potenciais zeta das partículas em suspensão, foram determinados através do equipamento Zetasizer[®] Nano Series (modelo ZEN 3600; Malvern Instruments), após adequada diluição das amostras com água MilliQ[®] (diâmetro e polidispersão) ou com solução aquosa de NaCl 1 mM (potencial zeta).

Análises morfológicas

As análises morfológicas das suspensões de nanocápsulas contendo melatonina foram realizadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), empregando 80 kV (Jeol, JEM 1200 ExII; Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS). Para esta análise, as suspensões diluídas foram depositadas em suportes de cobre (400 mesh), contendo filme de Formvar-Carbono (Electron Microscopy Sciences), e, em seguida, negativamente contrastadas com solução de acetato de uranila a 2 % (m/v)²⁷.

Desenho experimental do tipo fatorial

Foi empregado um delineamento experimental do tipo fatorial 2^3 para a comparação das diferentes formulações contendo melatonina, apresentando 3 variáveis independentes (3 fatores) com 2 níveis cada, os quais variaram qualitativamente (Tabela 1). Os efeitos dos parâmetros foram avaliados sobre as variáveis respostas: teor total de melatonina, taxa de associação, diâmetro de partículas, polidispersão, potencial zeta e valor de pH.

➤ Inserir Tabela 1.

Estudo de Estabilidade

As formulações foram armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz durante 60 dias. Foram caracterizadas após a preparação, após 30 e 60 dias, quanto às taxas de associação, teores totais de melatonina, valores de pH e de potencial zeta, diâmetros médios de partículas e largura de distribuição de tamanhos (polidispersão). Os valores de pH, de diâmetros médios de partículas, de polidispersão e de potenciais zeta das formulações preparadas sem fármaco também foram avaliados, em função do tempo de armazenamento.

Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi empregada para a comparação entre as várias formulações e o teste-*t* foi empregado, quando necessário, para a análise estatística entre conjuntos de dados dois a dois, utilizando o programa Microsoft Excel (versão 2000). A análise fatorial foi realizada através do programa Stat Graphics (versão 5.1). Todas as análises foram realizadas considerando-se o nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização das suspensões após a preparação

Foram preparadas suspensões de nanocápsulas de Eudragit RS100[®] contendo melatonina, variando-se o tipo de óleo, de tensoativos e de método de preparação, através de um estudo fatorial 2³. Para uma comparação fidedigna das características físico-química entre as partículas obtidas através dos diferentes métodos, os componentes das formulações (Figura 1) foram empregados nas mesmas proporções. A Tabela 2 apresenta a caracterização das diferentes suspensões de nanocápsulas, contendo ou não melatonina, demonstrando que todas as suspensões apresentaram diâmetros nanométricos, valores de pH ácidos e potenciais zeta positivos (Figura 2), características que serão discutidas a seguir.

➤ Inserir Figura 1

Teores totais de melatonina e taxas de associação

Tanto as formulações preparadas através de deposição interfacial quanto aquelas obtidas por emulsificação-difusão apresentaram teores totais de fármaco concordantes com a concentração teórica total de melatonina (1,5 mg/mL), adicionada à fase orgânica da preparação, independentemente da composição empregada (Tabela 2), não sendo encontradas diferenças significativas em relação a este parâmetro. Quanto às taxas de associação, também não foram verificadas diferenças significativas, levando-se em conta os diferentes fatores, método de preparação ou composição das formulações. As taxas de associação da melatonina às nanocápsulas permaneceram entre $42 \pm 1 \%$ e $47 \pm 4 \%$ (Tabela 2) e refletem a partição do fármaco entre as partículas de Eudragit RS100[®] e a fase aquosa contínua.

➤ Inserir Tabela 2

➤ Inserir Figura 2

Diâmetros médios de partículas

Todas as suspensões apresentaram diâmetros médios entre 123 e 306 nm, condizentes com aqueles normalmente descritos para nanocápsulas, que encontram-se entre 100 e 500 nm^{10,12}. A análise fatorial das formulações preparadas com melatonina demonstrou que o fator método de preparação ($p < 0,0001$) e a interação dos fatores método e tensoativos ($p = 0,0062$) influenciaram significativamente o diâmetro médio de partículas. Desta forma, o método de emulsificação-difusão (213 nm a 306 nm) e a sua combinação com os tensoativos Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®] causaram efeito positivo sobre o diâmetro médio das partículas (Figura 2A) em comparação ao método de deposição interfacial (124 nm a 151 nm) e aos tensoativos Tween 80[®] e Span 80[®], respectivamente. As formulações preparadas sem fármaco também apresentaram comportamento semelhante no que diz respeito ao método de preparação (Tabela 2).

Estas diferenças de tamanhos de partículas, considerando-se os dois métodos, já foram evidenciadas em outros sistemas nanoparticulados²⁵ e são provavelmente inerentes aos distintos mecanismos de formação das partículas. No método de deposição-interfacial (nanoprecipitação), a fase orgânica contendo o polímero, o óleo e um tensoativo opcional é injetada na fase aquosa contendo um estabilizante ou tensoativo, sob agitação moderada. As nanopartículas são formadas instantaneamente pela rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa. O polímero insolúvel tanto no óleo quanto na fase aquosa precipita na interface óleo/água, formando as nanocápsulas. Assim, o mecanismo é explicado pela turbulência interfacial gerada durante o deslocamento do solvente, em função da mútua miscibilidade entre a água e o solvente (acetona)^{19,29}. Segundo Galindo-Rodriguez e colaboradores²⁵ o mecanismo de formação das nanopartículas através de nanoprecipitação pode ser descrito através das interações entre água/solvente, água/polímero e solvente/polímero. Por outro lado, a técnica de emulsificação-difusão emprega solventes parcialmente miscíveis em água, como o acetato de etila, sendo baseada na formação prévia de uma emulsão O/A. Neste caso, a fase

orgânica é emulsificada, sob agitação vigorosa, em uma fase aquosa contendo um estabilizante ou tensoativo. A posterior adição de um elevado volume de água à emulsão, provoca a difusão do solvente para a fase aquosa externa, formando as nanocápsulas¹⁹. De acordo com Choi e colaboradores³⁰, a razão dos coeficientes de difusão do solvente e da água, o efeito da interação polímero-solvente, assim como a fração de polímero no meio podem explicar o mecanismo de formação das nanopartículas por este método.

Portanto, a formação das nanocápsulas por deposição interfacial é resultante da alta miscibilidade entre a água e o solvente, o qual difunde espontaneamente na água. Por outro lado, no método de emulsificação-difusão, a formação de uma emulsão por cisalhamento seguida da difusão do solvente leva à precipitação das partículas através de uma agitação vigorosa e pela adição de um excesso de água, respectivamente.

Polidispersão

A polidispersão é uma medida da largura de distribuição de tamanhos, sendo que quanto mais próxima de zero mais estreita é a largura de distribuição, indicando um sistema unimodal ou mesmo monodisperso, e, quanto mais próximo de 1, é indicativo de menor homogeneidade de distribuição de tamanho de partícula²⁵. A análise fatorial demonstrou que apenas o fator método de preparação influenciou na variável resposta polidispersão ($p < 0,0001$), sendo que o método de emulsificação-difusão exerceu efeito positivo sobre a mesma, ou seja aumento da polidispersão (Figura 2B). As nanocápsulas, contendo melatonina, obtidas através de deposição interfacial apresentaram valores de polidispersão entre 0,10 e 0,14. Quando o método de emulsificação-difusão foi empregado a polidispersão manteve-se entre 0,24 e 0,31, indicando que essas apresentaram menor homogeneidade de distribuição de tamanho de partículas em relação ao método anterior. As formulações preparadas sem fármaco apresentaram comportamento semelhante (Tabela 2).

Análise morfológica

Imagens de formulações de nanocápsulas contendo melatonina, obtidas através de MET, podem ser observadas na Figura 3. Pode-se verificar que as partículas são esféricas e com relativa homogeneidade de tamanho.

➤ Inserir Figura 3

As partículas, obtidas através de emulsificação-difusão e visualizadas por MET, apresentam diâmetros próximos de 100 a 170 nm (Figura 3B, 3C, 3D), bastante inferiores aos diâmetros (213 a 306 nm; Tabela 2) medidos através de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer®). As formulações preparadas por deposição interfacial também apresentaram diâmetros inferiores aos medidos por espalhamento de luz dinâmico (124 a 151 nm; Tabela 2), quando observadas por MET (60 a 90 nm; Figura 3A). As diferenças de tamanho entre estes dois métodos são devidas provavelmente às diferenças de princípio entre os mesmos, pois a microscopia eletrônica fornece a imagem das partículas secas, enquanto que a espectroscopia de correlação de fótons possibilita a determinação do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão, portanto, leva em conta a camada de hidratação ao redor das partículas^{13,31}.

Estruturas multilamelares não foram verificadas nas formulações preparadas com Epikuron 170® (Figura 3C, 3D), indicando que provavelmente não houve formação de lipossomas concomitantemente às nanopartículas, demonstrando que não se encontra em excesso nas formulações. A presença de estruturas multilamelares já foi relatada na literatura, quando Epikuron 170® foi empregado como tensoativo na preparação de nanocápsulas de poli(lactídeo)¹¹.

Valores de pH

O fator método de preparação foi a única variável que exerceu influência significativa ($p < 0,0001$) na resposta aos valores de pH das suspensões, sendo que o método de emulsificação-difusão apresentou um efeito negativo, ou seja diminuição do pH (Figura 2C).

Assim, as suspensões de nanocápsulas preparadas através do método de deposição interfacial (Tabela 2) apresentaram valores de pH menos ácidos (4,8 - 5,5) em relação ao método de emulsificação-difusão (3,7 - 3,9). As formulações preparadas sem melatonina apresentaram valores similares de pH em relação às preparadas com melatonina, além de apresentarem o mesmo comportamento levando-se em conta o método de preparação (Tabela 2). Estas diferenças são, provavelmente, resultantes de impurezas ácidas residuais presentes no acetato de etila.

Potenciais zeta

O potencial zeta, indicativo do potencial de superfície das partículas, é um parâmetro importante a ser avaliado na medida em que pode afetar a resposta biológica do fármaco associado, além de ser utilizado para prever e controlar a estabilidade de suspensões coloidais ou de emulsões, sendo frequentemente um fator chave para o entendimento de fenômenos de dispersão e de agregação. Valores em módulo mais altos de potencial zeta tendem a tornar os sistemas mais estáveis^{12,32}, pois, devido à repulsão eletrostática entre as partículas, a barreira de energia para um choque efetivo para a agregação é maior. Os elevados valores positivos de potenciais zeta de todas as formulações demonstram que a superfície das partículas é revestida com o polímero Eudragit RS100[®] (Figura 2D), única matéria-prima catiônica presente em todas as formulações, nesses valores de pH. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que este polímero apresenta grupamentos de amônio quaternário, conferindo potencial de superfície positivo às nanopartículas³³.

Através da análise fatorial, verificou-se que houve influência significativa do tipo de tensoativo ($p < 0,0001$), do método de preparação ($p < 0,0001$) e do tipo óleo empregado ($p = 0,0001$), sendo a interação também significativa entre os três fatores ($p = 0,0025$). O método de emulsificação-difusão, o óleo Eutanol G[®] e o conjunto de tensoativos Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®] exerceram efeito positivo sobre o potencial zeta, ou seja a utilização dos

mesmos aumentou o valor deste parâmetro (Figura 2D). Desta forma, as formulações preparadas com Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®] (+ 32 ± 1 mV e + 35 ± 1 mV; + 42 ± 1 mV e + 52 ± 2 mV), como estabilizantes da formulação (Figura 2D), apresentaram potencial zeta mais elevado em relação àquelas que possuem na sua composição Span 80[®] e Tween 80[®] (+ 21 ± 4 mV e + 27 ± 3 mV; + 21 ± 1 mV e + 21 ± 2 mV), respectivamente para as formulações preparadas através de deposição interfacial e emulsificação-difusão, e empregando triglicerídeos e Eutanol G[®], respectivamente. Comportamento semelhante foi observado para as formulações preparadas sem fármaco, as quais apresentaram valores de potencial zeta mais elevados quando preparadas com Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®] (+ 25 ± 0 mV e + 24 ± 1 mV; + 40 ± 2 mV e + 43 ± 2 mV) em relação àquelas preparadas empregando-se Span 80[®] e Tween 80[®] (+ 18 ± 2 mV; + 17 ± 1 mV; + 14 ± 1 mV e + 14 ± 1 mV), para as formulações preparadas através de deposição interfacial e emulsificação-difusão, e empregando triglicerídeos e Eutanol G[®], respectivamente.

Os tensoativos tendem a acumular-se nas interfaces devido a sua natureza anfífilica, mediante uma adsorção física orientada³⁴. Span 80[®], Tween 80[®] e Pluronic F68[®], apesar de serem tensoativos não-iônicos, podem diminuir, em módulo, o potencial zeta pois tendem a adsorver-se na interface partícula/meio aquoso. Por sua vez, sistemas que empregam lecitina são estabilizados devido à presença de cargas, embora a fosfatidilcolina apresente-se zwitteriônica em pH 7,0¹¹. O Epikuron 170[®] (lecitina) pode contribuir para o valor negativo do potencial de nanopartículas^{10,11,35} em virtude, principalmente, da presença de lipídios ácidos (ácido fosfatídico), apesar de serem encontrados em baixa proporção (1-2 %) na composição total das lecitinas^{11,36}. Mosqueira e colaboradores¹¹ avaliaram a influência da lecitina (Epikuron 170[®]) sobre o potencial zeta de diferentes sistemas [lipossomas, nanoemulsão e nanocápsulas de ácido poli(D,L-lático)], em função do pH. Foi verificado que os potenciais zeta dos três sistemas apresentaram-se negativos em pH de 3,0 a 12. Um platô

de potencial zeta negativo foi observado a cerca de pH 4 a 6, correspondendo a ionização dos os grupos fosfatidil, e, acima desta faixa, a totalidade da carga dos fosfolipídios foi negativa.

No entanto, no presente trabalho, no qual o pH das formulações variou de 3,7 a 5,5, as presenças de Epikuron 170[®] e de Pluronic F68[®] resultaram em um aumento do potencial positivo conferido pelo Eudragit RS100[®]. Pode-se supor que grupamentos negativamente carregados da lecitina possam estar interagindo com alguns grupamentos amônio quaternários do polímero, de forma que, por repulsão das porções colina (positivamente carregadas), a interface apresente maior potencial zeta devido à localização das moléculas do tensoativo mais afastadas da partícula. Conforme esta hipótese, o potencial zeta permaneceria maior para as formulações preparadas com Epikuron 170[®]/Pluronic F68[®] em comparação àqueles resultantes das formulações preparadas com Span 80[®]/Tween 80[®].

Comparando-se as formulações, contendo melatonina com àquelas sem fármaco, foi verificado que, em todos os casos, o potencial zeta das partículas, após a preparação, foi maior para as formulações que continham o fármaco, sendo a extensão da diferença média (2 a 11 mV) dependente da composição e do método de preparação (Figura 4). De acordo com estes resultados, pode ser sugerido que pelo menos uma fração da melatonina, fármaco não-ionizável nas condições das suspensões, estaria associada aos sistemas na interface polímero/água. Alterações no potencial zeta de suspensões nanoparticuladas poliméricas, devido à presença de fármacos adsorvidos, têm sido encontradas na literatura, causando geralmente redução em módulo do mesmo³⁷. Entretanto, a presença de melatonina causou um aumento do potencial zeta inicial, fato que pode estar relacionado com mudanças na estruturação das partículas causadas pela presença do fármaco, levando a uma maior exposição de grupamentos de amônio quaternário à superfície das partículas.

➤ Inserir Figura 4.

Estudo de estabilidade

O teor total de melatonina nas suspensões de nanocápsulas tendeu a diminuir em função do tempo (Figura 5A, 5B), mas esta diminuição não foi significativa até 1 mês de armazenamento. Após 2 meses, verificou-se que as suspensões contendo Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®] apresentaram uma redução média maior em relação àquelas preparadas com Tween 80[®] e Span 80[®], diminuição esta que permaneceu entre $17 \pm 1 \%$ e $21 \pm 13 \%$ e entre $15 \pm 15 \%$ e $16 \pm 8 \%$, para as primeiras, e entre $5 \pm 2 \%$ e $15 \pm 5 \%$ e entre $7 \pm 3 \%$ e $8 \pm 2 \%$, para as últimas, respectivamente, para os métodos de deposição interfacial e de emulsificação-difusão. Em hipótese, este fato poderia estar relacionado à potente ação antioxidante da melatonina, que atuaria se oxidando para proteger os fosfolípidios (Epikuron 170[®]), muito sensíveis à oxidação. Os produtos de degradação da melatonina (*N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinurenamina e 6-hidroximelatonina), resultantes da sua oxidação, têm sido descritos na literatura³⁸.

➤ Inserir Figura 5.

Em relação às taxas de associação da melatonina às nanocápsulas (Figura 5C, 5D), estas mantiveram-se dentro da faixa de $38 \pm 4 \%$ a $45 \pm 5 \%$, durante 60 dias, não apresentando diferenças significativas em relação às taxas de associação determinadas após a preparação, independentemente da composição e do método de preparação. Portanto, o equilíbrio entre fármaco livre e associado, obtido após a preparação dos sistemas, manteve-se em função do tempo.

Quanto ao diâmetro médio das nanocápsulas contendo melatonina, após 1 mês de armazenamento, não foi observada alteração significativa no diâmetro das partículas, independentemente da composição e do método de preparação (Figura 6A, 6B). Após 2 meses, apenas as formulações preparadas com Eutanol G[®], Span 80[®] e Tween 80[®], através de deposição interfacial, e aquelas preparadas com triglicerídeos, Epikuron 170[®] e Pluronic

F68[®], por meio de emulsificação-difusão, apresentaram aumento significativo do diâmetro médio de partícula. No caso das formulações preparadas sem fármaco, após 1 mês de armazenamento, o diâmetro médio de partícula aumentou significativamente para a maioria das formulações (Figura 6C, 6D), especialmente para aquelas preparadas através de emulsificação-difusão, podendo-se sugerir, então, que a provável presença de uma fração de melatonina adsorvida possa estar contribuindo para a estabilidade física destes sistemas.

➤ Inserir Figura 6.

Em relação à polidispersão (Figura 6E, 6F), para as nanocápsulas preparadas com melatonina, não houve variação significativa até 30 dias de armazenamento. Entretanto, após 60 dias, a polidispersão das partículas aumentou significativamente para a maioria das formulações, sendo que permaneceu menor para as suspensões preparadas por deposição interfacial ($0,16 \pm 0,04$ a $0,30 \pm 0,00$) em comparação às preparadas através de emulsificação-difusão ($0,33 \pm 0,03$ a $0,40 \pm 0,02$). O aumento da polidispersão pode indicar que, com o tempo, estes sistemas nanoparticulados tenderiam a aumentar a distribuição de tamanho de partícula, provavelmente em função da agregação das partículas. No entanto, o aumento na polidispersão não refletiu em aumento significativo no diâmetro médio de partículas para a maioria das formulações (Figura 6A, 6B, 6E e 6F). Por sua vez, as suspensões preparadas sem fármaco apresentaram aumento na polidispersão após 30 dias de armazenamento, na maioria dos casos (Figura 6G, 6H).

Os valores de pH de todas as suspensões contendo melatonina, preparadas através de deposição interfacial, diminuíram (4,0 a 4,2) em relação aos valores iniciais (4,8 a 5,5; Tabela 2), durante os 60 dias (Figura 7E). Por outro lado, as formulações preparadas através de emulsificação-difusão, as quais apresentavam valores inferiores de pH após a preparação (3,7 a 3,9; Tabela 2), em relação ao primeiro método, não demonstraram alterações significativas nos valores de pH após 60 dias de armazenamento (3,5 a 4,0), embora algumas tenderam a um

pequeno aumento (Figura 7F). Estas diferenças no comportamento dos valores de pH, em função do tempo, podem ter alguma relação com os valores iniciais distintos após a preparação (Tabela 2), quando se compara os dois métodos. Comportamento semelhante foi verificado para as suspensões preparadas sem fármaco (Figura 7G, 7H).

➤ Inserir Figura 7.

Quanto ao potencial zeta (Figura 7A), os valores após a preparação, para a maioria das formulações preparadas por deposição interfacial ($+21 \pm 4$ a $+35 \pm 1$ mV), tenderam a aumentar passando à faixa de $+29 \pm 5$ a $+37 \pm 0,3$ mV, após 30 dias, e, após 60 dias, tenderam a diminuição ($+24 \pm 1$ a $+30 \pm 1$ mV), voltando a ficar mais próximos dos valores iniciais. Estas variações foram significativas apenas para algumas formulações (Figura 7A). Para as suspensões preparadas através de emulsificação-difusão (Figura 7B), os valores iniciais de $+21 \pm 1$ a $+52 \pm 2$ mV passaram para faixa de $+25 \pm 0,2$ a $+48 \pm 3$ mV, após 30 dias, e para $+22 \pm 1$ a $+42 \pm 0,4$ mV, após 60 dias de armazenamento. A maioria das formulações preparadas utilizando Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®], as quais apresentaram valores mais elevados de potencial zeta após a preparação, demonstraram redução significativa dos mesmos após 60 dias de armazenamento, no entanto, permanecendo ainda superiores aos preparados com Span 80[®] e Tween 80[®] (Figura 7A, 7B). Quase a totalidade das suspensões preparadas sem fármaco, as quais após a preparação apresentaram potenciais zeta inferiores àqueles das formulações contendo melatonina, apresentou aumento significativo destes após 30 dias de armazenamento (Figura 7C, 7D), ficando na faixa de $+28 \pm 3$ a $+33 \pm 2$ mV e de $+25 \pm 0,5$ a $+49 \pm 1$ mV, após 60 dias, respectivamente, para as formulações preparadas através de deposição interfacial e de emulsificação-difusão. Entretanto, estes aumentos nos valores de potencial zeta não foram suficientes para prevenir a agregação das nanopartículas preparadas sem fármaco, a qual causou aumento significativo dos diâmetros médios de

partículas para a maioria das formulações, principalmente para àquelas preparadas através de emulsificação-difusão.

CONCLUSÃO

Foi verificada influência do método de preparação e/ou da composição das formulações sobre as características físico-químicas das nanocápsulas, exceto para os teores e as taxas de associação da melatonina. Os valores positivos de potencial zeta das partículas foram influenciados pelo método de preparação, pela composição dos sistemas e pela interação entre estes fatores. Os diâmetros médios de partículas foram influenciados pelo método de preparação e por sua combinação com os tensoativos empregados. Por outro lado, a polidispersão dos sistemas foi influenciada apenas pelo método de preparação, sendo maiores quando o método de emulsificação-difusão foi empregado.

Os teores totais de melatonina permaneceram estáveis para todas as formulações até 30 dias de armazenamento, e as taxas de associação do fármaco permaneceram estáveis durante os 60 dias do estudo. As diminuições dos teores de melatonina foram influenciadas pela composição das suspensões, de forma que aquelas preparadas com Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®] apresentaram maior decaimento médio em função do tempo. Os diâmetros médios de partícula foram estáveis para a maioria das suspensões preparadas com melatonina, durante dois meses, entretanto, a polidispersão tendeu a aumentar após este período.

De acordo com o delineamento fatorial e com o estudo de estabilidade realizados, as nanocápsulas de Eudragit RS100[®] preparadas através de deposição interfacial e com Span 80[®]/Tween 80[®] apresentaram características mais adequadas para estudos posteriores de aplicações da melatonina, a ser administrada por via oral, em função de uma maior homogeneidade de distribuição das partículas e maior estabilidade química da melatonina, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à FAPERGS, à CAPES, à Rede Nanobiotec-CNPq/MCT-Brasil e à Rede Nanocosméticos-CNPq/MCT-Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrenetxe, J.; Delagrange, P.; Martínez, J. A.; *J. Physiol. Biochem.* **2004**, *60*, 61.
2. Epstein, F. H.; *New Engl. J. Med.* **1997**, *336*, 186; Reiter, R.; Tang, L.; Garcia, J.J; Muñoz-Hoyos, A.; *Life Sci.* **1997**, *60*, 2255; Beyer, C.E.; Steketee, J. D.; Saphier, D.; *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1265; Reiter, R.J.; *Best Pract. Res. Clin. Endoc. Metab.* **2003**, *17*, 273.
3. Siegrist, C.; Benedetti, C.; Orlando, A.; Beltrán, J. M.; Tuchscher, L.; Nosedá, M. J.; Brusco, L. I.; Cardinali, D. C.; *J. Pineal Res.* **2001**, *30*, 34.
4. Kirby, A.W.; Clayton, M.; Rivera, P.; Comperatore, C.A.; *J. Pineal Res.* **1999**, *27*, 78.
5. Cabeza, J.; Motilva, V.; Martín, M.J.; de la Lastra, C.A.; *Life Sci.* **2001**, *68*, 1405.
6. Vijayalaxmi, C. R. T.; Reiter, R.J.; Herman, T.S.; *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 2575.
7. Ortega-Gutiérrez, S.; García, J. J; Martínez-Ballarín, Reiter, R.J.; Millán-Plano, S.; Robinson, M.; Acuña-Castroviejo, D.; *Neurosci. Lett.* **2002**, *323*, 55; Yamamoto, H-a.; Mohanan, P.V. *Toxicology* **2002**, *179*, 29.
8. El-Gibaly, I.; Meki, A.M.A.; Abdel-Ghaffar, S.K.; *Int. J. Pharm.* **2003**, *260*, 5; Lee, B-J.; Ryu, S-G.; Cui, J-H.; *Drug Dev.Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 493.
9. Lee, B-J.; Parrot, K. A.; Ayres, J. W.; Sack, R. L. *Int. J. Pharm.* **1995**, *124*, 119; Lee, B-J.; Mim, G-H.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *144*, 37; Lee, B-J.; Parrot, K. A.; Ayres, J. W.; Sack, R. L.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1996**, *22*, 269; Lee, B-J.; Choe, J.S.; Kim, C-K.; *J. Microencapsul.* **1998**, *15*, 775; Kandimalla, K.K.; Kanikkannan, N.; Singh, M.; *J. Control. Release* **1999**, *61*, 71; El-Gibaly, I.; *Int. J. Pharm.* **2002**, *249*, 7; Kumar, A.; Agarwa, S.P.; Khanna, R.; *Pharmazie* **2003**, *58*, 642; Mao, S.; Chen, J.; Wei, Z.; Liu, H.; Bi, D.; *Int. J. Pharm.* **2004**, *272*, 37; Dubey, V.; Mishra, D.; Asthana, A.; Jain, N.K.; *Biomaterials* **2006**; *27*, 3491.
10. Legrand, P.; Barrat, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J.P.; *STP Pharma Sci.* **1999**, *9*, 411.

11. Mosqueira, V.C.F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barratt, G.; *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 614.
12. Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Lucca-Freitas, L.; Pohlmann, AR.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 726.
13. Couvreur, P.; Barrat, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C.; *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19*, 99.
14. Verger, M. L-Le.; Fluckiger, L.; Kim, Y-II.; Hoffman, M.; Maincent, P.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 137.
15. Allémann, E.; Leroux, J-C.; Gurny, R.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *34*, 171.
16. Teixeira, M.; Alonso, M. J.; Pinto, M. M. M.; Barbosa, C. M.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *59*, 491.
17. Guterres, S.S.; Muller, C.R.; Michalowski, C.B.; Pohlmann, A.R.; Dalla Costa, T. *STP Pharma Sci.* **2001**, *11*, 229; Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Dalla-Costa, T.; Guterres, S. S.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, *56*, 501.
18. Beck, R. C. R.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; *J. Microencapsul.* **2004**, *21*, 499; Beck, R. C. R.; Pohlmann, A. R.; Benvenuti, E. V.; Dalla Costa, T. C.; Guterres, S.S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1233; Beck, R. C. R.; Hass, S. E.; Guterres, S.S.; Ré, M. I.; Benvenuti, E. V.; Pohlmann, A.R; *Quím. Nova* **2006**, no prelo.
19. Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 1113; Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H.; *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1056.
20. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.Ph.; Ammory, N.; Benita, S.; *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, r1.
21. Leroux, J.C.; Allémann, E.; Doelker E.; Gurny R.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995**, *41*, 14.

22. Quintanar-Guerrero, D.; Fessi H.; Allémann, E.; Doelker, E.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *143*, 133; Quintanar-Guerrero, D.; Fessi, H.; Allémann, E.; Doelker, E.; *Fr pat 97 09 672*, **1997**; Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H.; *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275*, 640; Quintanar-Guerrero D.; Fessi H.; Doelker E.; Allémann E.; *PCT Patent W09904766A*, **1999**.
23. Colombo, A.P.; Briançon, S.; Lieto, J.; Fessi, H.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2001**, *27*, 1063.
24. Galindo-Rodríguez, S.A.; Puel, F.; Briançon, S.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *25*, 357.
25. Galindo-Rodríguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E.; *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1428.
26. Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; de Cordova, C. A. S.; Creczynski-Pasa, T. B.; Guterres, S. S.; *Int. J. Pharm.* **2005**, *289*, 209.
27. Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Mezzalira, G.; Guterres, S. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 562.
28. Ubrich, N.; Schimidt, C.; Bodmeier, R.; Hoffman, M.; Maincent, P.; *Int. J. Pharm.* **2005**, *288*, 169.
29. Puisieux, F.; Barrat, G.; Couarraze, G.; Couvreur, P.; Devissaguet, J-P.; Dubernet, C.; Fattal, E.; Fessi, H.; Vauthier, C.; Benita, S.; Em *Polymeric Biomaterials*. Dumitriu, S., ed.; Marcel Dekker: New York, **1994**. cap. 16.
30. Choi, S-W.; Kwon, H-Y.; Kim, W-S.; Kim, J-H.; *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* **2002**, *201*, 283.
31. Hoffman, F.; Cinatl, Jr.; Kabicková, H.; Cinalt, J.; Kreuter, J.; Stieneker, F.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *157*, 189.
32. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J-E.; Benoit, J-P.; *Biomaterials*, **2003**, *24*, 4283.

33. Hoffart, V.; Ubrick, N.; Simonin, C.; Babak, V.; Vigneron, C.; Hoffman, M.; Lecompte, T.; Maincent, P.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28*, 1091.
34. Schott H.; Em *Remington: A ciência e a prática da farmácia*; Gennaro, A.R. (ed.); 20 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **2004**, cap 21.
35. Calvo, P.; Vila-Jato, J.L.; Alonso, M.J.; *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 530.
36. Washington C.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *20*, 131.
37. Alonso, M. J.; Losa, C.; Calvo, P.; Vila-Jato, J.L.; *Int. J. Pharm.* **1991**, *68*, 69; Chasteigner, S.; Cavé, G.; Fessi, H.; Devissaguet, J-P.; Puisieux, F.; *Drug Dev. Res.* **1996**, *38*, 116.
38. Andrisano, V.; Bertucci, C.; Battaglia, A.; Cavrine, V.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *23*, 15; Maharaj, D.S.; Anoopkumar-Dukie, S.; Glass, B.D.; Antunes, E.M.; Lack, B.; Walker, R.B.; Daya, S.; *J. Pineal Res.* **2002**, *32*, 257; Maharaj, D.S.; Walker, R.B.; Glass, B.D.; Daya, S.; *J. Chem. Neuroanat.* **2003**, *26*, 103.

Lista de figuras

Figura 1. Estruturas químicas da melatonina e dos componentes empregados na preparação das nanocápsulas.

Figura 2. Potenciais zeta, diâmetros, polidispersões e pH das suspensões de nanocápsulas contendo melatonina, após a preparação.

Figura 3. Imagens obtidas através de TEM a partir das nanocápsulas de Eudragit RS100[®] contendo melatonina: formulações preparadas com triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico e com Span 80[®]/Tween 80[®], através do método de deposição interfacial (A) ou de emulsificação-difusão (B); formulações preparadas através de emulsificação-difusão, empregando triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (C) ou Eutanol G[®] (D) e Epikuron 170[®]/Pluronic F68[®].

Figura 4. Comparação dos valores de potencial zeta das formulações preparadas com melatonina e sem fármaco.

Figura 5. Teores e taxas de associação da melatonina às nanocápsulas em função do tempo de armazenamento.

Figura 6. Diâmetros e polidispersões das suspensões de nanocápsulas, preparadas com ou sem melatonina, em função do tempo de armazenamento.

Figura 7. Potenciais zeta e valores de pH das formulações de nanocápsulas, preparadas com ou sem melatonina, em função do tempo de armazenamento.

Tabela 1. Desenho fatorial 2^3 das formulações de nanocápsulas de Eudragit RS100[®] contendo melatonina.

Fatores	Níveis	
	(-1)*	(1)*
1- Método de preparação	Deposição interfacial	Emulsificação-difusão
2- Tipo de óleo	Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico	Eutanol G [®]
3- Tipos de tensoativos	Span 80 [®] e Tween 80 [®]	Epikuron 170 [®] e Poloxamer 188

*Notação utilizada pelo programa Stat Graphics, indicativo da direção do efeito, ou seja se das combinações das variáveis de -1 para 1 causam efeito positivo ou negativo na variável resposta.

Tabela 2. Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo ou não melatonina, preparadas através dos métodos de deposição interfacial (DI) ou de emulsificação-difusão (ED).

Formulações contendo melatonina							Formulações sem fármaco	
Componentes		Método	Teor total de melatonina (mg/mL)	Taxa de associação da melatonina (%)	Diâmetro [nm] (PI)	pH	Diâmetro [nm] (PI)	pH
Tensoativos	Óleo							
Span80 [®] / Tween80 [®]	TG	DI	1,54 ± 0,03	45 ± 1	138 ± 5 (0,13)	4,8 ± 0,27	144 ± 3 (0,13)	4,8 ± 0,02
Epikuron [®] / Pluronic [®]	TG	DI	1,53 ± 0,08	42 ± 4	124 ± 3 (0,10)	5,5 ± 0,80	123 ± 2 (0,10)	5,3 ± 0,02
Span80/ Tween80	Eutanol G	DI	1,58 ± 0,05	45 ± 4	151 ± 4 (0,14)	5,0 ± 0,09	148 ± 4 (0,12)	5,0 ± 0,02
Epikuron [®] / Pluronic [®]	Eutanol G	DI	1,55 ± 0,06	47 ± 4	133 ± 14 (0,10)	5,0 ± 0,08	133 ± 4 (0,10)	4,5 ± 0,01
Span80 [®] / Tween80 [®]	TG	ED	1,52 ± 0,03	43 ± 1	213 ± 3 (0,24)	3,7 ± 0,18	203 ± 2 (0,20)	3,9 ± 0,03
Epikuron [®] / Pluronic [®]	TG	ED	1,57 ± 0,06	44 ± 2	263 ± 16 (0,31)	3,9 ± 0,26	278 ± 6 (0,36)	3,8 ± 0,01
Span80 [®] / Tween80 [®]	Eutanol G	ED	1,48 ± 0,02	43 ± 2	238 ± 26 (0,29)	3,7 ± 0,18	210 ± 5 (0,18)	3,8 ± 0,01
Epikuron [®] / Pluronic [®]	Eutanol G	ED	1,48 ± 0,06	42 ± 1	306 ± 39 (0,30)	3,7 ± 0,21	211 ± 5 (0,24)	3,7 ± 0,01

TG: triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico; PI: polidispersão.

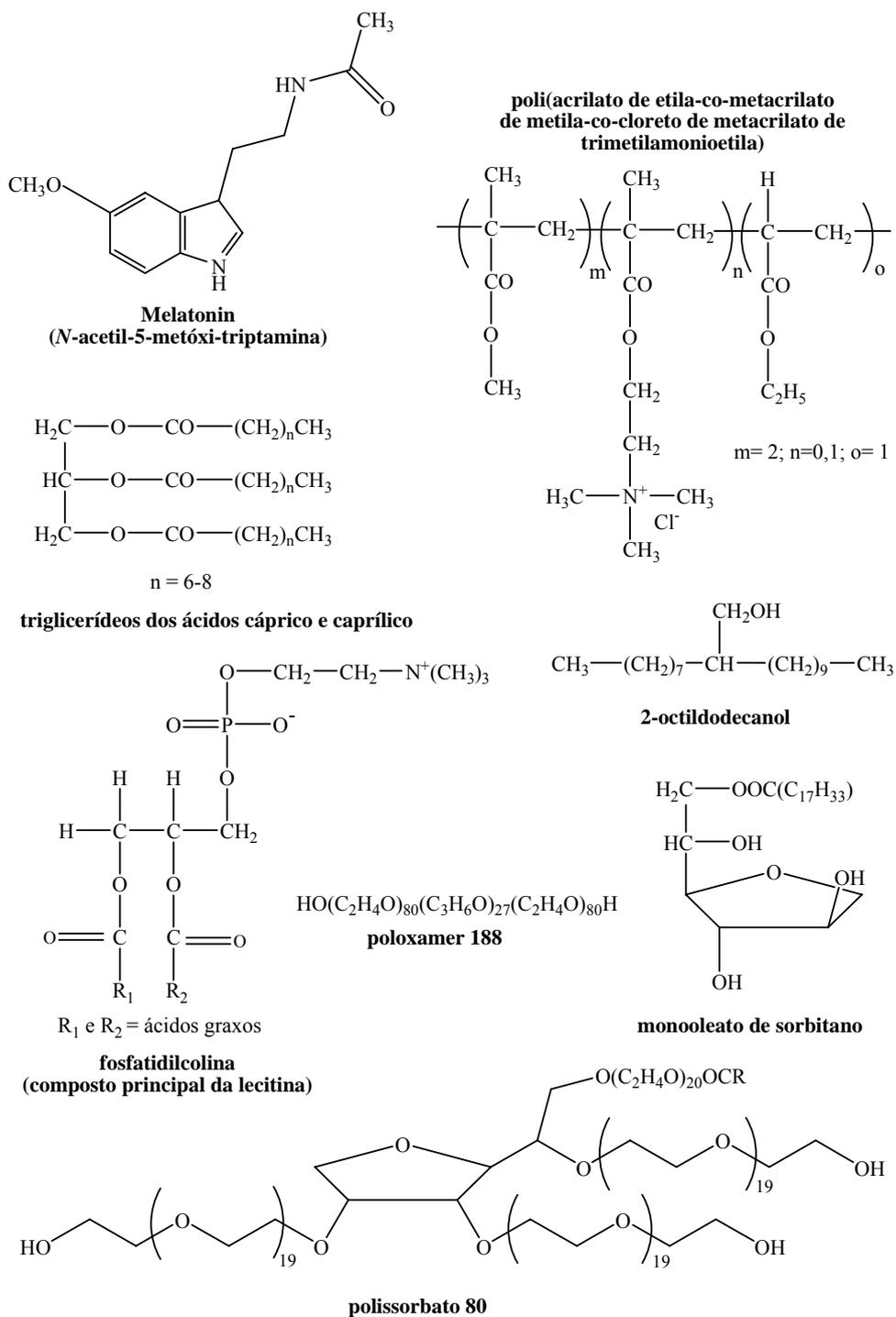
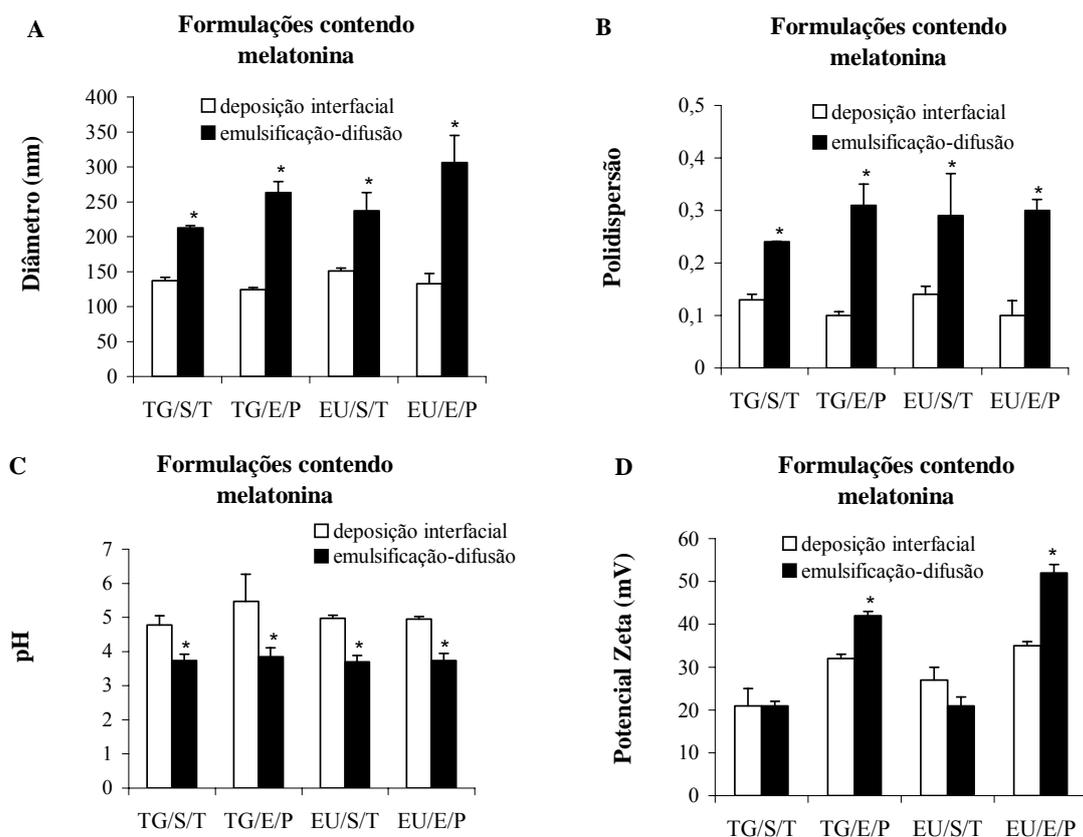


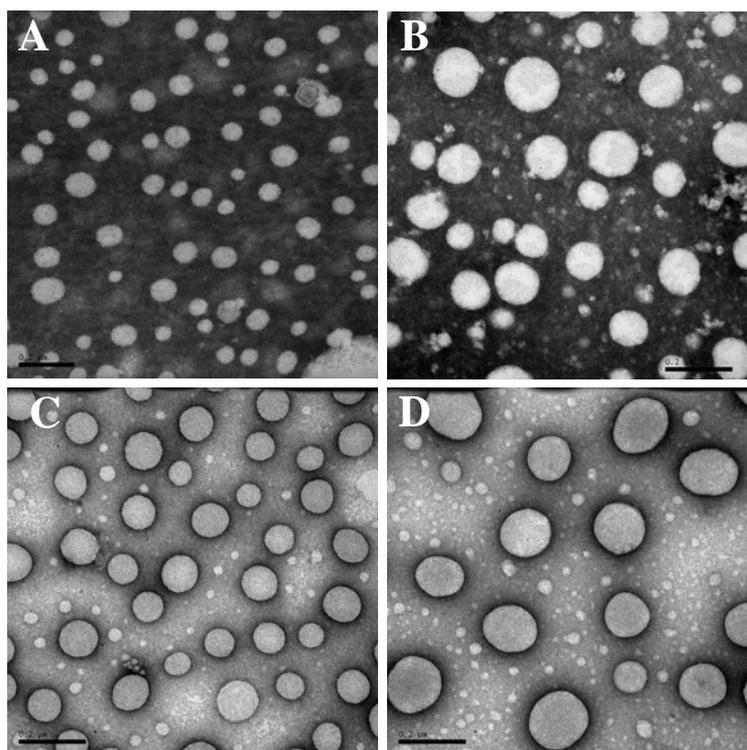
Figura 1. Estruturas químicas da melatonina e dos componentes empregados na preparação das nanocápsulas.



TG: triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico; EU: Eutanol G[®]; S: Span 80[®]; T: Tween 80[®]; E: Epikuron 170[®]; P: Pluronic F68[®].

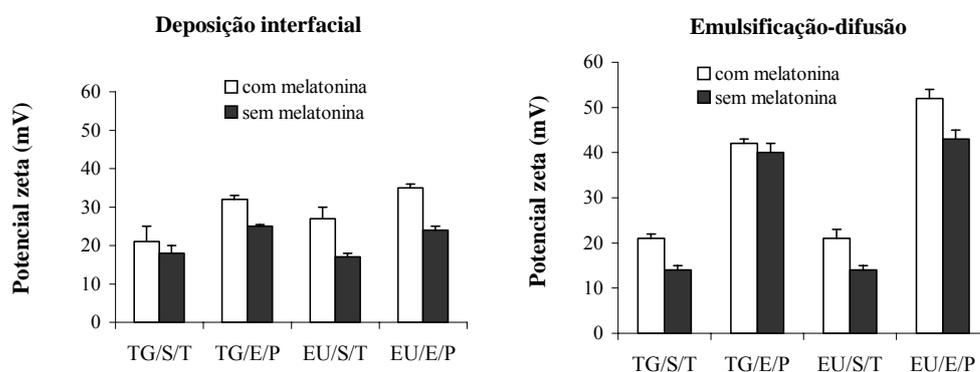
*Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à respectiva formulação preparada através do método de nanoprecipitação.

Figura 2. Potenciais zeta, diâmetros, polidispersões e pH das suspensões de nanocápsulas contendo melatonina, após a preparação.



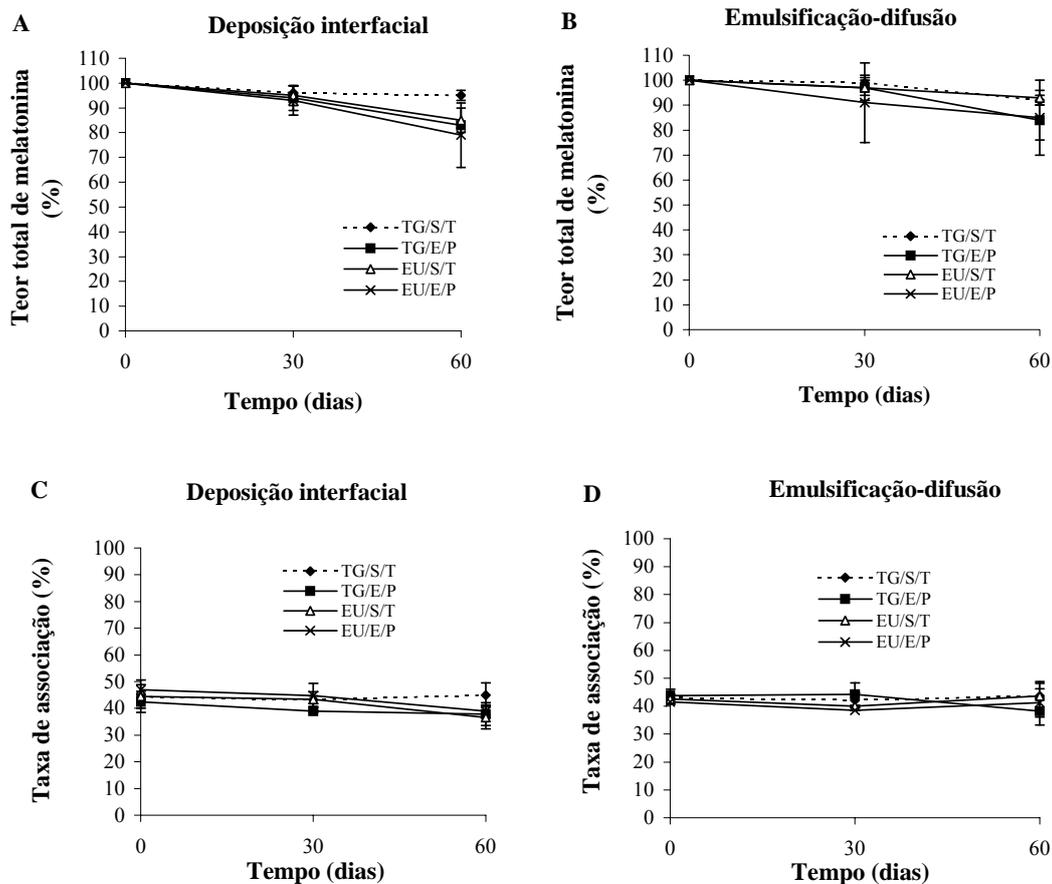
* A barra corresponde a 200 nm.

Figura 3. Imagens obtidas através de TEM a partir das nanocápsulas de Eudragit RS100[®] contendo melatonina: formulações preparadas com triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico e com Span 80[®]/Tween 80[®], através do método de deposição interfacial (A) ou de emulsificação-difusão (B); formulações preparadas através de emulsificação-difusão, empregando triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (C) ou Eutanol G[®] (D) e Epikuron 170[®]/Pluronic F68[®].



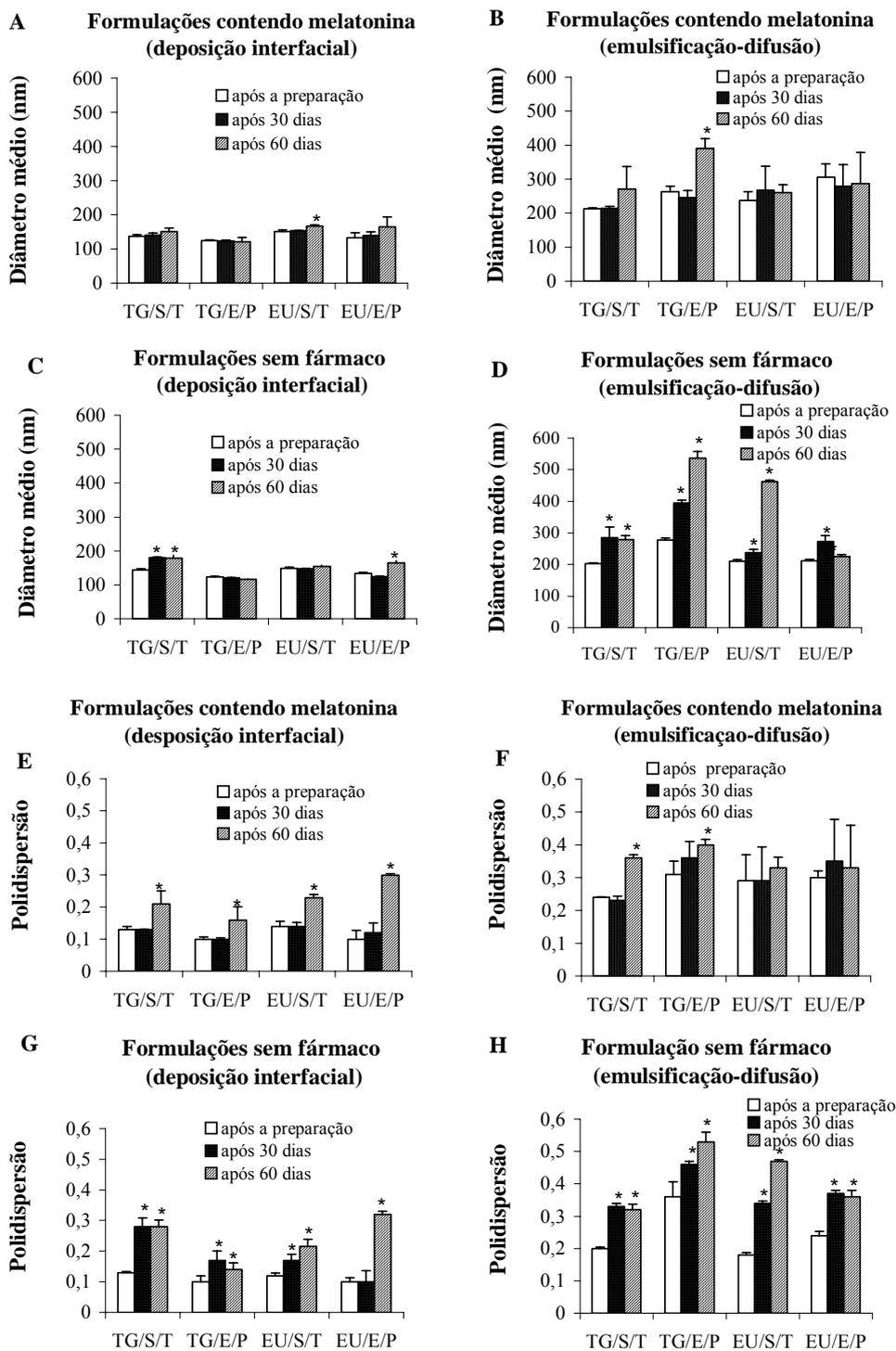
TG: triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico; EU: Eutanol G[®]; S: Span 80[®]; T: Tween 80[®]; E: Epikuron 170[®]; P: Pluronic F68[®].

Figura 4. Comparação dos valores de potenciais zeta das formulações preparadas com melatonina e sem fármaco.



TG: triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico; EU: Eutanol G[®]; S: Span 80[®]; T: Tween 80[®]; E: Epikuron 170[®]; P: Pluronic F68[®].

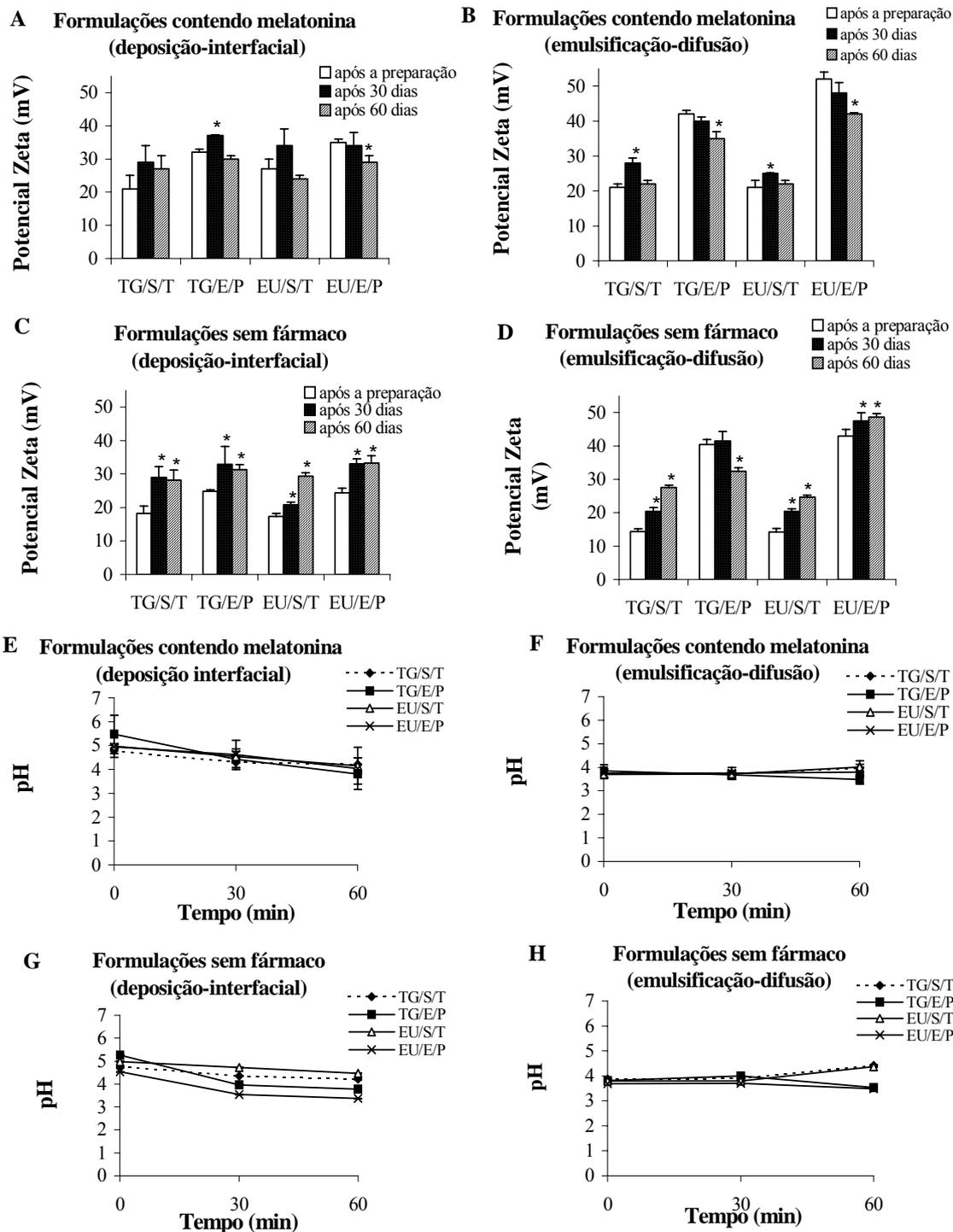
Figura 5. Teores e taxas de associação da melatonina às nanocápsulas em função do tempo de armazenamento.



* Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

TG: triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico; EU: Eutanol G[®]; S: Span 80[®]; T: Tween 80[®]; E: Epikuron 170[®]; P: Pluronic F68[®].

Figura 6. Diâmetros e polidispersões das suspensões de nanocápsulas, preparadas com ou sem melatonina, em função do tempo de armazenamento.



*Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

Figura 7. Potenciais zeta e valores de pH das formulações de nanocápsulas, preparadas com ou sem melatonina, em função do tempo de armazenamento.

CAPÍTULO 5: Avaliação *in vitro* da atividade protetora da melatonina associada às nanopartículas poliméricas contra a lipoperoxidação

5.1 Introdução

Considerando-se os capítulos anteriores, referentes ao desenvolvimento e a caracterização físico-química das suspensões de nanopartículas contendo melatonina, foi verificada a possibilidade da encapsulação parcial da melatonina aos nanocarreadores. No presente capítulo, buscou-se avaliar uma aplicabilidade destes sistemas, sendo a peroxidação lipídica a ferramenta selecionada para este fim, uma vez que a atividade antioxidante da melatonina tem sido extensivamente pesquisada neste sentido (BEYER *et al.*, 1998; REITER *et al.*, 1997; REITER *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2003). Além disto, PALUMBO e colaboradores (2002) verificaram que a encapsulação de idebenona em nanocápsulas de poli(2-cianoacrilato) de etila foi capaz de aumentar a sua atividade antioxidante *in vitro*.

Os experimentos de lipoperoxidação, apresentados neste capítulo, foram realizados na Universidade Federal de Santa Catarina, sob a orientação da Prof^a Dra. Tânia B. Creczynski-Pasa, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, e com a participação da MSc. Clarissa A. S. de Cordova.

Nanopartículas de Eudragit S100[®] foram selecionadas para o estudo, em função de apresentarem taxa de encapsulação da melatonina mais elevada em relação aos outros polímeros empregados. O efeito antioxidante da melatonina *in vitro* contra a lipoperoxidação foi avaliado utilizando lipossomas de fosfatidilcolina e microsomas de fígado de rato como modelos de membranas lipídicas. As suspensões de nanocápsulas ou de nanoesferas de Eudragit S100[®], contendo melatonina, foram avaliadas comparativamente à solução aquosa de melatonina (contendo 1 % de etanol) e à nanoemulsão contendo o fármaco. A melatonina, presente nas diferentes formulações, foi testada nas doses de 200 μM e de 400 μM . Como controle dos experimentos foram usadas as respectivas formulações preparadas sem fármaco.

PUBLICAÇÃO 5: Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation

Artigo publicado no periódico International Journal of Pharmaceutics

(Int. J. Pharm. v. 289, p. 209-213, 2005)



Pharmaceutical Nanotechnology

Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation

S.R. Schaffazick^a, A.R. Pohlmann^{a,b}, C.A.S. de Cordova^c,
T.B. Creczynski-Pasa^c, S.S. Guterres^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UFRGS, CP15003, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, CP476, 88049-900 Florianópolis, SC, Brazil

Received 17 March 2004; received in revised form 4 August 2004; accepted 3 November 2004
Available online 19 December 2004

Abstract

The aim of this study was to prepare melatonin-loaded nanoparticles (nanocapsules and nanospheres) by nanoprecipitation, using Eudragit S100[®] as polymer. The potential of these systems to protect lipids against peroxidation was evaluated in comparison to melatonin in aqueous solution and nanoemulsion. Liposomes and microsomes were used as model of a lipid membrane and lipid peroxidation was induced by free radical ascorbyl. Nanocapsule and nanosphere suspensions presented total recoveries of melatonin near 100% and associated drug around 55%. The zeta potential values were negative and the hydrodynamic diameter of particles were lower than 255 nm. The results demonstrate that the lipids were protected against peroxidation from 8 to 51% due to the presence of the melatonin and that this effect depended on the drug dose, the type of the lipid substrate and the type of colloid, in which melatonin was incorporated. Nanocapsules and nanospheres provided an important increase in the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Melatonin; Nanoparticles; Lipid peroxidation

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is a hormone principally produced and released by the pineal gland under influence of the environmental light/dark

cycle. It participates in several important physiological functions, including biologic regulation of circadian rhythms, sleep, mood, reproduction and neuroimmunomodulation. Also, anti-tumor effect of melatonin on various cancers has been reported (Vijayalaxmi et al., 2002). Exogenous melatonin has been used for treating a variety of circadian rhythm disorders,

* Corresponding author. Tel.: +55 21 51 33165411;
fax: +55 21 33165437.

E-mail address: nanoc@farmacia.ufrgs.br (S.S. Guterres).

including jet-lag and insomnia. Recently, melatonin was reported to be an effective free radical scavenger (Epstein, 1997; Beyer et al., 1998) and it has been found to protect lipid peroxidation in many experimental models, as liposomes and microsomes (Leaden et al., 2002; Saija et al., 2002; Teixeira et al., 2003). Different mechanisms are combined to explain the melatonin protective effect: (a) a direct antioxidant action inhibiting the lipid peroxidation, (b) inducing changes on lipidic bilayers fluidity, (c) protecting intracellular components against peroxidative damage (Saija et al., 2002). The potential clinical benefit of the use of melatonin as an antioxidant could include the treatment of many diseases, as cancers and neurodegenerative diseases such as Alzheimer (Beyer et al., 1998).

Exogenous controlled-release melatonin formulations have been reported to be clinically more useful for sleep maintenance than immediate release melatonin formulations (Jan et al., 2000). Furthermore melatonin-loaded controlled-release dosage forms have been investigated, due to the short half-life of melatonin (Lee et al., 1998; El-Gibaly et al., 2003).

Polymeric nanoparticulated systems (nanocapsules and nanospheres) for controlled release of drugs have been intensively investigated in the past years in the pharmaceutical field (Couvreur et al., 2002). The nanocapsule is a carrier composed by an oil core surrounded by a polymeric wall, whereas the nanosphere consists of a matrix of polymer. Both colloids, as well as nanoemulsions, are stabilized by surfactants at the interface particle/water, preventing particle agglomeration and/or drug leakage. These systems can be prepared by different methods based on polymerization of dispersed monomers or precipitation of preformed polymers (Schaffazick et al., 2003). The associated drug could be adsorbed on nanoparticles, or dissolved and entrapped in colloids (Pohlmann et al., 2004). For i.v. route, nanoparticle suspensions have been developed as drug targeting delivery systems, improving the therapeutic index of drugs (Couvreur et al., 2002), whereas for oral administration, polymeric nanoparticles have been studied as carriers for drug sustained-release (Verger et al., 1998), mucosa protection from the toxicity of drugs (Guterres et al., 2001), as well as to improve the bioavailability of drugs (Allémam et al., 1998).

Up to now, melatonin has not been associated with nanoparticles. Consequently, the potentiality of these

systems to improve the antioxidant effect of this drug was not yet evaluated. Hence, the aim of the present work was to prepare melatonin-loaded nanocapsules, nanospheres and nanoemulsion, and to evaluate the protective properties of these formulations against lipid peroxidation induced by ascorbyl free radical.

Nanocapsules containing melatonin were prepared as described by Fessi et al. (1989). Briefly, the acetone solution (67 mL) of melatonin (0.0125 g), octanoic/decanoic triglyceride mixture (0.8 mL), Eudragit S100[®] (0.25 g), sorbitan monooleate (0.1915 g) was added into an aqueous solution (133 mL) of polysorbate 80 (0.1915 g). The solvents were evaporated to eliminate the acetone and to concentrate water to a final volume of 25 mL (0.5 mg/mL melatonin). Nanospheres and nanoemulsion were also prepared, omitting the triglyceride or the polymer, respectively. Control formulations were prepared omitting the drug.

The pH values of suspensions were determined and the particle sizes were measured by photon correlation spectroscopy according to Pohlmann et al. (2002) (Brookhaven Instruments BI-200M, Spectra Physics He-Ne, $\lambda_0 = 632.8$ nm). The zeta potential (Zetasizer[®], Malvern) of suspensions were determined after dilution of samples in 1 mM NaCl.

Melatonin was assayed by HPLC. The system consisted of a UV-vis detector, pump and auto-injector S200 Perkin-Elmer and Nova-Pak[®] C₁₈ Waters column. The mobile phase consisted of acetonitrile/water (55:45, v/v). Free melatonin was separated from colloids by ultrafiltration-centrifugation (Ultrafree-MC 10,000 MW, Millipore). Total drug was measured, at 229 nm, after dissolution of colloids with acetonitrile. The associated melatonin with the nanocapsules, nanospheres and nanoemulsion was calculated from the difference between the total and the free drug concentrations.

All formulations presented macroscopic homogeneous aspect and total recoveries of melatonin were close to 100%. Nanocapsule and nanosphere suspensions presented similar amounts of associated drug (55.77 and 54.35%, respectively) (Table 1). On the other hand, the nanoemulsion showed a lower value (32.65%) than the polymeric formulations. Nanospheres presented particle sizes of 192 and 126 nm for unloaded and melatonin-loaded formulations, respectively. Besides, nanocapsules and nanoemulsion presented similar diameters (254 and

Table 1
Physico-chemical properties of drug-loaded and drug-unloaded colloids: nanospheres (NS), nanocapsules (NC) and nanoemulsion (NE)

Formulations	Associated drug (%)	Size (nm)	Zeta potential (mV)	pH
NS-melatonin	54.35	126 ± 12	-36.6 ± 1.9	3.88
NS	–	192 ± 46	-35.4 ± 2.3	4.11
NC-melatonin	55.77	236 ± 20	-43.5 ± 0.8	3.97
NC	–	254 ± 52	-45.0 ± 1.5	4.81
NE-melatonin	32.65	246 ± 4	-33.8 ± 0.5	5.15
NE	–	230 ± 48	-38.0 ± 0.5	5.01

230 nm) and the presence of melatonin did not influence this parameter (236 and 246 nm). These results showed that the presence of the oil phase caused an increase in size of colloids. The zeta potential values were -37 and -35 mV for nanospheres containing or not melatonin and -34 and -38 mV for nanoemulsions containing or not drug, respectively. For nanocapsules, the absolute values were higher (-43 and -45 mV containing or not melatonin) than those observed for the other formulations. In all cases, these values cor-

respond to stable formulations (Verger et al., 1998). The pH values for all formulations were in the range of 3.88–5.15.

Liposomes and microsomes were used as substrates for lipid peroxidation to evaluate the protective effect of melatonin associated with colloids. Bilayer liposomes (277 ± 23 nm) were prepared by dialysis as described previously (Creczynski-Pasa and Gräber, 1994). Briefly, the method consisted of the dissolution of 50 mg/mL phospholipids in buffer containing 10 mM tricine, 20 g/L sodium cholate, 10 g/L deoxycholate at pH 8.0 followed by a dialysis procedure at 30 °C for 5 h. Microsomes were obtained from liver of Wistar rats by differential centrifugation with calcium aggregation and stored at -70 °C. The lipid peroxidation was induced by the addition of 25 µM FeSO₄ and 500 µM ascorbate in a reaction medium containing 1 mg/mL microsomal protein (or 12.5 mg/mL phosphatidylcholine liposome), 0.1 M Tris-HCl pH 7.4 (Cordova et al., 2002) and 200 µM (or 400 µM) melatonin aqueous solution (0.5 mg/mL drug containing 1% ethanol) or drug-loaded colloids. The controls of the

Table 2
Effect of melatonin encapsulation on lipid peroxidation

Formulations	Dose of melatonin µM	Lipid peroxidation ^a ± S.D. ^b (nmol TBARS/mL)		Protection of melatonin against lipid peroxidation ^c ± S.D. (%)	
		Liposomes	Microsomes	Liposomes	Microsomes
Control	–	291 ± 21	3885 ± 109	–	–
Aqueous solution	200	228 ± 12*	3415 ± 378	21.8 ± 1.9	12.1 ± 1.4
	400	200 ± 22*	3250 ± 202*	31.3 ± 4.1	16.4 ± 1.1
Control	–	324 ± 43	2512 ± 500	–	–
Nanocapsules	200	216 ± 29*	2288 ± 138	33.3 ± 6.3	8.9 ± 1.9
Control	–	489 ± 61	2318 ± 83	–	–
Nanocapsules	400	239 ± 6*	1492 ± 132*	51.1 ± 6.5**	35.6 ± 3.4**
Control	–	405 ± 30	2631 ± 146	–	–
Nanospheres	200	301 ± 23*	2408 ± 180	25.8 ± 2.7	8.5 ± 0.8
Control	–	469 ± 30	2294 ± 79	–	–
Nanospheres	400	271 ± 28*	1374 ± 230*	42.2 ± 5.1**	40.1 ± 6.8**
Control	–	304 ± 7	2847 ± 156	–	–
Nanoemulsion	200	250 ± 9*	2547 ± 210	17.9 ± 0.8	10.5 ± 1.0
Control	–	410 ± 56	2835 ± 223	–	–
Nanoemulsion	400	213 ± 21*	2310 ± 155*	48.0 ± 8.1**	18.5 ± 1.9

^a TBARS = thiobarbituric acid reactive substances.

^b S.D., standard deviation, calculated from triplicate of experiments.

^c This protection is relative to the formulations prepared without melatonin (controls).

* Statistical differences between each formulation and its respective control established using *t*-test ($p < 0.05$).

** Statistical differences between the solution (400 µM of melatonin) and the formulations established using *t*-test ($p < 0.05$).

assay consisted of each colloid prepared without drug. The samples were incubated for 30 min at 37 °C and the extent of lipid peroxidation was determined by the thiobarbituric acid method (Bird and Draper, 1984). The amount of lipid peroxidation was determined using the molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$ and expressed as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The experiments were carried out in triplicate and the *t*-test ($p < 0.05$) was conducted for statistical analysis.

Table 2 shows the protective properties of melatonin against lipid peroxidation depending on the drug dose and on the type of colloid, in which melatonin was incorporated. Comparing the drug-loaded formulations (200 or 400 μM) with the controls, the results demonstrated that the lipids were protected against peroxidation from 8 to 51%, due to the presence of the drug. As it can be observed in Table 2, the presence of the melatonin has decreased significantly the lipid peroxidation, except in the case of the microsomes and melatonin at 200 μM .

Additionally, the effect was dependent on the type of the lipid substrate (microsomes or liposomes). It was observed that the antioxidant properties of melatonin can also vary depending on the lipid membrane composition (Teixeira et al., 2003). For the dose of 400 μM , comparing melatonin solution and drug-loaded colloids, the antioxidant properties of melatonin have been significantly improved when it was associated with colloids and liposomes were used as substrate. On the other hand, in the case of microsomes, only the formulations containing polymer (nanocapsules and nanospheres) showed a significant increase in the antioxidative effect of melatonin (Table 2). According to Palumbo et al. (2002), the polymeric nanostructures could adhere to the cells improving the antioxidant action of a lipophilic drug associated with nanocapsules of poly(ethyl 2-cyanoacrylate). In the present study, the polymer in nanocapsule and nanosphere formulations caused higher encapsulation rates of melatonin (55%) than in nanoemulsion (33%), improving the antioxidative effect of the drug.

In conclusion, our study showed that nanoparticles containing melatonin can be prepared from pre-formed polymer using the nanoprecipitation technique. Additionally, this nanoparticles provided an important increase in the antioxidative effect of melatonin against lipid peroxidation.

Acknowledgement

FAPERGS, FUNCITEC, CAPES, Rede Nanobiotecnologia-CNPq/MCT-Brazil.

References

- Allémann, E., Leroux, J.-C., Gurny, R., 1998. Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 34, 171–189.
- Beyer, C.E., Steketee, J.D., Saphier, D., 1998. Antioxidant properties of melatonin—an emerging mystery. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1265–1272.
- Bird, R.P., Draper, A.H., 1984. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Meth. Enzymol.* 90, 105–110.
- Cordova, C.A.S., Siqueira, I.R., Netto, C.A., Yunes, R.A., Volpato, A.M., Filho, V.C., Curi-Pedrosa, R., Creczynski-Pasa, T.B., 2002. Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. *Redox Rep.* 7, 95–102.
- Couvreux, P., Barrat, G., Fattal, E., Legrand, P., Vauthier, C., 2002. Nanocapsule technology: a review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19, 99–134.
- Creczynski-Pasa, T.B., Gräber, P., 1994. ADP binding and ATP synthesis by reconstituted H^+ -ATPase from chloroplasts. *FEBS Lett.* 350, 195–198.
- El-Gibaly, I., Meki, A.M.A., Abdel-Ghaffar, S.K., 2003. Novel B melatonin-loaded chitosan microcapsules: in vitro characterization and antiapoptosis efficacy for aflatoxin B1-induced apoptosis in rat liver. *Int. J. Pharm.* 260, 5–22.
- Epstein, F.H., 1997. Mechanisms of disease—melatonin in humans. *New Engl. J. Med.* 336, 186–195.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.-Ph., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55, r1–r4.
- Guterres, S.S., Müller, C.R., Michalowski, C.B., Pohlmann, A.R., Dalla-Costa, T., 2001. Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *S.T.P. Pharma Sci.* 11, 229–233.
- Jan, J.E., Hamilton, D., Seward, N., Fast, D.K., Freeman, R.D., Laudon, M., 2000. Clinical trials of controlled-release melatonin in children with sleep-wake cycle disorders. *J. Pineal Res.* 29, 34–39.
- Leaden, P., Barrionuevo, J., Catalá, A., 2002. The protection of long chain polyunsaturated fatty acids by melatonin during nonenzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes. *J. Pineal Res.* 32, 129–134.
- Lee, B.-J., Choe, J.S., Kim, C.-K., 1998. Preparation and characterization of melatonin-loaded stearyl alcohol microspheres. *J. Microencapsul.* 15, 775–787.
- Palumbo, M., Russo, A., Cardile, V., Renis, M., Paolino, D., Puglisi, G., Fresta, M., 2002. Improved antioxidant effect of

- idebenone-loaded polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules tested on human fibroblasts. *Pharm. Res.* 19, 71–78.
- Pohlmann, A.R., Weiss, V., Mertins, O., Pesce da Silveira, N., Guterres, S.S., 2002. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *Eur. J. Pharm. Sci.* 16, 305–312.
- Pohlmann, A.R., Soares, L.U., Cruz, L., Pesce da Silveira, N., Guterres, S.S., 2004. Alkaline hydrolysis as a tool to determine the association form of indomethacin in nanocapsules prepared with poly(ϵ -caprolactone). *Curr. Drug Del.* 1, 103–110.
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pellegrino, M.L., Tita, B., Caruso, S., Castelli, F., 2002. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53, 209–215.
- Schaffazick, S.R., Guterres, S.S., Lucca-Freitas, L., Pohlmann, A.R., 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova.* 26, 726–737.
- Teixeira, A., Morfim, M.P., Cordova, C.A.S., Charão, C.C.T., Lima, V.R., Creczynski-Pasa, T.B., 2003. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite. *J. Pineal Res.* 35, 262–268.
- Verger, M.L.-Le., Fluckiger, L., Kim, Y.-I.I., Hoffman, M., Maincent, P., 1998. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46, 137–143.
- Vijayalaxmi, C.R.T., Reiter, R.J., Herman, T.S., 2002. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J. Clin. Oncol.* 20, 2575–2601.

CAPÍTULO 6: Avaliação *in vivo* da capacidade antioxidante aguda da melatonina associada a nanocápsulas

6.1. Introdução

Tendo em vista que no capítulo anterior foi demonstrado um aumento do efeito antioxidante da melatonina *in vitro*, quando associada às nanopartículas de Eudragit S100[®], torna-se importante avaliar o efeito antioxidante *in vivo* da melatonina associada a estes sistemas. Tecidos cerebrais foram selecionados para a avaliação do efeito antioxidante da melatonina em função da sua potencialidade neuroprotetora, extensamente explorada (REITER, 1998; REITER *et al.*, 2002), e devido à capacidade de liberação de fármacos a nível do SNC que os sistemas nanoparticulados poliméricos apresentam, principalmente empregando nanocarreadores revestidos com polissorbato 80 (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2005). O fígado também foi avaliado uma vez que as nanopartículas naturalmente são capturadas pelo sistema fagocitário mononuclear, em maior ou em menor extensão dependendo da hidrofobicidade de superfície (BARRAT *et al.*, 2000; SOPHIMAT *et al.*, 2001).

Desta forma, no presente capítulo, foi avaliada a capacidade antioxidante da melatonina em solução ou associada a nanocápsulas, após a administração intraperitoneal em camundongos. O efeito antioxidante foi avaliado de forma aguda, uma vez que foi administrada uma dose única de melatonina (1mg/kg ou 10 mg/kg) e, após 1 hora, os animais foram decapitados, retirando-se o fígado e tecidos cerebrais para posteriores análises. Cabe ressaltar, que os animais não receberam nenhum tratamento para provocar estresse oxidativo, sendo que o objetivo desta parte do trabalho foi verificar se a administração da melatonina, nas condições acima descritas, seria capaz de melhorar a capacidade antioxidante em condições normais. Foram avaliados a lipoperoxidação, o teor de radicais livres e a reatividade antioxidante total no fígado, no córtex frontal e no hipocampo.

Nanocápsulas de Eudragit S100[®] revestidas com polissorbato 80 foram então utilizadas como modelos de carreadores para este estudo *in vivo*, levando-se em conta a taxa de associação e o aumento da atividade antioxidante verificado *in vitro*.

Estes experimentos foram realizados no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto, e com a participação da Prof^a Dra. Ionara R. Siqueira.

PUBLICAÇÃO 6: Melatonin-loaded polysorbate 80-coated nanocapsules show in vivo acute antioxidant capacity of melatonin against lipid peroxidation in the brain and in the liver

Artigo a ser submetido a periódico científico

Melatonin-loaded polysorbate 80-coated nanocapsules show in vivo acute antioxidant capacity against lipid peroxidation in brain and liver

Scheila Rezende Schaffazick^a, Ionara Rodrigues Siqueira^b, Alessandra S. Badejo^a, Denise S. Jornada^a, Adriana R. Pohlmann^{a,c}, Carlos Alexandre Netto^{d*}, Sílvia Stanisçuaski Guterres^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil.

^bCentro III, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado-RS, Brazil.

^cDepartamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, 91501-970, Porto Alegre-RS, Brazil.

^dDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Abstract

It has been recently shown that the association of melatonin with polymeric nanoparticles caused an important increase in the in vitro effect against lipid peroxidation. Hence, the aim of the present study was to compare the in vivo acute antioxidant effect of intraperitoneal administration of melatonin-loaded polysorbate 80-coated nanocapsules and melatonin aqueous solution in mice brain (frontal cortex and hippocampus) and liver. The lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances - TBARS), the total antioxidant reactivity (luminol-enhanced chemiluminescence measurement) and the free radical levels (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) measurements have been carried out. Our results show that a single dose melatonin aqueous solution did not demonstrate antioxidant activity in the evaluated range, while the administration of melatonin-loaded polysorbate 80-coated nanocapsules induce a significant reduction on lipid peroxidation levels in all tissues studied. No differences on free radical content were found in the tissues. The melatonin-loaded nanocapsules significantly increased the total antioxidant reactivity in the hippocampus. These in vivo results are in accordance with our previous in vitro findings and confirm the hypothesis that polymeric nanocapsules improved the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation.

Key words: melatonin, polymeric nanocapsules, lipid peroxidation, total antioxidant reactivity, brain, liver.

Introduction

Melatonin, a neurohormone that is synthesized mainly in the pineal gland and derived from serotonin, has many effects on a wide range of physiopathological functions; its secretion is controlled by the suprachiasmatic nucleus through the photoperiod [Barrenetxe et al., 2004; Boutin et al., 2005]. Melatonin regulates the sleep/wake cycle, other circadian and seasonal rhythms, and it acts as an immunostimulator and cytoprotective agent (Epstein, 1997; Hardeland et al., 2006). In addition, in both cultured cells and organs, as well as in vivo systems, it has proved its capacity as a potent antioxidant (Reiter et al., 1996; Hardeland et al., 2006). Melatonin is a free radical scavenger since it directly neutralizes toxic oxygen- and nitrogen-based reactants. It is effective in protecting nuclear DNA and membrane lipids from oxidative damage (lipid peroxidation), in upregulation of the antioxidant enzyme activities (Reiter et al., 1997; Reiter et al., 1998; Reiter, 2003) and in downregulation of prooxidant enzymes (Hardeland et al., 2006), improving the total antioxidant defense capacity of the organism. Melatonin influences favorably the production and regeneration of glutathione, a major intracellular antioxidant (Karbownik et al., 2001). It also increases the efficiency of the electron transport chain in the inner mitochondrial membrane with a consequential reduction of free radical generation (Karbownik et al., 2001; Reiter et al., 2002). Within cell membranes, melatonin may situate itself in apposition, so it can scavenge free radicals in both the lipid and aqueous environments of the cell (Karbownik et al., 2001). Melatonin has stabilizing action in the membranes, protecting them against the reduction in the fluidity caused by oxidative stress (Reiter et al., 1998).

The efficacy of melatonin in inhibiting oxidative damage has been tested in a variety of neurological disease models, in which free radicals are believed to be in part causative of the condition; it presents neuroprotective actions against a variety of neural toxins, ischemia/reperfusion injury, hyperbaric hyperoxia, traumatic brain injury and age-associated

neurodegenerative diseases (Reiter, 1998). Preliminary evidences suggest that Alzheimer's patients may benefit from melatonin treatment, as well as animal models of Parkinson's and Huntington's diseases (Reiter et al., 2002).

Over the past few decades, there has been considerable interest in developing polymeric nanoparticles (nanocapsules and nanospheres) as effective drug delivery devices. In these submicron systems ($< 1 \mu\text{m}$), the drug is dissolved, entrapped, encapsulated and/or adsorbed or attached to the polymeric particles (Sahoo and Labhasetwar, 2003; Garcia-Garcia et al., 2005a). Nanocapsules are vesicular systems composed of an oil-filled cavity surrounded by a polymeric wall while nanospheres consist of a polymer matrix. Both nanoparticles present narrow particle size distribution and are stabilized by surfactants at the particle/water interface (Schaffazick et al., 2003a; Garcia-Garcia et al., 2005a). The potentials of nanoparticles include the improvement of therapeutic index (Couvreur et al., 2002), the delivery of poorly water-soluble compounds (Teixeira et al., 2005), the increase of bioavailability (Allémann et al., 1998), protection of the mucosa from toxicity of drugs (Guterres et al., 2001; Schaffazick et al., 2003b) and the *in vitro* improvement of the antioxidant effect (Palumbo et al., 2002; Schaffazick et al., 2005; Shea et al., 2005).

Nanoparticles have also been studied as drug carriers for the brain delivery due to their ability to provide drug access across the blood-brain barrier (BBB) for non-transportable drugs by masking the physicochemical characteristics by their nanoencapsulation (Garcia-Garcia et al., 2005a). The nanoparticles can also be used as parenteral controlled release systems to prolong the CNS availability of drugs that freely penetrate the BBB but have a short duration of action (Friese et al., 2000). In order to achieve a significant transport across the BBB, the hydrophobic surfaces of the nanoparticles must be coated with hydrophilic molecules or macromolecules. The nanoparticles become hydrophilic enough to escape, at least partially, from the adsorption of the plasmatic proteins (opsonization) and consequent recognition by

the mononuclear phagocyte system, as the macrophages of the liver and spleen (Garcia-Garcia et al., 2005a; Kreuter, 2005). Hence, polymeric nanoparticle surface coating has been employed for brain targeting either using hydrophilic surfactants as polysorbate 80 (Schröder and Sabel, 1996; Kreuter et al., 1997; Gulyaev et al., 1999; Olivier et al., 1999; Schroeder et al., 2000; Friese et al., 2000; Gelperina et al. 2002; Kreuter et al., 2003; Sun et al., 2004; Gao and Jiang, 2006) or by direct chemical bound with poly(ethyleneglycol) (block copolymers) (Calvo et al., 2001; Garcia-Garcia et al., 2005b).

We have recently developed new drug delivery systems for melatonin based on its encapsulation in polymeric nanocapsules or nanospheres (Schaffazick et al., 2005; Schaffazick et al., 2006). Melatonin-loaded polysorbate 80-coated Eudragit S100[®]-nanoparticles provided an important increase in the in vitro effect of melatonin against lipid peroxidation in comparison to the drug aqueous solution (Schaffazick et al., 2005). Given that, the aim of this study was to evaluate the in vivo acute antioxidant capacity (lipid peroxidation, total antioxidant reactivity and free radical levels) of melatonin-loaded polysorbate 80-coated nanocapsules in the brain and in the liver of mice as compared to the drug aqueous solution. Brain tissue (frontal cortex and hippocampus) was evaluated in function of both the promising neuroprotective effect of melatonin and the applicability of nanoparticles for brain drug delivery.

Materials and Methods

Chemicals

Melatonin and Eudragit S100[®] [poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) 1:2] were obtained from Acros Organics (Belgium) and Röhm GmbH (Germany), respectively. Caprylic/capric triglyceride was obtained from Brasquim (Brazil) and sorbitan monooleate (Span 80[®]) was supplied by Sigma (USA). Polysorbate 80 (Tween 80[®]) was acquired from Delaware (Brazil). Thiobarbituric acid and Trolox were obtained from Merck, 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) was obtained from Wako Chemicals USA, Inc., 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF), trichloroacetic acid (TCA), 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol) were purchased from Sigma Chemical Co. All other chemicals and solvents used were of pharmaceutical grade; all reagents were used as received.

Animals

Forty five-days-old (CF-1) male mice (average body weight 34 g), obtained from FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, RS), were maintained in a colony under constant room temperature (22 ± 2 °C) on a 12-h light-dark cycle and with food and water ad libitum. The experiments were conducted using healthy animals, without any previous treatment for induction of the oxidative stress.

Preparation of nanocapsule suspensions and melatonin aqueous solution

Nanocapsules containing melatonin were prepared by interfacial deposition of preformed polymer, as described by Fessi et al. (1989). Briefly, the organic solution consisted of 0.8 mL of oil (caprylic/capric triglyceride), 250 mg of polymer (Eudragit S100[®]), melatonin (25 mg), 192 mg of surfactant (Span 80[®]) and 67 mL of acetone. This organic phase was added with magnetic stirring into an aqueous solution (133 mL) containing 192 mg of surfactant (Tween 80[®]). Acetone was removed and the water concentrated by evaporation under reduced

pressure and the final volume of suspension was adjusted to a total volume of 25 mL (Schaffazick et al., 2005). Melatonin aqueous solution (1 mg/mL) was prepared using 0.77 % (w/v) of polysorbate 80.

Physicochemical characterization of the nanocapsules

The mean sizes and polydispersion of nanocapsules were determined by photon correlation spectroscopy (PCS). For PCS measurements, 20 μ L of each suspension were diluted to 10 mL in MilliQ[®] water. Measurements were made at room temperature (20 °C) and fixed angle of 90°, using a Brookhaven Instruments standard setup (BI-200M goniometer, BI-9000AT digital correlator and a BI9863 detection system). A Spectra Physics He-Ne laser (model 127, $\lambda_0 = 632,8$ nm) was used as light source (Pohlmann et al., 2002). The zeta potentials were determined after dilution of the samples in 1 mM NaCl aqueous solution using Zetasizer[®] Nano Series (ZEN 3600 model, Malvern Instruments).

The morphological analysis was conducted by transmission electron microscopy (TEM; Jeol, JEM 1200 ExII) operating at 80 kV. For this analysis, the diluted suspension was deposited in Formvar-Carbon support film on specimen grid (Electron Microscopy Sciences) and negatively stained with 2 % (w/v) uranyl acetate solution (Schaffazick et al., 2006).

Melatonin was assayed by high-performance liquid chromatography (Waters, USA; pump 600 controller; 2487 Dual λ absorbance detector; 717 plus autosampler). A Merck column LiChrospher[®] RP-18 (5 μ m; 250 x 4 mm, Germany) was employed. The mobile phase consisted of acetonitrile/water (55:45). The total sample volume injected was 20 μ L and melatonin was detected at 229 nm (Schaffazick et al., 2006).

Free melatonin (non-associated) was determined in the ultrafiltrate after separation of the nanocapsules by ultrafiltration-centrifugation technique (Ultrafree-MC[®] 10,000 MW, Millipore), at 15,300 x g for 10 min. Total content of melatonin in the nanocapsule suspension

was determined using HPLC after dissolution by acetonitrile. The associated melatonin with the nanocapsules was calculated from the difference between the total and free drug concentrations determined in the nanocapsule suspension and in the ultrafiltrate, respectively (Schaffazick et al., 2005, 2006).

In vivo experiments

Melatonin (1mg/kg or 10 mg/kg) associated with polysorbate 80-coated nanocapsules or in aqueous solution was intraperitoneally administered to mice (n=6). Unloaded polysorbate 80-coated nanocapsules (without drug) and an aqueous solution containing 0.77 % (w/v) polysorbate 80 were used as controls. The experiments were conducted between 11.00 am and 3.00 pm. One hour after the administration, animals were decapitated and the brain regions (cortex cerebral and hippocampus), as well as the liver, were removed and instantaneously placed in liquid nitrogen and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until biochemical assays. At the day of measurements, the tissues were homogenized in ice-cold pH 7.4 phosphate buffer solution (100 mmol.L^{-1}) containing 140 mmol.L^{-1} KCl and 1 mmol.L^{-1} EDTA, using a Teflon-glass homogenizer. The homogenates were centrifuged (960 x g for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) and supernatants were used in the assays.

Assay of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was evaluated by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test (Buege and Aust, 1978). Aliquots of samples were incubated with 10 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and 0.67 % (w/v) thiobarbituric acid (TBA). The mixture was heated (30 min) on a boiling water bath. After, n-butanol was added and the mixture was centrifuged. The organic phase was collected to measure fluorescence at excitation and emission wavelengths of 515 and 553 nm, respectively, using a fluorescence spectrophotometer Hitachi F-2000 (Siqueira et al., 2005). 1,1,3,3-Tetramethoxypropane, which is converted to malondialdehyde (MDA), was used as standard.

Total antioxidant reactivity assay

The reaction mixture consisted of ABAP (2 mmol.L⁻¹) and luminol (6 mmol.L⁻¹) in glycine buffer. Total antioxidant reactivity (TAR) values were determined by assessing the initial decrease of luminescence calculated as the ratio I_0/I , where I_0 is the chemiluminescence (CL) in the absence of additives, and I is the CL after addition either of 20 nmol.L⁻¹ Trolox or of the samples (5 μ L) (Lissi et al., 1992, 1995). The CL generated was measured in a scintillation counter Beckman (Siqueira et al., 2005). Total antioxidant reactivity values were expressed as equivalents of Trolox concentration per mg of protein.

Free radical content

To assess the free radical contents we used 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as probe. An aliquot of the sample was incubated with DCFH-DA (100 μ M) at 37 °C for 30 min. The reaction was terminated by chilling the reaction mixture in ice. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 488 nm 525 nm, respectively (Driver et al., 2000; Sriram et al., 1997), using a fluorescence spectrophotometer Hitachi F-2000 (Siqueira et al., 2005). The free radical contents were quantified using a DCF standard curve and results were expressed as pmol of DCF formed per mg of protein. All procedures were performed in the dark, and blanks containing only DCFH-DA (no homogenate) were processed to determine the autofluorescence (Driver et al., 2000; Sriram et al., 1997).

Protein determination

The total protein concentration was determined using the method described by Lowry et al. (1951) with serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation. The statistical analysis of the data were carried out by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test when

appropriate. Analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software. A difference was considered significant when $p < 0.05$.

Results

The drug-loaded and drug-unloaded nanocapsule suspensions presented macroscopic homogeneous aspect, submicronic sizes, low polydispersity and negative zeta potentials (Table 1). TEM analysis carried out for the melatonin-loaded nanocapsules showed homogeneous spherical particles (Figure 1).

Figure 2 shows the lipid peroxidation in frontal cortex, hippocampus and liver, as well as the total antioxidant reactivity levels in the mice hippocampus after 1 hour of intraperitoneal administration of the melatonin-loaded nanocapsules and of the drug solution. According to ANOVA, significant effects ($p < 0.05$) of the type of the formulation (melatonin-loaded nanocapsules or drug solution) and melatonin doses were observed against lipid peroxidation in the frontal cortex. Moreover, there was a significant interaction between dose and formulation. The melatonin-loaded nanocapsules significantly decreased the lipid peroxidation in the frontal cortex when administered in doses of 1 and 10 mg/kg (Figure 2A). However, a significant effect of 10 mg/kg of melatonin-loaded nanocapsules against lipid peroxidation in the hippocampus was observed without any significant differences between formulation (Figure 2B). Furthermore, a significant effect of the formulation on the total antioxidant reactivity was observed. The melatonin-loaded nanocapsules administered in doses of 1 and 10 mg/kg significantly increased the total antioxidant reactivity in the hippocampus (Figure 2D).

Also, significant effects of the type of the formulation (melatonin-loaded nanocapsules or drug solution) and melatonin doses were observed against lipid peroxidation in the liver, whereas no significant effect of the interaction between formulation and dose was verified. The melatonin-loaded nanocapsules significantly decreased the lipid peroxidation in the liver when administered in the dose of 10 mg/kg (Figure 2C).

Discussion

The nanocapsule suspensions presented a spherical shape (Figure 1) with particle mean sizes lower than 300 nm. These values are in agreement with the diameters usually observed for nanocapsules prepared with preformed polymers using the interfacial deposition method (100 nm to 500 nm) (Couvreur et al., 2002). The low polydispersity indicates homogeneous particle distribution for the nanocapsules and zeta potentials were negative (-33 mV, -35 mV); it is important to note that values higher than 30 mV (positive or negative) lead to more stable nanocapsule suspensions due to the repulsion between particles reducing their aggregation (Couvreur et al., 2002). The total content of the melatonin was near 100 % and the associated melatonin was 50 %, in good agreement with our previous papers (Schaffazick et al., 2005, 2006).

It was observed that the lipid peroxidation has significantly decreased in the cortex and in the hippocampus when melatonin-loaded nanocapsules were administered in a single dose of 10 mg/kg (Figure 2 A,B). On the contrary, melatonin aqueous solution did not present any significant activity against lipid peroxidation in these tissues, in doses studied. In the cortex, the dose of 1 mg/kg was also effective in the case of melatonin associated with nanocapsules. Present results suggest that the lipids in the cortex and hippocampus were partially protected by melatonin-loaded polysorbate 80-coated nanocapsules probably due to the higher accumulation of the drug in this tissues compared to the drug solution, in function of the nanocapsule targeting to the brain. The fact is that melatonin easily crosses morphological barriers and it readily enters any cell, compartment or body fluid, including the BBB due to its small molecular weight and amphiphilic nature (highly lipophilic and somewhat soluble in aqueous media) (Karbownik et al., 2001; Hardeland et al., 2006). Therefore, melatonin is widely distributed within organisms, being presumably, present in all subcellular compartments since it has been found in the cytosol, nucleus, cellular membranes and in

mitochondria (Karbownik et al., 2001). According to the results presented here, the melatonin-loaded polysorbate-80 coated Eudragit[®] S100-nanocapsules probably promoted more specific biodistribution of the melatonin in the brain compared to the drug solution. However, the mechanism behind the translocation of polymeric nanoparticles into the brain remains not fully understood (Garcia-Garcia et al., 2005a).

Tröster et al. (1990) showed that when polysorbate 80 is used as coating for poly(methyl methacrylate) nanoparticles it effectively increased the brain levels of nanoparticles. Polysorbate 80 is only effective in increasing MRZ 2/576 anticonvulsive activity when used as coating material on MRZ 2/576-loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles (Friese et al., 2000). According to Sun et al. (2004) a partial coverage was enough for polysorbate 80 coating to play a specific role in the brain targeting and it seemed that the brain targeting of poly(lactic acid) nanoparticles was related to the interaction between the polysorbate 80 coating and the brain micro-vessel endothelial cells. Polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles have also significantly improved the methotrexate level in brain tissues and cerebrospinal fluids compared to uncoated nanoparticles and simple drug solution (Gao and Jiang, 2006). Several possibilities have been proposed to explain the mechanism of the nanoparticle-mediated drug transport to the brain and all these mechanisms could also work in different combinations of the following factors: a) the binding of nanoparticles to the inner endothelial lining of the brain capillaries could provide a drug concentration gradient, thus improving passive diffusion (Garcia-Garcia 2005a; Kreuter, 2005); b) a general surfactant effect characterized by a dissolution of the endothelial cell membrane lipids that would lead to membrane fluidisation and to an enhanced drug permeability through the BBB; c) the nanoparticles could open the tight junctions between the endothelial cells; d) the nanoparticles could be endocytosed by the endothelial cells or transcytosed through the endothelial cell layer (Kreuter et al., 2001; Kreuter, 2005); e) the polysorbate 80 could act as

an anchor between nanoparticles and apolipoproteins (APO-B and APO-E) which are able to interact with LDL-receptor, then being taken up via receptor-mediated endocytosis (Garcia-Garcia 2005a); f) the polysorbate 80 used as the coating agent could inhibit the efflux system, specially P-glycoprotein (Kreuter et al., 2001; Kreuter, 2005).

A significant effect against lipid peroxidation in the liver was observed after the administration of the melatonin-loaded nanocapsules (10 mg/kg) on the contrary to the drug solution. This result indicated that the nanocapsules were also partially taken up by the macrophages of the liver, generating higher melatonin concentration in the liver as compared to the drug solution.

In the literature, the treatments with melatonin solutions have been effective against lipid peroxidation under different oxidative stress conditions in the cerebral cortex (Baydas et al., 2003; Esparza et al., 2005; Baydas and Tuzcu, 2005; Baydas et al., 2005) and in the hippocampus (Acuña-Castroviejo, 1997; Carneiro and Reiter, 1998; Baydas et al., 2003; Baydas and Tuzcu, 2005; Baydas et al., 2005), as well as in the liver (Wang et al., 2005; Rezzani et al., 2005; Contuk et al., 2005; Túnez et al., 2005; Sigala et al., 2006). Therefore, the targeting of melatonin to the brain and to the liver can be potentially useful to improve the treatments with the drug against oxidative damage of those tissues.

The partial encapsulation of melatonin within the nanocapsules (50 %) was able to improve the *in vivo* antioxidant capacity of this drug against lipid peroxidation in the brain and in the liver, using a single dose. The lipids of the hippocampus were significantly protected in 37% by the administration of 10 mg/kg melatonin-loaded nanocapsules in comparison to the control, while in the frontal cortex the protection was 42 and 40%, respectively, for 1 mg/kg and 10 mg/kg melatonin-loaded nanocapsules (Figure 2A,B). In the liver, the lipids were significantly protected in 25 % after the administration of 10 mg/kg melatonin-loaded nanocapsules if compared to the control (Figure 2C).

In our previous works about the *in vitro* lipid peroxidation induced by the free radical ascorbyl (Schaffazick et al., 2005), the lipids were protected depending on the melatonin dose, on the type of the lipid substrate (phosphatidylcholine liposomes or liver microsomes) and on the type of drug formulations. When the microsomes and melatonin dose of 400 μ M were used, only the formulations containing polymer [polysorbate 80-coated nanocapsules (36 ± 3 %) and polysorbate 80-coated nanospheres (40 ± 7 %)] showed significant increase in the melatonin protection against lipid peroxidation, in comparison with the drug solution (16 ± 1 %), whereas the polysorbate 80-coated nanoemulsion (without polymer) presented protection (19 ± 2 %) similar to the drug solution. According to Palumbo et al. (2002), the polymeric nanostructures could adhere to the cells improving an antioxidant action of a lipophilic drug associated (idebenone) with polysorbate 80-coated poly(ethyl 2-cyanoacrylate) nanocapsules.

In this way, the *in vivo* results confirmed the increase in the antioxidant effect of the melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation previously observed in the *in vitro* experiments (Schaffazick et al., 2005). In addition, only the melatonin-loaded nanocapsules caused a significant improve in the total antioxidant reactivity in the hippocampus (1mg/kg: 21 %; 10 mg/kg: 32 %, Figure 2D) compared to the control.

On the other hand, drug solution or nanoencapsulated melatonin administered in a single acute dose (1mg/kg or 10 mg/kg) did not significantly ($p < 0.05$) affect the free radical levels in the frontal cortex, hippocampus and liver, as well as the total antioxidant reactivity in the frontal cortex and in the liver in comparison with the controls (data not shown).

Conclusion

We observed that a single administration of 10 mg/kg melatonin-loaded nanocapsules showed a significant antioxidant activity against lipid peroxidation in mice brain and liver, as compared to the drug solution. To our knowledge, this is the first demonstration of the potential use of in vivo melatonin-loaded polymeric nanocapsules against lipid peroxidation. Hence, the polymeric nanocapsules can be a promising technological platform for the melatonin delivery to the brain and/or to the liver due to the potential application of the melatonin-loaded polymeric nanocapsules in reducing the oxidative damage.

ACKNOWLEDGEMENTS:

Authors acknowledge the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Rede Nanobiotec- CNPq/MCT-Brazil, Programa dos Núcleos de Excelência (PRONEX) and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS).

REFERENCES

- Allémann, E., Leroux, J-C., Gurny, R., 1998. Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 34, 171-189.
- Acuña-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Monti, M.G., Ortiz, G.G., Reiter, R.J., 1997. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sciences* 60(2), 23-29.
- Barrenetxe, J., Delagrange, P., Martínez, J.A., 2004. Physiological and metabolic functions of melatonin. *Journal of Physiology and Biochemistry* 60(1), 61-72.
- Baydas, G., Kutlu, S., Naziroglu, M., Canpolat, S., Sandal, S., Ozcan, M., Kelestimur, H., 2003. Inhibitory effects of melatonin on neural lipid peroxidation induced by intracerebroventricularly administered homocysteine. *Journal of Pineal Research* 34, 36-39.
- Baydas, G., Tuzcu, M., 2005. Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. *Experimental Neurology* 194, 175-181.
- Baydas, G., Yasar, A., Tuzcu, M. 2005. Comparison of the impact of melatonin on chronic ethanol-induced learning and memory impairment between young and aged rats. *Journal of Pineal Research* 39, 346-352.
- Boutin, J.A., Audinot, V., Ferry, G., Delagrange, P., 2005. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 26, 412-419.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52, 302-310.
- Calvo, P., Gouritin, B., Chacun, H., Desmaële, D., D'Angelo, J., Noel, J-P., Georjgin, D., Fatal, E., Andreux, J.P., Couvreur, P., 2001. Long-circulation PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharmaceutical Research* 18(8), 1157-1166.

- Carneiro, R.C.G., Reiter, R.J., 1998. Melatonin protects against lipid peroxidation induced by δ -aminolevulinic acid in rat cerebellum, cortex and hippocampus. *Neuroscience* 82(1), 293-299.
- Contuk, G., Ercan, F., Çetinel, S., Çikler E., Sener, G., 2005. Role of melatonin in reducing water avoidance stress-induced degeneration of the liver. *Digestive Diseases and Sciences* 50(4), 738-744.
- Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P., Vauthier, C., 2002. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System* 19(2), 99-134.
- Driver, A.S., Kodavanti, P.R.S., Mundy, W.R., 2000. Age-related in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicology and Teratology* 22, 175-181.
- Epstein, F.H., 1997. Mechanisms of Disease- Melatonin in Humans. *The New England Journal of Medicine* 336, 186-195.
- Esparza, J.L., Gómez, M., Nogués, M.R., Paternain, L., Mallol, J., Domingo, J.L., 2005. Melatonin reduces oxidative stress and increases gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of aluminum-exposed rats. *Journal of Pineal Research* 39, 129-136.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J-P., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55, r1-r4.
- Friese, A., Seiller, E., Quack, G., Lorenz, B., Kreuter, J., 2000. Increase of the duration of the anticonvulsive activity of a novel NMDA receptor antagonist using poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles as a parenteral controlled release system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 49, 103-109.

Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S., Couvreur, P., 2005a. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? *International Journal of Pharmaceutics* 298, 274-292.

Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S., Kim, H. R., Doan, T.L., Desmaële, D., d'Angelo, J., Taran, F., Georgin, D., Couvreur, P., 2005b. A methodology to study intracellular distribution of nanoparticles in brain endothelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 298, 310-314.

Gao, K., Jiang, X., 2006. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 310, 213-219.

Gelperina, S.E., Khalansky, A.S., Skidan, I.N., Smirnova, Z.S., Bobruskin, A.I., Severin, S.E., Turowski, B., Zanella, F.E., Kreuter, J., 2002. Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma. *Toxicology Letters* 126, 131-141.

Gulyaev, A.E., Gelperina, S.E., Skidan, I.N., Antropov, A.S., Kivman, G.Ya., Kreuter, J., 1999. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 16(10), 1564-1569.

Guterres, S.S., Muller, C.R., Michalowski, C.B., Pohlmann, A.R., Dalla Costa, T., 2001. Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *S.T.P. Pharma Science* 11, 229-233.

Hardeland, R., Pandi-Perumal, S.R., Cardinali, D.P., 2006. Molecules in focus. The *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38, 313-316.

Karbownik, M., Lewinski, A., Reiter, R.J., 2001. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative process: comparison with other antioxidants. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33, 735-753.

Kreuter, J., Petrov, V.E., Kharkevich, D.A., Alyautdin, R.N., 1997. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 49, 81-87.

Kreuter, J., 2001. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, 65-81.

Kreuter, J., Ränge, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S.E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., von Briesen, H., Begley, D.J., 2003. Direct Evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 20(3), 409-416.

Kreuter J., 2005. Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *International Congress Series* 1277, 85-94.

Lissi, E., Pascual, C., del Castillo, M.D., 1992. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radical Research Communications* 17, 299-311.

Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., del Castillo, M.D., 1995. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 153-158.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

Olivier, J-C., Fenart, L., Chauvet, R., Pariat, C., Cecchelli, R., Couet, W., 1999. Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate-80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. *Pharmaceutical Research* 16(12), 1836-1842.

Palumbo, M., Russo, A., Cardile, V., Renis, M., Paolino, D., Puglisi, G., Fresta, M., 2002. Improved antioxidant effect of idebenone-loaded polyethyl-2cyanoacrylate nanocapsules tested on human fibroblasts. *Pharmaceutical Research* 19, 71-78.

Pohlmann, A.R., Weiss, V., Mertins, O., Pesce da Silveira, N., Guterres, S.S., 2002. Spray-dried indometacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 16, 305-312.

Reiter, R. J., Oh, C-S., Fujimori, O., 1996. Melatonin: Its intracellular and genomic actions. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 7, 22-27.

Reiter, R.J., Tang, L., Garcia, J.J, Muñoz-Hoyos, A., 1997. Pharmacological Actions of Melatonin in Oxygen Radical Pathophysiology. *Life Sciences* 60, 2255-2271.

Reiter, R.J., 1998. Oxidative damage in the cerebral nervous system: Protection by melatonin. *Progress in Neurobiology* 56, 359-384.

Reiter, R.J., Tan, D-X., 2002. Burkhardt S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mechanisms of Ageing and Development* 123, 1007-1019.

Reiter, R.J., 2003. Melatonin: clinical relevance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 17, 273-85.

Rezzani, R., Buffoli, B., Rodella, L., Stacchiotti, A., Bianchi, R., 2005. Protective role of melatonin in cyclosporine A-induced oxidative stress in rat liver. *International Immunopharmacology* 5, 1397-1405.

Sahoo, S.K., Labhasetwar, V., 2003. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery today* 8, 1112-1120.

Schaffazick, S.R., Guterres, S.S., Lucca-Freitas, L., Pohlmann, A.R., 2003a. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova* 26, 726-737.

Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R., Dalla-Costa, T., Guterres, S.S., 2003b. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 56, 501-505.

Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R., de Cordova, C.A.S., Creczynski-Pasa, T.B., Guterres, S.S., 2005. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. *International Journal of Pharmaceutics* 289, 209-213.

Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R., Mezzalana, G., Guterres, S.S., 2006. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17(3), 562-569.

Schröder, U., Sabel, B.A., 1996. Nanoparticles, a drug carrier system to pass the blood-brain barrier, permit central analgesic effects of i.v. dalargin injections. *Brain Research* 710, 121-124.

Schroeder, U., Schroeder, H., Sabel, B.A., 2000. Body distribution of ³H-labelled dalargin bound to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after i.v. injections to mice. *Life Sciences* 66(6), 495-502.

Sigala, F., Theocharis, S., Sigalas, K., Markantonis-Kyroudis, S., Papalabros, E., Triantafyllou, A., Kostopanagiotou, G., Andreadou, I., 2006. Therapeutic value of melatonin in an experimental model of liver injury and regeneration. *Journal of Pineal Research* 40, 270-279.

Shea, T.B., Ortiz, D., Nicolosi, R.J., Kumar, R., Watterson, A.C., 2005. Nanosphere-mediated delivery of vitamin E increases its efficacy against oxidative stress resulting from exposure to amyloid beta. *Journal of Alzheimer's Disease* 7, 297-301.

Siqueira, I.R., Fochesatto, C., da Silva Torres, I.L., Dalmaz, C., Netto, C.A., 2005. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. *Life Sciences* 78, 271-278.

Sriram, K., Pai, K.S., Boyd, M.R., Ravindranath, V., 1997. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Research* 749, 44-52.

Sun, W., Xie, C., Wang, H., Hu, Y., 2004. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. *Biomaterials* 25, 3065-3071.

Teixeira, M., Alonso, M.J., Pinto, M.M.M., Barbosa, C.M., 2005. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 59, 491-500.

Tröster, S.D., Müller, U., Kreuter, J., 1990. Modification on the body distribution of poly(methylmethacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*, 61, 85-100.

Túnez, I., Muñoz, M. C. Villavicencio, M. A., Medina, F. J., de Prado, E. P., Espejo, I., Barcos, M., Salcedo, M., Feijóo, M., Montilla, P., 2005. Hepato- and Neurotoxicity by Thiocetamide: Protective Effects of Melatonin and Dimethylsulfoxide. *Pharmacological Research* 52, 223-228.

Wang, H., Wei, W., Wang, N-P., Gui, S-Y., Wu, L., Sun, W-Y., Xu, S-Y., 2005. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sciences* 77, 1902-1915.

Legends

Table 1. Physicochemical characterization of the polysorbate 80-coated Eudragit S100[®] nanocapsule suspensions.

Figure 1. Transmission electron microscopy images of melatonin-loaded polysorbate 80-coated Eudragit S100[®]- nanocapsules [bar = 200 nm (150,000 X), 100 nm (250,000 X), respectively].

Figure 2. Antioxidant effect of melatonin-loaded nanocapsules or melatonin solution against lipid peroxidation (A, B and C) and the total antioxidant reactivity (D), after 1 hour of intraperitoneal administration in mice.

Table 1. Physicochemical characterization of the polysorbate 80-coated Eudragit S100[®] nanocapsule suspensions.

Formulation	Total content of melatonin (mg/mL)	Associated melatonin (%)	Diameter (nm) [PI*]	Zeta potential (mV)	pH
Nanocapsules containing melatonin	0.996	50.0	241 ± 55 [0.01]	-33 ± 0.3	4.2
Nanocapsules without melatonin	-	-	211 ± 6 [0.24]	-35 ± 1.1	4.3

* PI: polydispersity index.

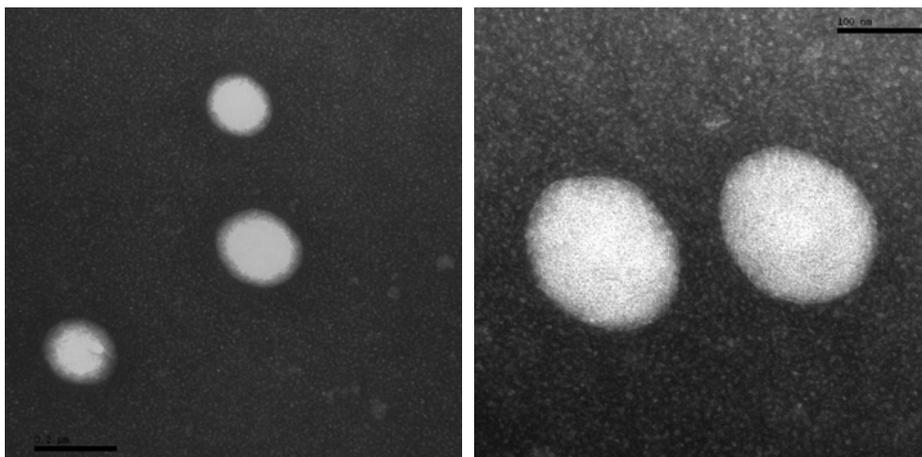
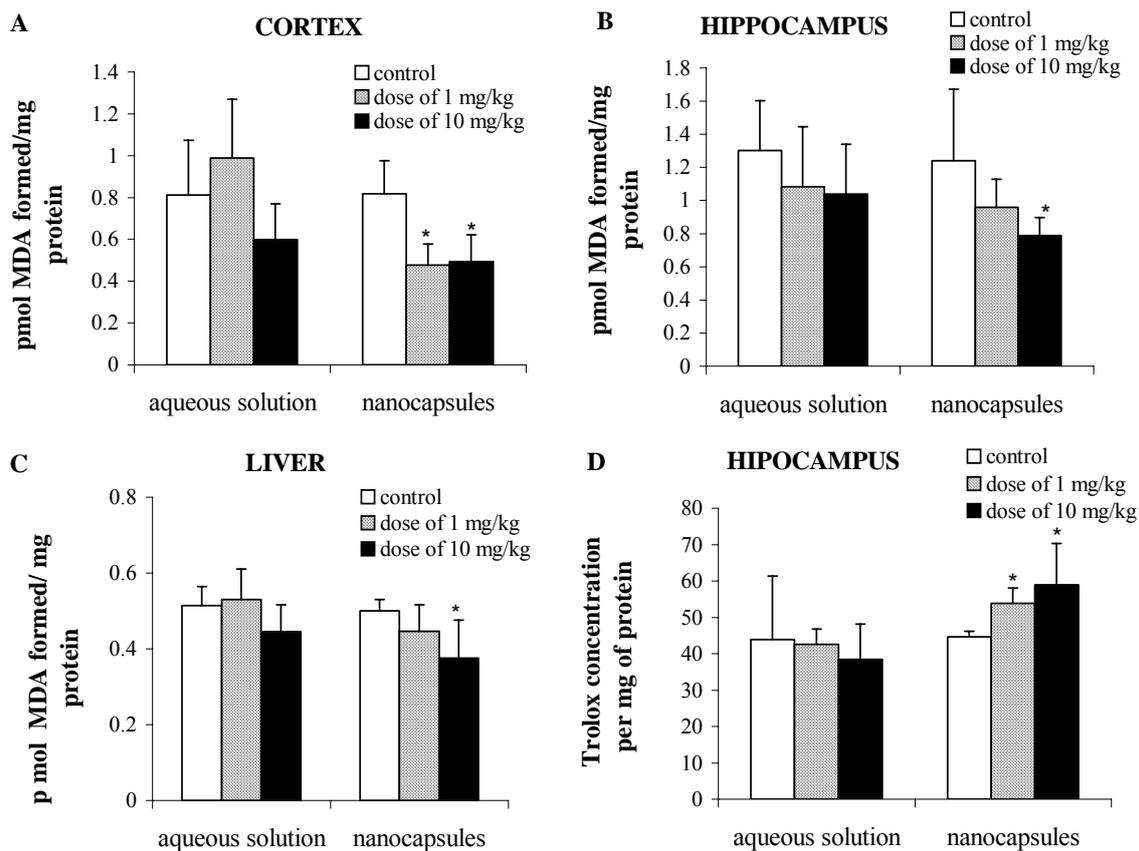


Figure 1. Transmission electron microscopy images of melatonin-loaded Eudragit S100[®]-nanocapsules [bar = 200 nm (150,000 X), 100 nm (250,000 X), respectively].



* Represents significantly different values ($p < 0.5$) from those of control group as determined by ANOVA followed by Tukey's test. The results are expressed as mean \pm standard deviation.

Figure 2. Antioxidant effect of melatonin-loaded nanocapsules or melatonin solution against lipid peroxidation (A, B and C) and the total antioxidant reactivity (D), after 1 hour of intraperitoneal administration in mice.

DISCUSSÃO GERAL

A nanobiotecnologia tem emergido rapidamente como uma importante área de pesquisa com potencial aplicação, tanto em diagnóstico quanto em terapêutica. Além disto, espera-se também que possa acelerar pesquisas biomédicas fundamentais (CHAN, 2006) e tem sido proposta como uma estratégia para a administração, a liberação e a vetorização de fármacos a sítios específicos de ação.

A utilização das nanopartículas poliméricas (nanocápsulas ou nanoesferas), como sistemas de liberação de fármacos, apresenta vantagens resultantes de duas das suas principais características básicas: a) o tamanho reduzido, permitindo que penetrem através de pequenos capilares e que sejam capturadas por células, atravessando, portanto, certas barreiras biológicas, o que resulta em acumulação no sítio alvo de ação; b) a versatilidade dos sistemas, nos quais diversos agentes terapêuticos podem ser encapsulados, dispersos ou dissolvidos. Adicionalmente, conforme as condições de preparação (método e composição), sistemas com diferentes propriedades e características de liberação do fármaco associado podem ser desenvolvidos, inclusive propiciando sua cedência sustentada no sítio de ação (SAHOO and LABHASETWAR, 2003; FAHMY *et al.*, 2005). Em síntese, as vantagens das aplicações destes sistemas vão desde a vetorização de fármacos a alvos específicos, após administração parenteral, até a veiculação de fármacos visando à administração oral, ocular ou tópica (LEGRAND *et al.*, 1999; BARRAT *et al.*, 2000; COUVREUR *et al.*, 2002; LBOUTOUNNE *et al.*, 2002).

Em função desta promissora estratégia de veiculação de fármacos, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de suspensões de nanopartículas poliméricas contendo melatonina, um neuro-hormônio que está sendo extensivamente pesquisado, visando inúmeras aplicações terapêuticas, principalmente em função de seu potente efeito antioxidante (REITER *et al.* 1997; BEYER *et al.*, 1998; REITER *et al.*, 2003). A associação entre melatonina e nanocarreadores poliméricos foi proposta como tema desta tese uma vez que não existiam relatos científicos a este respeito, sendo, portanto, de interesse avaliar as vantagens desta associação.

A etapa inicial do trabalho (Capítulo 2) foi dedicada à avaliação preliminar da composição qualitativa das formulações, uma vez que este parâmetro pode influenciar nas características físico-químicas dos sistemas obtidos (MOSQUEIRA *et al.*, 2000;

SCHAFFAZICK *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a). Os resultados demonstraram que foi possível obter-se sistemas nanoestruturados contendo melatonina, sejam eles nanocápsulas, nanoesferas ou nanoemulsão, homogêneos, através de deposição interfacial, nanoprecipitação ou emulsificação espontânea, respectivamente. De uma forma geral, os sistemas apresentaram teores de melatonina próximos aos teóricos, diâmetros inferiores a 300 nm e encapsulação parcial do fármaco. A eficiência de associação das formulações manteve-se entre 31 e 56 %, dependendo da composição da formulação e das condições utilizadas para a determinação comparativa da quantidade de fármaco livre (ultrafiltração-centrifugação a 15.300 x g/10 min). A taxa de associação da melatonina representou a sua partição entre os nanocarreadores e a fase aquosa externa.

Foram avaliadas as influências do tipo de óleo, de tensoativos e de polímero sobre as características físico-químicas das suspensões obtidas. A natureza do polímero foi o parâmetro de maior influência quanto à taxa de encapsulação da melatonina. Quando as nanopartículas foram preparadas com derivados polimetacrilatos (Eudragit[®] S100 e RS100[®]) a taxa de associação foi mais elevada em relação aos poliésteres [poli(ϵ -caprolactona) e poli(lactídeo)], refletindo diferentes afinidades da melatonina por estes materiais. Estes resultados, aliados às menores eficiências de associação do fármaco à nanoemulsão (Capítulos 2 e 3), sugerem que a adsorção da melatonina ao polímero constituinte das nanocápsulas é um provável mecanismo de associação do fármaco a estes sistemas.

As nanocápsulas de Eudragit S100[®], as quais apresentaram taxas de associação mais elevadas, foram selecionadas para estudos posteriores de secagem por aspersão, com o objetivo de avaliar a possibilidade de preparar pós de nanocápsulas contendo melatonina, bem como estudar a capacidade destes sistemas em controlar a liberação do fármaco e aumentar a estabilidade física das suspensões (Capítulo 2). Conforme os resultados, foi possível a obtenção de pós, a partir desta suspensão de nanocápsulas de Eudragit S100[®], com rendimento satisfatório e com relativamente estreita distribuição de tamanho de partículas. A análise microscópica dos pós evidenciou a presença das nanoestruturas esféricas adsorvidas às micropartículas de dióxido de silício coloidal,

com tamanho e morfologia semelhantes às partículas em suspensão que lhes deram origem. Adicionalmente, os pós de nanocápsulas apresentaram estabilidade física macro e microscópica, durante 1 ano de armazenamento, ao passo que as suspensões apresentaram agregação e precipitação das partículas já após 3,5 meses. O dióxido de silício coloidal, na proporção 3 % (m/V), e as condições de secagem empregadas foram selecionados tomando-se como base os trabalhos anteriores do grupo, em que nanopartículas contendo fármacos antiinflamatórios não-esteróides foram secas por aspersão (MÜLLER *et al.*, 2000; POHLMANN *et al.*, 2002; MULLER, 2003).

O alto teor de melatonina obtido nas micropartículas nanorrevestidas (eficiência de associação= 93 %) é devido, provavelmente, à adsorção da fração de melatonina não-associada (44 %), presente na suspensão de origem, ao polímero e/ou às partículas de dióxido de silício. Estas partículas diminuíram a velocidade de dissolução da melatonina em tampão fosfato pH 7,4, comparativamente ao fármaco puro, sendo o modelo monoexponencial o que melhor descreveu os dados experimentais. De acordo com a lei das potências, o mecanismo de liberação sugerido foi baseado em inchamento, relaxação e dissolução do polímero.

Cabe ressaltar que, no decorrer da tese, foram utilizados dois sistemas cromatográficos diferentes para a quantificação da melatonina em função de disponibilidade de equipamento, sendo ambos validados. O método que utilizou o cromatógrafo Perkin Elmer (detector UV/Vis, bomba e auto-injetor S200; coluna Waters Nova-Pak[®] C₁₈) apresentou linearidade ($R^2= 0,9995$: concentrações 5,0, 7,5, 10,0, 12,5 e 15,0 µg/mL), exatidão (média para as concentrações 6,0, 9,0 ou 12,0 µg/mL = 99 a 103,6 %) e precisão [intra-dia: desvio padrão relativo (DPR) = 0,76 a 2,53 %; inter-dia: DPR= 1,39 a 2,06 %]. O sistema que utilizou o cromatógrafo Waters (bomba 600 controller; detector 2487 Dual λ; 717 plus auto-injetor; coluna de fase reversa C₁₈ Merck - LiChrospher[®] RP-18, 5µm, 250 x 4 mm) também apresentou linearidade ($R^2= 0,9998$: concentrações 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0 e 17,5 µg/mL), além de exatidão (recuperação média para as 3 concentrações 7,5, 10,0 ou 12,5 µg/mL = 100,7 a 102,8 %) e precisão [intra-dia: DPR = 1,4 % a 1,8 %; inter-dia: DPR= 3,1 %], no caso de suspensão de nanocápsulas. Em relação às micropartículas

nanorrevestidas, o método apresentou-se também exato (recuperação média para as concentrações 7,0, 9,0 ou 11,0 µg/mL = 97 a 102 %) e preciso [intra-dia: DPR = 0,71 a 1,5 %; inter-dia: DPR= 2,1 %).

Na segunda etapa do trabalho (Capítulo 3), a concentração de fármaco foi aumentada de 0,5 mg/mL para 1,5 mg/mL e a estabilidade físico-química das suspensões de nanocápsulas foi avaliada à temperatura ambiente, com proteção ou não da luz natural, ou à temperatura de 50 °C com proteção da luz natural. Verificou-se que as taxas de encapsulação permaneceram entre 38 % e 50 %, semelhantes às formulações contendo menor concentração de fármaco, indicando que o equilíbrio entre melatonina livre e associada não foi alterado pela concentração total de melatonina adicionada à formulação. Além disto, as formulações preparadas com Eudragit S100[®] e Eudragit RS 100[®] foram estáveis após 30 dias, em relação aos teores totais de fármaco, às taxas de associação e aos diâmetros médios de partícula. Após 60 dias, entretanto, observou-se uma diminuição significativa no teor de melatonina, sendo levemente acelerada pela luz natural e pela temperatura. As suspensões preparadas com poli(ε-caprolactona) apresentaram maior estabilidade em relação ao teor total de melatonina, com diminuição significativa do teor de fármaco somente após 3 meses de armazenamento.

Através do estudo comparativo com nanoemulsão e nanodispersão dos tensoativos, verificou-se que a presença do polímero (nanocápsulas) foi importante para retardar a diminuição no teor total de melatonina em 1 mês [Eudragit S[®], Eudragit RS[®] ou poli(ε-caprolactona)], quando as formulações foram armazenadas a 50 °C, e em 1 mês [Eudragit S[®], Eudragit RS[®]] ou 2 meses [poli(ε-caprolactona)] quando armazenadas na presença luz. Em relação às formulações armazenadas à temperatura ambiente, a presença de poli(ε-caprolactona) retardou em 1 mês a diminuição do teor total do fármaco. TURSILLI e colaboradores (2006) evidenciaram que a composição de sistemas microparticulados lipídicos foi decisiva para aumentar ou não a foto-estabilidade da melatonina. No presente trabalho, apesar da taxa de encapsulação parcial, a composição dos sistemas também influenciou a diminuição do teor de melatonina, até 3 meses de armazenamento das formulações.

O próximo passo do trabalho (Capítulo 4) foi comparar as características físico-químicas de nanocápsulas contendo melatonina obtidas através de dois métodos com princípios de formação das partículas diferentes, baseados em polímeros pré-formados. A comparação entre métodos é importante, uma vez que pode gerar conhecimentos que permitam a modulação das características físico-químicas das partículas, como a morfologia, a estrutura interna, a taxa de associação do fármaco, e, conseqüentemente, a cinética de liberação do fármaco pode ser modulada, através de um carreador planejado para determinado sítio de ação (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Desta forma, foram comparadas formulações preparadas com diferentes tipos de óleo e de tensoativos, obtidas através de deposição interfacial ou de emulsificação-difusão, utilizando o Eudragit RS100[®] como modelo de polímero para o estudo, utilizando um delineamento fatorial do tipo 2³. As análises dos resultados demonstraram que as partículas apresentaram diâmetros médios entre 124 e 306 nm e potenciais zeta positivos (+ 21 ± 1 mV a + 52 ± 2 mV), condizentes com a característica policatiônica do polímero. A taxa de associação da melatonina (42 a 47 %) não foi influenciada pela composição da formulação e nem pelo método de preparação empregado, reforçando, então, a hipótese de que o mecanismo preferencial de associação da melatonina às nanocápsulas é por adsorção ao polímero.

Por outro lado, para os componentes e as condições empregadas neste estudo, os diâmetros médios e as polidispersões das partículas foram influenciados pelo método de preparação empregado, sendo maiores para o método de emulsificação-difusão. Os resultados sugeriram, então, diferenças na estruturação das partículas formadas, provavelmente em função dos distintos mecanismos de formação das mesmas. De fato, o método de deposição interfacial é baseado na rápida e espontânea difusão de um solvente miscível em água, e, por sua vez, o método de emulsificação-difusão é baseado na formação de uma emulsão prévia O/A entre solventes parcialmente miscíveis, seguida da difusão provocada pela diluição da emulsão com excesso de água. O método de emulsificação-difusão e a sua combinação com os tensoativos Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®] aumentaram o diâmetro médio das partículas em comparação ao método de deposição interfacial e aos tensoativos Tween 80[®] e Span 80[®], respectivamente. Os valores positivos de potencial zeta das

nanocápsulas de Eudragit RS100[®] também foram aumentados pelo método de emulsificação-difusão, o óleo Eutanol G[®] e o conjunto de tensoativos Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®].

Um estudo de estabilidade também foi realizado, demonstrando que as formulações não apresentaram alterações significativas nos teores de melatonina após 30 dias de armazenamento. Após 60 dias, as formulações preparadas com Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®] tiveram uma maior redução média no teor de fármaco. Estes resultados estão de acordo com aqueles observados no Capítulo 3, uma vez que as suspensões de nanocápsulas foram estáveis após 30 dias de armazenamento e que a composição dos sistemas pode influenciar a diminuição do teor de melatonina. A taxa de encapsulação não foi alterada significativamente durante os 60 dias do estudo. Os diâmetros médios de partículas permaneceram estáveis para a maioria das suspensões, durante dois meses, entretanto, a polidispersão tendeu a aumentar após este período. Outra informação importante, obtida nesta etapa, foi a possível presença de fármaco adsorvido externamente ao polímero, sugerido por diferenças de potenciais zeta entre as formulações preparadas com e sem fármaco. Além disto, a presença do fármaco adsorvido parece ter aumentado a estabilidade física das nanopartículas preparadas através do método de emulsificação-difusão.

Cabe ressaltar que o trabalho foi desenvolvido no sentido de se testar diferentes fatores que poderiam influenciar a taxa de associação da melatonina, como a composição qualitativa (4 tipos de polímeros, 3 tipos de óleos e 5 tipos de tensoativos), a concentração de melatonina (0,5 mg/mL a 1,5 mg/mL), além do método de preparação, objetivando-se sempre testar a viabilidade das formulações e o aumento da eficiência de encapsulação do fármaco para os estudos posteriores.

Desta forma, após o desenvolvimento tecnológico das nanopartículas poliméricas contendo melatonina, entendeu-se necessário avaliar a aplicabilidade destes sistemas. Num primeiro momento (Capítulo 5), estudos *in vitro* foram realizados objetivando-se verificar se a encapsulação parcial da melatonina seria capaz de aumentar a sua atividade antioxidante contra a lipoperoxidação, uma vez que os sistemas nanoparticulados podem fornecer esta vantagem (PALUMBO *et al.*, 2002).

Experimentos de lipoperoxidação de microsomas hepáticos e de lipossomas de fosfatidilcolina, induzidos pelo radical ascorbila, foram realizados. Nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas) preparadas com Eudragit S100[®] foram selecionadas para o estudo, com base na maior eficiência de associação do fármaco. Nanoemulsão também foi testada para verificar a influência da presença do polímero. De acordo com os resultados, a presença da melatonina foi capaz de proteger os lipídios de 8 a 51%, em comparação aos controles, com influência da formulação, de maneira dose-dependente e modelo de membrana-dependente. Quando lipossomas foram usados como modelo de membrana e a dose da melatonina foi 400 μM , a associação da melatonina a todos os tipos de sistemas nanocarreadores aumentou significativamente o seu efeito protetor, comparativamente à solução do fármaco. Por outro lado, no caso da membrana biológica (microsoma), conseqüentemente mais complexa, um aumento na proteção dos lipídios foi alcançado apenas com a associação da melatonina a carreadores poliméricos (nanocápsulas e nanoesferas), relativamente à solução e à nanoemulsão. Segundo PALUMBO e colaboradores (2002), nanocápsulas poliméricas poderiam aumentar o efeito antioxidante do fármaco lipofílico associado (idebenona) em função de promoverem uma maior aderência às células, que, em nosso caso, foram simuladas pelos microsomas ou lipossomas. Tomando como base estes resultados, é possível levantar a hipótese de que as nanopartículas poliméricas sejam capazes de interagir com membranas, contribuindo para o efeito estabilizante de membrana da melatonina (REITER, 1998). Evidentemente, estudos direcionados seriam necessários para a comprovação ou não desta proposição.

Finalmente, o trabalho evoluiu, então, no sentido de avaliar se o aumento do efeito protetor da melatonina associada às nanopartículas poliméricas, observado *in vitro* contra lipoperoxidação, poderia ser observado também *in vivo* (Capítulo 6). Para este estudo, nanocápsulas de Eudragit S100[®] revestidas com polissorbatato 80 foram administradas, intraperitonealmente, em camundongos saudáveis e o efeito antioxidante agudo da melatonina foi avaliado no cérebro (córtex frontal e hipocampo) e no fígado.

No planejamento do experimento *in vivo*, apostou-se na capacidade que os sistemas nanoparticulados poliméricos, revestidos com polissorbatato 80, apresentam de

promover acumulação de fármacos no SNC (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2005). Buscou-se, portanto, uma liberação possivelmente mais controlada da melatonina aos tecidos cerebrais, o que poderia ser interessante considerando-se as suas potenciais aplicações neuroprotetoras.

Conforme os resultados, a administração de uma única dose de melatonina foi capaz de reduzir significativamente a lipoperoxidação no córtex (1 mg/kg ou 10 mg/kg) e no hipocampo (10 mg/kg), quando a mesma foi associada às nanocápsulas, ao passo que, a solução do fármaco não apresentou efeito significativo. Estes resultados *in vivo* sugeriram, então, que o aumento no efeito antioxidante da melatonina foi resultante, provavelmente, do aumento da concentração local da melatonina e, por conseqüência, uma maior efetividade de ação foi verificada, corroborando, assim, com a hipótese de trabalho.

O fato de que apenas com a administração das nanocápsulas contendo melatonina (10 mg/kg) foi observada redução da lipoperoxidação no fígado, concluiu-se que houve também maior acumulação de melatonina neste órgão, em relação à solução do fármaco, situação bastante provável em função da natural captura dos sistemas nanoparticulados pelo sistema fagocitário mononuclear. Apesar da presença de moléculas hidrofílicas na superfície (polissorbato 80) das nanocápsulas, a opsonização por proteínas plasmáticas e a conseqüente parcial captura por macrófagos parece ter ocorrido. Como o polissorbato 80 encontra-se apenas adsorvido fisicamente à superfície das partículas, pode sofrer dessorção após diluição e contato com componentes sanguíneos (BARRATT *et al.*, 2000; BRIGGER *et al.*, 2002), facilitando a opsonização dos sistemas nanoestruturados.

O conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho demonstrou que a associação entre melatonina e nanocápsulas pode ser relevante, tendo em vista às inúmeras aplicações terapêuticas para as quais a melatonina vêm sendo pesquisada, principalmente em patologias relacionadas a condições de dano oxidativo.

Por último, é importante enfatizar que estudos da atividade antioxidante de substâncias associadas a nanopartículas poliméricas ainda são pouco explorados no campo da nanotecnologia. Através dos poucos trabalhos publicados, até o momento,

realizados *in vitro* (PALUMBO *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2005; SHEA *et al.*, 2005; BALA *et al.*, 2006), além dos resultados *in vivo* demonstrados nesta tese, acredita-se que possa ser uma área de pesquisa bastante promissora no âmbito da nanociência.

CONCLUSÕES

- Foi possível preparar suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo melatonina (0,5 mg/mL), através do método de deposição interfacial, com diâmetros entre 204 ± 30 nm e 280 ± 14 nm, com teores totais próximos ao teórico e com taxas de associação do fármaco entre 31 % e 56 %, dependendo da composição dos sistemas;
- O estudo de avaliação do tipo de tensoativos (monooleato de sorbitano/poloxamer 188, monoestearato de sorbitano/polissorbatato 80, monooleato de sorbitano/polisorbatato 80: 33 % a 37 %), tipo de óleos (óleo mineral: 31 %; triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico; 37 %) e tipo de polímeros (37 a 56 %), sobre a taxa de associação da melatonina, demonstrou que o parâmetro de maior influência foi o tipo de polímero empregado;
- A utilização de polímeros consistindo de derivados polimetacrilatos (Eudragit[®] S100: 56 %; Eudragit[®] RS100[®]: 45 %) conduziu a obtenção de nanocápsulas com taxas de associação mais elevadas em relação aos poliésteres [poli(ϵ -caprolactona): 37 % e poli(lactídeo): 38 %];
- As suspensões de nanoesferas contendo melatonina (0,5 mg/mL), obtidas através de nanoprecipitação, apresentaram taxas de associação similares [Eudragit[®] S100: 54 %; poli(ϵ -caprolactona): 39 %] e diâmetros inferiores (126 ± 12 nm e 182 ± 8 nm) em relação às respectivas suspensões de nanocápsulas (236 ± 20 nm e 264 ± 24 nm);
- Com a secagem das suspensões de Eudragit[®] S100, através de aspersão, foram obtidos pós de nanocápsulas contendo melatonina, com rendimento satisfatório (74 ± 2 %), alta eficiência de encapsulação (93 %), baixo teor de umidade (< 2 %), diâmetro médio ($d_{(4,3)}$) de 5,8 μ m e com estreita largura de distribuição das partículas (span de 1,6);
- Mediante a análise morfológica, verificou-se a presença das nanoestruturas adsovidas às micropartículas de dióxido de silício coloidal, com tamanho e morfologia semelhantes às partículas em suspensão que lhes deram origem;

- A velocidade de dissolução da melatonina a partir dos pós microparticulados nanorrevestidos, em tampão fosfato pH 7,4, apresentou-se mais lenta ($k = 0,010 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$) em relação à melatonina pura ($k = 0,023 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$), sendo o modelo monoexponencial o mais ajustado aos dados experimentais. O mecanismo de liberação sugerido, baseado na lei da potência, foi o transporte super Caso-II (expoente $n = 0,908$), indicando a superposição dos fenômenos inchamento, relaxação e dissolução do polímero;
- Os pós de nanocápsulas apresentaram estabilidade física macro e microscópica, durante 1 ano de armazenamento à temperatura ambiente, ao passo que as suspensões de origem apresentaram agregação e precipitação das partículas já após 3,5 meses de armazenamento;
- O aumento da concentração de melatonina, de 0,5 a 1,5 mg/mL, não alterou a sua taxa de associação a nanocápsulas preparadas com Eudragit S100[®], Eudragit RS100[®] ou poli(ϵ -caprolactona);
- O teor total de melatonina permaneceu estável após 1 mês de armazenamento para as formulações preparadas com Eudragit S100[®] ou Eudragit RS100[®], em todas as condições de armazenamento avaliadas, e, após 2 meses, para as formulações preparadas com poli(ϵ -caprolactona) (exceto a 50 °C), diminuindo de forma significativa, entretanto, após 2 e 3 meses de armazenamento, respectivamente. A diminuição do teor de melatonina foi levemente acelerada pela presença da luz natural e pelo aumento de temperatura;
- A nanodispersão dos tensoativos e a nanoemulsão apresentaram redução no teor de melatonina já após 1 mês de armazenamento na presença de luz ou a 50 °C, e após 2 meses, quando armazenadas à temperatura ambiente com proteção da luz. Estes sistemas também apresentaram menor taxa de associação inicial da melatonina (29 % a 33 %), em relação às nanocápsulas (38 % a 50 %), e também diminuição deste parâmetro em função do tempo;
- Os diâmetros das nanocápsulas [(Eudragit S100[®], Eudragit RS100[®] e poli(ϵ -caprolactona)] e da nanoemulsão, contendo melatonina, não variaram

significativamente após 3 meses de armazenamento, ao contrário da nanodispersão;

- Através do estudo fatorial 2^3 , verificou-se influência dos fatores método de preparação (deposição interfacial ou emulsificação-difusão) e/ou da composição das formulações (tipo de óleo e tipos de tensoativos) sobre as características físico-químicas de nanocápsulas de Eudragit RS[®], exceto para os teores e as taxas de associação de melatonina ($42 \pm 1 \%$ e $47 \pm 4 \%$);
- O método de emulsificação-difusão (213 nm a 306 nm) e a sua combinação com os tensoativos Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®] causaram aumento do diâmetro médio das partículas em comparação ao método de nanoprecipitação (124 nm a 151 nm) e aos tensoativos Tween 80[®] e Span 80[®], respectivamente. As polidispersões das nanocápsulas preparadas por deposição interfacial foram menores em comparação ao método de emulsificação-difusão. A análise morfológica demonstrou que as partículas são esféricas e com tamanhos menores comparados aos medidos por espalhamento de luz dinâmico;
- Os valores positivos de potencial zeta das nanocápsulas de Eudragit RS100[®] ($+21 \pm 1$ mV a $+52 \pm 2$ mV) foram maiores quando foi empregado o método de emulsificação-difusão, o óleo Eutanol G[®] e o conjunto de tensoativos Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®]. As respectivas formulações preparadas sem fármaco apresentaram valores de potencial zeta inferiores ($+14 \pm 1$ mV a $+43 \pm 2$ mV), indicando a possível presença de uma fração de melatonina adsorvida externamente ao polímero;
- Os teores totais de melatonina nas suspensões de nanocápsulas de Eudragit RS100[®], armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz, não foram significativamente afetados após 1 mês de armazenamento, tanto para aquelas preparadas por deposição interfacial quanto por emulsificação-difusão. Após 2 meses, verificou-se que as suspensões contendo Epikuron 170[®] e Pluronic F68[®] apresentaram redução média maior ($15 \pm 15 \%$ a $21 \pm 13 \%$) em relação às aquelas preparadas com Tween 80[®] e Span 80[®] ($5 \pm 2 \%$ e $15 \pm 5 \%$). Por outro lado, as

taxas de associação mantiveram-se estáveis. Quanto aos diâmetros médios de partículas, a maioria das formulações não apresentou alteração significativa após 60 dias de armazenamento;

- As formulações selecionadas para a avaliação da lipoperoxidação apresentaram diâmetros de 126 ± 12 nm, 236 ± 20 nm e de 246 ± 4 nm, potenciais zeta negativos (-37 ± 2 mV, -44 ± 1 mV e -34 ± 1 mV) e taxas de associação da melatonina de 54 %, 56 % e 33 %, respectivamente, para nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsão. Estes sistemas foram preparados com Eudragit[®] S100, exceto para a nanoemulsão, com triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, e com a associação de tensoativos polissorbato 80 (Tween 80[®])/monooleato de sorbitano (Span 80[®]).
- Os resultados da lipoperoxidação *in vitro* demonstraram que a presença da melatonina foi capaz de proteger os lipídios de 8 a 51 %, em comparação aos controles, de maneira dependente da dose do fármaco (200 ou 400 μ M), da formulação e do tipo de membrana utilizada como modelo (lipossomas de fosfatidilcolina ou microssomas de fígado de rato). A redução da lipoperoxidação pela melatonina, comparativamente aos controles, não foi significativa apenas no caso dos microssomas e da dose de melatonina de 200 μ M;
- Quando lipossomas foram usados (dose da melatonina de 400 μ M), a associação da melatonina a todos os tipos de sistemas nanocarreadores aumentou significativamente o seu efeito protetor (nanocápsulas de Eudragit[®] S100= 51 ± 7 %; nanoemulsão= 48 ± 8 %; nanoesferas de Eudragit[®] S100= 42 ± 5 %), comparativamente à solução do fármaco (31 ± 4 %);
- Com o emprego dos microssomas (dose da melatonina de 400 μ M), um aumento na proteção dos lipídios foi alcançado apenas com a associação da melatonina à nanopartículas poliméricas (nanocápsulas de Eudragit[®] S100= 36 ± 3 % e nanoesferas de Eudragit[®] S100= 40 ± 7 %), relativamente à solução (16

$\pm 1 \%$), uma vez que a nanoemulsão ($19 \pm 2 \%$) teve efeito semelhante ao do fármaco em solução;

- Nanocápsulas de Eudragit[®] S100 contendo melatonina, preparadas com triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico e com a associação de tensoativos polissorbato 80 (Tween 80[®])/monooleato de sorbitano (Span 80[®]), foram selecionadas para os experimentos *in vivo* de atividade antioxidante aguda da melatonina, apresentando partículas esféricas com diâmetro médio de 241 ± 55 nm, taxa de associação de 50 % e potencial zeta de $-33 \pm 0,3$ mV;
- No córtex frontal e no hipocampo, somente a melatonina, na dose de 10 mg/kg, veiculada pelas nanocápsulas revestidas com polissorbato 80, foi capaz de reduzir a lipoperoxidação, após 1 h da administração intraperitoneal em camundongos saudáveis. No córtex, a dose de melatonina de 1 mg/kg também foi efetiva em reduzir os danos aos lipídios, quando associada aos nanocarreadores. A solução aquosa do fármaco não exerceu efeito significativo;
- No fígado, somente a formulação de nanocápsulas revestidas com polissorbato 80, contendo melatonina (10 mg/kg), foi capaz de reduzir a lipoperoxidação, enquanto que, a solução aquosa do fármaco não exerceu efeito significativo;
- A reatividade antioxidante total no hipocampo também foi aumentada pela administração de nanocápsulas revestidas com polissorbato 80 contendo melatonina. Nos demais tecidos, alterações significativas na reatividade antioxidante total não foram verificadas;
- Os lipídios no hipocampo, no córtex frontal e no fígado foram protegidos significativamente em 37 %, em 40 % a 42 % e em 25 %, respectivamente, pela administração de melatonina associada a nanocápsulas revestidas com polissorbato 80.
- Os resultados *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a associação entre melatonina e nanocápsulas pode aumentar a sua capacidade antioxidante contra a lipoperoxidação.

- Em resumo, o conjunto dos resultados obtidos na presente tese demonstrou a viabilidade tecnológica da preparação de suspensões de nanopartículas poliméricas contendo melatonina, com potencial aplicação na redução de danos oxidativos a lipídios, bem como no controle da velocidade de liberação deste fármaco, através da obtenção de micropartículas nanorrevestidas.

PERSPECTIVAS

Os resultados *in vivo* foram realizados com animais não estressados, sendo interessante, num segundo momento, avaliar se, em condições de estresse oxidativo, a nanoencapsulação parcial da melatonina teria a capacidade de aumentar o seu efeito antioxidante, mediante a vetorização deste fármaco no sítio de ação desejado. O estresse poderia ser causado por modelos de isquemia/reperfusão ou pelo emprego de um agente estressor, como o cianeto de potássio.

O desenvolvimento de novos sistemas microparticulados contendo melatonina, visando o controle da liberação oral do fármaco também poderia ser objeto de novos estudos, objetivando-se manter o efeito da melatonina por mais tempo, bem como o aumento da biodisponibilidade oral da mesma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A Pilot Study of Freeze Drying of Poly(Epsilon-Caprolactone) Nanocapsules Stabilized by Poly(vinyl alcohol): Formulation and Process Optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 178-188, 2006.
- AGNIHOTRI, S.A.; AMINABHAVI, T.M. Controlled Release of Clonazepina through Chitosan Microparticles Prepared by Novel Method. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 245-259, 2004.
- AHLIN, P.; KRISTL, J.; KRISTL, A.; VRECER, F. Investigation of Polymeric Nanoparticles as Carriers of Enalaprilat for Oral Administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, p. 113-120, 2002.
- AHMED, H. H.; MANNAA, F.; ELMERGEED, G.A.; DOSS, S. H. Cardioprotective Activity of Melatonin and Its Novel Synthesized Derivatives on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1847-1857, 2005.
- AL KHOURI, N.; ROBLOT-TREUPEL, L.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; PUISIEUX, F. Development of a New Process for the Manufacture of Polyisobutylcyanoacrylate Nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 28, p. 125-132, 1986.
- ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Preparation of Aqueous Polymeric Nanodispersions by a Reversible Salting-out Process: Influence of Process Parameters on Particle Size. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 87, p. 247-253, 1992.
- ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug-Loaded Nanoparticles—Preparation Methods and Drug Targeting Issues. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 39, n.5, p 173-191, 1993.
- ALLÉMANN, E.; LEROUX, J-C.; GURNY, R. Polymeric Nano- and Microparticles for the Oral Delivery of Peptides and Peptidomimetics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 171-189, 1998
- ANDRIANOV, A.K.; PAYNE, L. G. Polymeric Carriers for Oral Uptake of Microparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 155-170, 1998.
- ANDRISANO, V.; BERTUCCI, C.; BATTAGLIA, A.; CAVRINI, V. Photostability of Drugs: Photodegradation of Melatonin and its Determination in Commercial Formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 15-23, 2000.
- ARENDDT, J. Importance and Relevance of Melatonin to Human Biological Rhythms. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, p. 427-431, 2003.
- ARENDDT, J.; SKENE, D. J. Melatonin as a Chronobiotic. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, p. 25-39, 2005.
- ASO, Y.; YOSHIOKA, S.; PO, A.L.W.; TERAQ, T. Effect of Temperature on Mechanisms of Drug Release and Matrix Degradation of Poly(D,L-Lactide) Microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 31, p. 33-39, 1994.
- BALA, I.; BHARDWAJ, V.; HARIHARAN, S.; KHARADE, S.V.; ROY, N.; KUMAR, M.N.V.R. Sustained Release Nanoparticulate Formulation Containing

- Antioxidant-Ellagic Acid as Potential Prophylaxis System for Oral Administration. **Journal of Drug Targeting**, v. 14, n. 1, p. 27-34, 2006.
- BARAS, B.; BENOIT, M.A.; GILLARD, J. Parameters Influencing the Antigen Release from Spray-Dried Poly(DL- Lactide) Microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, p. 133-145, 2000.
- BARKAI, A.; PATHAK, Y.V.; BENITA, S. Polyacrylate (Eudragit Retard) Microspheres for Oral Controlled Release of Nifedipine. I. Formulation Design and Process Optimization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 13, p. 2057-2075, 1990.
- BARRATT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **PSTT**, v. 3, n. 5, p. 163-71, 2000.
- BARRENETXE, J.; DELAGRANGE, P.; MARTÍNEZ, J. A. Physiological and Metabolic Functions of Melatonin. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 61-72, 2004.
- BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanoparticle-Coated Microparticles: Preparation and Characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 499-512, 2004.
- BECK, R.C.R. **Desenvolvimento tecnológico de micropartículas nanorrevestidas: caracterização físico-química e biológica**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; BENVENUTTI, E.V.; DALLA COSTA, T. C.; GUTERRES, S.S. Nanostructure-Coated Diclofenac Loaded Microparticles: Preparation, Morphological Characterization, in Vitro Release and in Vivo Gastrointestinal Tolerance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p. 1233-1240, 2005.
- BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The Free Radical Theory of Aging Matures. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 2, p. 547-581, 1998.
- BÉNÈS, L.; CLAUSTRAT, B.; HORRIÈRE, F.; GEORRRIAU, M.; KONSIL, J.; PARROTT, K. A.; DEGRANDE, G. Transmucosal, Oral Controlled-Release, and Transdermal Drug Administration in Human Subjects: A Crossover Study with Melatonin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 10, p. 1115-1119, 1997.
- BENOIT, J-P.; MARCHAIS, H.; VELDE, V.V. Biodegradable Microspheres : Advanced in Production Technology. In: BENITA, S. (Ed.). **Microencapsulation: Methods and Industrial Applications**. 10th ed. New York : Marcel Dekker, 1996. Cap. 3, p. 35-72.
- BEYER, C.E.; STEKETEE, J. D.; SAPHIER, D. Antioxidant Properties of Melatonin – An Emerging Mystery. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p. 1265-1272, 1998.
- BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Strategic Approaches for Overcoming Peptide and Protein Instability within Biodegradable Nano- and Microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Pharmaceutics**, v. 59, p. 375-388, 2005.

- BITZ, C.; DOELKER, E. Influence of the Preparation Method on Residual Solventes in Biodegradable Microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 131, p. 171-181, 1996.
- BODMEIER, R.; CHEN, H. Preparation of Biodegradable Poly(±)Lactide Microparticles Using a Spray-Drying Technique. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, p. 754-757, 1988.
- BONGIORNO, D.; CERAULO, L.; MELE, A.; PANZERI, W.; SELVA, A.; LIVERI, V.T. Structural and Physicochemical Characterization of the Inclusion Complexes of Cyclomaltooligosaccharides (Cyclodextrins) with Melatonin. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 743-754, 2002.
- BRAINARD, G.C.; KAVET, R.; KHEIFETS, L.I. The Relationship between Electromagnetic Field and Light Exposures to Melatonin and Breast Cancer Risk: A Review of the Relevant Literature. **Journal of Pineal Research**, v. 26, p.65-100, 1999.
- BOUTIN, J.A.; AUDINOT, V.; FERRY, G.; DELAGRANGE, P. Molecular Tools to Study Melatonin Pathways and Actions. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 26, p. 412-419, 2005.
- BRASSEUR, N.; BRAULT, D.; COUVREUR, P. Adsorption of Hematoporphyrin onto Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles: Carrier Capacity and Drug Release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 70, p. 129-135, 1991.
- BRIDI, R. **Investigação da atividade neuroprotetora do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGB 761) em ratos**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631-51, 2002.
- BROADHEAD, J.; ROUAN, S. K. E.; RHODES, C. T. The Spray-Drying of Pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 18, n. 11-12, p. 1169-1206, 1992.
- BRZEZINSKI, A. Melatonin in Humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n.3, p. 186-195, 1997.
- CABEZA, J.; MOTILVA, V.; MARTÍN, M.J.; DE LA LASTRA, C.A. Mechanism Involved in Gastric Protection of Melatonin against Oxidant Stress by Ischemia-Reperfusion in Rats. **Life Science**, v. 68, p.1405-1415, 2001.
- CABRERA, J.; REITER, R. J.; TAN, D-X.; QI, W.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; GARCIA, J. J.; KIM, S. J.; EL-SOKKARY, G. Melatonin Reduces Oxidative Neurotoxicity due to Quinolinic Acid: In Vitro and in Vivo Findings. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 507-514, 2000.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M. J. Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as

- Ocular Drug Carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.
- CHAN, T-Y.; TANG, P-L. Characterization of the Antioxidant Effects of Melatonin and Related Indolamines in Vitro. **Journal of Pineal Research**, v. 20, p. 187-191, 1996.
- CHAN, W.C.W. Bionanotechnology Progress and Advances. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 12, p. 87-91, 2006.
- CHASTEIGNER, S.; CAVÉ, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEUX, F. Freeze-Drying of Itraconazole-Loaded Nanosphere Suspensions: A Feasibility Study. **Drug Development Research**, v. 38, p. 116-124, 1996.
- CHAWLA, V.; TIWARY, A. K.; GUPTA, S. Characterization of Polyvinylalcohol Microspheres of Diclofenac Sodium: Application of Statistical Design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 675-680, 2000.
- CHELLAT, F.; MERHI, Y.; MOREAU, A.; YAHIA, L.H. Therapeutic Potencial of Nanoparticulate Systems for Macrophage Targeting. **Biomaterials**, v. 26, p. 7260-7275, 2005.
- CHEUNG, R.T.F. The Utility of Melatonin in Reducing Cerebral Damage Resulting from Ischemia and Reperfusion. **Journal of Pineal Research**, v. 34, p. 153-160, 2003.
- CHO, K.Y.; CHOI, S.H.; KIM, C-H.; NAM, Y.S.; PARK, T.G.; PARK, J-K. Protein Release Microparticles Based on the Blend of Poly(D,L-Lactic-co-Glycolic acid) and Oligo-Ethylene Glycol Grafted Poly(L-Lactide). **Journal of Controlled Release**, v. 76, p. 275-284, 2001.
- CHOI, S-W.; KWON, H-Y.; KIM, W-S.; KIM, J-H. Thermodynamic Parameters on Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Particle Size in Emulsification-Diffusion Process. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 201, p. 283-289, 2002.
- CHUNG, S-Y.; HAN, S-H. Melatonin Attenuates Kainic Acid-Induced Hippocampal Neurodegeneration and Oxidative Stress through Microglial Inhibition. **Journal of Pineal Research**, v. 34, p. 95-102, 2003.
- CILURZO, F.; SELMIN, F.; MINGHETTI, P.; RIMOLDI, I.; DEMARTIN, F.; MONTANARI, L. Fast-Dissolving Mucoadhesive Microparticulate Delivery System Containing Piroxicam. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 355-361, 2005.
- CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The Basic Physiology and Pathophysiology of Melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, p. 11-24, 2005.
- COLOMBO, A.P.; BRIANÇON, S.; LIETO, J.; FESSI, H. Project, Design and Use of a Pilot Plant for Nanocapsule Production. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, p. 1063-1072, 2001.
- CONTE, U.; CONTI, B.; GIUNCHEDI, P.; MAGGI, L. Spray Dried Polylactide Microsphere Preparation: Influence of the Technological Parameters. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 20, n. 3, p. 235-258, 1994.

- COOK, R.O.; PANNU, R.K.; KELLAWAY, I.W. Novel Sustained Release Microspheres for Pulmonary Drug Delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 104, p. 79-90, 2005.
- COUVREUR, P.; ROLAND, M.; SPEISER, P. **Biodegradable Submicromic Particles Containg a Biologically Active Substance and Composition Containing Them**. U.S. Patent n. 4329332, 1982.
- COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule Technology: A Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**, v. 19, p. 99-134, 2002.
- CUZZOCREA, S.; REITER, R.J. Pharmacological Action of Melatonin in Shock, Inflammation and Ischemia/Reperfusion Injury. **European Journal of Pharmacology**, v. 426, p. 1-10, 2001.
- DeI BARRIO, G.G.; NOVO, F.J.; IRACHE, J.M. Loading of Plasmid DNA into PLGA Microparticles Using TROMS (Total Recirculation One-Machine System): Evaluation of its Integrity and Controlled Release Properties. **Journal of Controlled Release**, v. 86, p. 123-130, 2003.
- DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A Review of Recent Studies on Malondialdehyde as Toxic Molecule and Biological Marker of Oxidative Stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 15, p. 316-328, 2005.
- DeMURO, R. L.; NAFZIGER, A.N.; BLASK, D.E.; MENHINICK A.M.; BERTINO, J. S. The Absobute Bioavailability of Oral Melatonin. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 40, p. 781-784, 2000.
- DUBEY, V.; MISHRA, D.; ASTHANA, A.; JAIN, N. K. Transdermal Delivery of a Pineal Hormone: Melatonin Via Elastic Liposomes. **Biomaterials**, v. 27, p. 3491-3496, 2006.
- EBADI, M.; GOVITRAPONG, P.; PHANSUWAN-PUJITO, P.; NELSON, F.; REITER, R.J. Pineal Opioid Receptors and Analgesic Action of Melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 24, p. 193-200, 1998.
- EL-GIBALY, I. Development and in Vitro Evaluation of Novel Floating Chitosan Microcapsules for Oral Use: Comparation with Non-Floating Chitosan Microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 7-21, 2002.
- EL-GIBALY, I.; MEKI, A.M.A.; ABDEL-GHAFFAR, S.K. Novel B Melatonin-Loaded Chitosan Microcapsules: in Vitro Characterization and Antiapoptosis Efficacy for Aflatoxin B1-Induced Apoptosis in Rat Liver. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 5-22, 2003.
- EPSTEIN, F.H. Mechanisms of Disease- Melatonin in Humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 186-195, 1997.
- ESQUIFINO, A.I.; PANDI-PERUMAL, S.R.; CARDINALI, D.P. Circadian Organization of the Immune Response: A Role for Melatonin. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 423-433, 2004.

- FAHMY, T. M.; FONG, P.M.; GOYAL, A.; SALTZMAN, W.M. Targeted for Drug Delivery. **Nanotoday**, august, p. 18-26, 2005.
- FENG, Z.; QIN, C.; CHANG, Y.; ZHANG, J-T. Early Melatonin Supplementation Alleviates Oxidative Stress in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 101-109, 2006.
- FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEUX, F.; THIES, C. **Procedé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanoparticules**. Fr. Patent Application n. 8618446, 1986.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. r1-r4,1989.
- FRANZ, J.; POKOROVÁ, D.; HAMPL, J.; DITTRICH, M. Adjuvant Efficacy of Gelatin Particles and Microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, p. 153-161, 1998.
- GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Pysicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p.1428-1439, 2004.
- GALINDO-RODRÍGUEZ, S.A.; PUEL, F.; BRIANÇON, S.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Comparative Scale-up of Three Methods for Producing Ibuprofe-loaded Nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 357-367, 2005.
- GARCIA-GARCIA, E.; ANDRIEUX, K.; GIL, S.; COUVREUR, P. Colloidal Carriers and Blood-Brain Barrier (BBB) Translocation: A Way to Deliver Drugs to the Brain? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, p. 274-292, 2005.
- GARCÍA-PATTERSON, A.; PUIG-DOMINGO, M.; WEBB, S.M. Thirty Years of Human Pineal Research: Do we Know its Clinical Relevance. **Journal of Pineal Research**, v. 20, p. 1-6, 1996.
- GAVINI, E.; HEGGE, A.B.; RASSU, G.; SANNA, V.; TESTA, C.; PIRISINO, G.; KARLSEN, J.; GIUNCHEDI, P. Nasal Administration of Carbamazepine Using Chitosan Microspheres: In Vitro/in Vivo Studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 9-15, 2006.
- GIUNCHEDI, P.; TORRE, M. L.; MAGGI, L.; CONTI, B.; CONTE, U. Cellulose Acetate Trimellitate Microspheres Containing NSAIDs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 21, n. 3, p. 315-330, 1995.
- GÓMEZ, M.; ESPARZA, J. L.; NOGUÉS, M. R.; GIRALT, M.; CABRÉ, M.; DOMINGO, J. L. Pro-Oxidant Activity of Aluminum in the Rat Hippocampus: Gene Expression of Antioxidant Enzymes after Melatonin Administration. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 104-111, 2005.
- GRATTARD, N.; PERNIN, M.; MARTY, B.; ROUDAUT, G.; CHAMPION, D.; LE MESTE, M. Study of Release Kinetics of Small and High Molecular Weight

Substances Dispersed into Spray-Dried Ethylcellulose Microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 84, p. 125-135, 2002.

GRENHA, A.; SEIJO, B.; REMUÑÁN-LÓPEZ. Microencapsulated Chitosan Nanoparticles for Lung Protein Delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 427-437, 2005.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Containing Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Gastrointestinal Tolerance Following Intravenous and Oral Administration. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 10, p. 1-3, 1995a.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEUX, F. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Containig Diclofenac: I. Formulation and Stability Study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57-63, 1995b.

GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; DALLA COSTA, T.; BASSANI, V.; MÜLLER, C. R. **Processo de secagem de suspensões coloidais de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas por aspersão**. INPI:PI 9906081-7, 1999.

GUTERRES, S.S; MULLER, C.R.; MICHALOWSKI, C.B; POHLMANN, A.R.; DALLA COSTA, T. Gastro-Intestinal Tolerance Following Oral Administration of Spray-Dried Diclofenac-Loaded Nanocapsules and Nanospheres. **S.T.P. Pharma Science**, v. 11, p. 229-233, 2001.

HAN, K.; LEE, K-D.; GAO, Z-G.; PARK, J-S. Preparation and Evaluation of Poly(L-Lactic Acid) Microspheres Containing rhEGF for Chronic Gastric Ulcer Healing. **Journal of Controlled Release**, v. 75, p. 259-269, 2001.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S.R.; CARDINALI, D.P. Molecules in Focus: Melatonin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 313-316, 2006.

HOFFMANN, H.; DITTGEN, M.; HOFFMANN, A.; BARTSCH, C.; BREITBARTH, H.; TIMPE, C.; FARKER, K.; SCHIMIDT, U.; MELLINGER, U.; ZIMMERMANN, H.; GRÄSER, T.; OETTEL, M. Evaluation of an Oral Pulsatile Delivery System for Melatonin in Humans. **Pharmazie**, v. 53, n. 7, p. 462-466, 1998.

JAIN, R.; SHAH, N. H.; MALICK, A.W.; RHODES, C.T. Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly(Ester) Devices: Different Preparative Approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 8, p. 703-727, 1998.

JAIN, S.K.; AWASTHI, A.M.; JAIN, N.K.; AGRAWAL, G.P. Calcium Silicate Based of Repaglinide for Gastroretentive Floating Drug Delivery: Preparation and in Vitro Characterization. **Journal of Controlled Release**, v. 107, p. 300-309, 2005.

JAN, J.E.; HAMILTON, D.; SEWARD, N.; FAST, D.K.; FREEMAN, R.D.; LAUDON, M. Clinical Trials of Controlled-Release Melatonin in Children with Sleep-Wake Cycle Disorders. **Journal of Pineal Research**, v. 29, p. 34-39, 2000.

KANDIMALLA, K.; KANIKKANNAN, N.; ANDEGA, S.; SINGH, M. Effect of Fatty Acids on the Permeation of Melatonin across Rat and Pig Skin InVitro and on the Transepidermal Water Loss in Rats in Vivo. **Journal of Pharmaceutical and Pharmacology**, v. 51, p. 783-790, 1999a.

- KANDIMALLA, K.; KANIDDANNAN, N.; SINGH, M. Optimization of a Vehicle Mixture for the Transdermal Delivery of Melatonin Using Artificial Neural Networks and Response of Surface Method. **Journal of Controlled Release**, v. 61, p. 71-82, 1999b.
- KANISHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; NODA, S.; ISHIZUKA, B.; SAITO, K. Differential Growth Inhibitory Effect of Melatonin on Two Endometrial Cancer Cell Lines. **Journal of Pineal Research**, v. 28, p. 227-233, 2000.
- KARBOWNIK, M.; TAN, D-X.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J. Renal Toxicity of the Carcinogen δ -Aminolevulinic Acid: Antioxidant Effects of Melatonin. **Cancer Letters**, v. 161, p. 1-7, 2000.
- KARBOWNIK, M.; LEWINSKI, A.; REITER, R.J. Anticarcinogenic Actions of Melatonin which Involve Antioxidantive Process: Comparison with Other Antioxidants. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 735-753, 2001.
- KAWAGUCHI, H. Functional Polymer Microspheres. **Progress in Polymer Science**. v. 25, p. 1171-1212, 2000.
- KAWASHIMA, Y.; LIN, S.Y.; UEDA, M.; TAKENAKA, H. Preparation of Directly Compressible Powders of a Physical Mixture and a Complex of Theophylline-Phenobarbital Using Spray-Drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 18, p. 335-343, 1984.
- KAWASHIMA, Y.; IWAMOTO, T.; NIWA, T.; TAKEUCHI, H; HINO, T. Uniform and Improved Bioavailability of Newly Developed Rapid and Sustained Release Suspensions of Ibuprofen Microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 89, p. 9-17, 1993.
- KONDOH, T.; UNEYAMA, H.; NISHINO, H.; TORII, K. Melatonin Reduces Cerebral Edema Formation Caused by Transient Forebrain Ischemia in Rats. **Life Sciences**, v. 72, p. 583-590, 2002.
- KRAULAND, A.H.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiomers: Development and in Vitro Evaluation of a Peroral Microparticulate Peptide Delivery System. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 181-187, 2004.
- KUMAR, A.; AGARWA, SP.; KHANNA, R. Modified Release Bi-Layered Tablet of Melatonin Using β -Cyclodextrin. **Pharmazie**, v. 58, n. 9, p. 642-644, 2003.
- KURKURI, M.D.; AMINABHAVI, T.M. Poly(Vinyl Alcohol) and Poly(acrylic Acid) Sequential Interpenetrating Network pH-Sensitive Microspheres for the Delivery of Diclofenac Sodium to the Intestine. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 9-20, 2004.
- KWON, H-Y.; LEE, J-Y.; CHOI, S-W.; JANG, Y.; KIM, J-H. Preparation of PLGA Nanoparticles Containing Estrogen by Emulsification-Diffusion Method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 182, p. 123-130, 2001.

- LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.; LEHR, C. M. Size-Dependent Bioadhesion of Micro- and Nanoparticulate Carriers to the Inflamed Colonic Mucosa. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 6, p. 788-793, 2001.
- LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWACHIMA, Y. Design of pH-Sensitive Microspheres for the Colonic Delivery of the Immunosuppressive Drug Tacrolimus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 37-43, 2004.
- LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J-F.; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROT, F. Sustained ex Vivo Skin Antiseptic Activity of Chlorhexidine in Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules Encapsulated Form and as a Digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 319-34, 2002.
- LEE, B-J.; PARROT, K. A.; AYRES, J. W.; SACK, R. L. Design and Evaluation of an Oral Controlled Release Delivery System for Melatonin in Human Subjects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 124, p. 119-127, 1995.
- LEE, B-J.; MIN, G-H. Oral Controlled Release of Melatonin Using Polymer-Reinforced and Coated Alginate Beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 144, p. 37-46, 1996a.
- LEE, B-J.; PARROT, K. A.; AYRES, J. W.; SACK, R. L. Development and Characterization of an Oral Controlled-Release Delivery System for Melatonin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 22, n. 3, p. 269-274, 1996b.
- LEE, B-J, CHOE, J.S.; KIM, C-K. Preparation and Characterization of Melatonin-Loaded Stearyl Alcohol Microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n. 6, p. 775-787, 1998.
- LEE, B-J.; RYU, S-G.; CUI, J-H. Formulation and Release Characteristics of Hydroxypropyl Methylcellulose Matrix Tablet Containing Melatonin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 4, p. 493-501, 1999.
- LEE, E-J.; WU, T-S.; LEE, M-Y.; CHEN, T-Y.; TSAI, Y-Y.; CHUANG, J-I.; CHANG, G-L. Delayed Treatment with Melatonin Enhances Electrophysiological Recovery Following Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. **Journal of Pineal Research**, v. 36, p. 33-42, 2004.
- LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-P. Polymeric Nanocapsules as Drug Delivery Systems: A Review. **STP Pharma Sciences**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.
- LEROUX, J.C.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; GURNY, R. New Approach for the Preparation of Nanoparticles by an Emulsification-Diffusion Method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, p. 14-18, 1995.
- LIEBMANN, P.; WÖFLER, A.; FELSNER, P.; HOFER, D.; SCHAUENSTEIN, K. Melatonin and the Immune System. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 112, p. 203-211, 1997.

- LIN, S.; KAO, Y. Tablet Formulation Study of Spray-Dried Sodium Diclofenac Enteric-Coated Microcapsules. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 7, p. 919-924, 1991.
- LIN, R.; NG, L.S.; WANG, C-H. In Vitro Study of Anticancer Drug Doxorubicin in PLGA-Based Microparticles. **Biomaterials**, v. 26, p. 4476-4485, 2005.
- LIU, Y-Y.; FAN, X-D. Synthesis, Properties and Controlled Release Behaviors of Hydrogel Networks Using Cyclodextrins as Pendant Groups. **Biomaterials**, v. 26, p. 6367-6374, 2005.
- LIVREA, M. A.; TESORIERE, L.; D'ARPA, D.; MORREALE, M. Reaction of Melatonin with Lipoperoxyl Radicals in Phospholipid Bilayers. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, n. 5, p. 706-711, 1997.
- LOPEZ-GONZALEZ, M.; GUERRERO, J. M.; ROJAS, F.; DELGADO, F. Ototoxicity Caused by Cisplatin is Ameliorated by Melatonin and Other Antioxidantes. **Journal of Pineal Research**, v. 28, p. 73-80, 2000.
- LUDWIG, A. The Use of Mucoadhesive Polymers in Ocular Drug Delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1595-1639, 2005.
- MAO, S.; CHEN, J.; WEI, Z.; LIU, H.; BI, D. Intranasal Administration of Melatonin Starch Microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 37-43, 2004.
- MARSHALL, K-A.; REITER, R. J.; POEGGELER, B.; ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. Evaluation of the Antioxidant Activity of Melatonin in Vitro. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 3, p. 307-315, 1996.
- MATSUBARA, E.; SHOJI, M.; MURAKAMI, T.; KAWARABAYASHI, T.; ABE, K. Alzheimer's Disease and Melatonin. **International Congress Series**, v. 1252, 395-398, 2003.
- MELCHIORRI, D.; REITER, R. J.; ATTIA, A. M.; HARA, M.; BURGOS, A.; NISTICO, G. Potent Protective Effect of Melatonin on in Vivo Paraquat-Induced Oxidative Damage in Rats. **Life Sciences**, v. 56, n. 2, p.83-89, 1995.
- MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R.; CHACÓN, M.; BERGES, L.; GUZMÁN, M. Stability of Cyclosporine-Loaded Poly-ε-Caprolactone Nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, n. 6, p. 777-787, 1997.
- MONTASSER, I.; BRIANÇON, S.; LIETO, J.; FESSI, H. Méthodes d' obtention et mécanismes de formation de nanoparticules polymériques. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 55, n.6, p. 155-167, 2000.
- MORISHIMA, I.; MATSUI, H.; MUKAWA, H.; HAYASHI, K.; TOKI, Y.; OKUMURA, K.; ITO, T.; HAYAKAWA, T. Melatonin, a Pineal Hormone with Antioxidant Property, Protects against Adriamycin Cardiomyopathy in Rats. **Life Sciences**, v. 63, n. 7, p. 511-521, 1998.
- MORISHIMA, I.; OKUMURA, K.; MATSUI, H.; KANEKO, S.; NUMAGUCHI, Y.; KAWAKAMI, K.; MOKUNO, S.; HAYAKAWA, M.; TOKI, Y.; ITO, T.; HAYAKAWA, T. Zinc Accumulation in Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in

- Rats: Effects of Melatonin, a Cardioprotective Antioxidant. **Journal of Pineal Research**, v. 26, p. 204-210, 1999.
- MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000
- MU, L.; FENG, S.S. Fabrication, Characterization and in vitro Release of Paclitaxel (Taxol[®]) Loaded Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microspheres Prepared by Drying Technique with Lipid/Cholesterol Emulsifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 76, p. 239-254, 2001.
- MÜLLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, P.R.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S.S. Preparation and Characterization of Spray-Dried Polymeric Nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n.3, 343-347, 2000.
- MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREIRAS, L. L.; SILVEIRA, P.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Spray-Dried Diclofenac-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules and Nanospheres. Preparation and Physicochemical Characterization. **Pharmazie**, v. 56 , n. 11, p. 864-867, 2001.
- MÜLLER, C. R. **Produtos secos por aspersão a partir de suspensões de nanocápsulas contendo diclofenaco: caracterização físico-química e avaliação da viabilidade tecnológica de preparação de formas farmacêuticas sólidas derivadas**. 2003. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- MURAKAMI, H.; KOBAYASHI, M.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Utilization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Nanoparticles for Preparation of Mini-Depot Tablets by Direct Compression. **Journal of Controlled Release**, v. 67, p. 29-36, 2000.
- NAKADE, O.; KOYAMA, H.; ARIJI, H.; YAJIMA, A.; KAKU, T. Melatonin Stimulates Proliferation and Type I Collagen Synthesis in Human Bone Cells in Vitro. **Journal of Pineal Research**, n. 27,p. 106-110, 1999.
- NISHIDA, S.; SEGAWA, T.; MURAI, I.; NAKAGAWA, S. Long-Term Melatonin Administration Reduces Hyperinsulinemia and Improves the Altered Fatty-Acid Compositions in Type 2 Diabetic Rats Via the Restoration of Δ -5 Desaturase Activity. **Journal of Pineal Research**, v.32, p. 26-33, 2002.
- NORDLUNG, J.; LERNER, A.B. The Effects of Oral Melatonin on Skin Color and on the Release of Pituitary Hormones. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 45, p. 768-774, 1977.
- NORRIS, D.A.; PURI, N.; SINKO, P.J. The Effect of Physical Barriers and Properties on the Oral Absorption of Particulates. **Advanced drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 135-154, 1998.

- OBACH, E.S. **Avaliação dos perfis de liberação in vitro e da toxicidade gastrointestinal a partir de nebulizados de nanopartículas**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A.; REITER, R. J.; MIYAHARA, Y. Melatonin Reduces Oxidative Damage of Neural Lipids and Proteins in Senescence-Accelerated Mouse. **Neurobiology of Aging**, v. 23, p. 639-644, 2002.
- ORTEGA-GUTIÉRREZ, S.; GARCÍA, J.J.; MARTÍNEZ-BALLARÍN, E.; REITER, R.J.; MILLÁN-PLANO, S.; ROBINSON, M.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin Improves Deferoxamine Antioxidant Activity in Protecting against Lipid Peroxidation Caused by Hydrogen Peroxide in Rat Brain Homogenates. **Neuroscience Letters**, v. 323, p. 55-59, 2002.
- ORTIZ, G.G.; SÁNCHEZ-RUIZ, M.Y.; TAN, D-X.; REITER, R.J.; BENÍTEZ-KING, G.; BEAS-ZÁRATE, C. Melatonin, Vitamin E, and Estrogen Reduce Damage Induced by Kainic Acid in the Hippocampus: Potassium-Simulated GABA Release. **Journal of Pineal Research**, v. 31, p. 62-67, 2001.
- OSSENI, R. A.; RAT, P.; BOGDAN, A.; WARNET, J-M.; TOUITOU, Y. Evidence of Prooxidant and Antioxidant Action of Melatonin on Human Liver Cell Line HepG2. **Life Sciences**, v. 68, p. 387-399, 2000.
- PALMIERI, G. F.; WEHRLE, P.; STAMM, A. Evaluation of Spray-Drying as a Method to Prepare Microparticles for Controlled Drug Release. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 20, n. 18, p. 2859-2879, 1994.
- PALUMBO, M.; RUSSO, A.; CARDILE, V.; RENIS, M.; PAOLINO, D.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Improved Antioxidant Effect of Idebenone-Loaded Polyethyl-2-Cyanoacrylate Nanocapsules Tested on Human Fibroblast. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 1, p. 71-78, 2002.
- PAPPOLLA, M.A.; SIMOVICH, M.J.; BRYANT-THOMAS, T.; CHYAN, Y-J.; POEGGLER, B.; DUBOCOVICH, M.; BICK, R.; PERRY, G.; CRUZ-SAMCHEZ, F.; SIMITH, M.A. The Protective Activities of Melatonin Against the Alzheimer β -Protein are not Mediated by Melatonin Membrane Receptors. **Journal of Pineal Research**, v. 32, p. 135-142, 2002.
- PETRAKA, J.; BALDWIN, W.; BIERMANN, J.; JAYADEV, S.; BARRET, J.C; MURPHY, E. The Oncostatic Action of Melatonin in an Ovarian Carcinoma Cell Line. **Journal of Pineal Research**, n. 26, p. 129-136, 1999.
- PHYSICIANS' Desk Reference. 51 ed. Montvale: Medical Economics, 1997.
- PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted Delivery of Antibiotics Using Liposomes and Nanoparticles: Research and Applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 155-68, 2000.

PINTO REIS, C.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

POHLMANN, A.R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; PESCE da SILVEIRA, N.; GUTERRES, S.S. Spray-Dried Indometacin-Loaded Polyester Nanocapsules and Nanospheres: Development, Stability Evaluation and Nanostructure Models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p.305-312, 2002.

POHLMANN, A.R.; SOARES, L.U.; CRUZ, L.; PESCE da SILVEIRA, N.; GUTERRES, S.S. Alkaline Hydrolysis as a Tool to Determine the Association Form of Indomethacin in Nanocapsules Prepared with Poly(ϵ -Caprolactone). **Current Drug Delivery**, v. 1, p. 103-110, 2004.

POMBEIRO, A. J. L. O. **Técnicas e operações unitárias em química laboratorial**. 3 ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1998.

PONCHEL, G.; IRACHE, J-M. Specific and Non-Specific Bioadhesive Particulate Systems for Oral Delivery to the Gastrointestinal Tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 191-219, 1998.

PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J-P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. Polymeric Micro and Nanoparticles as Drug Carriers. In: DUMITRIU, S. (Ed.). **Polymeric Biomaterials**, New York: Marcel Dekker, 1994. Cap. 16.

QUALIA, F.; DE ROSA, G.; GRANATA, E.; UNGARO, F.; FATTAL, E.; LA ROTONDA, M.I. Feeding Liquid, Non-Ionic Surfactant and Cyclodextrin Affect the Properties of Insulin-Loaded Poly(Lactide-co-Glycolide) Microspheres Prepared by Spray-Drying. **Journal of Controlled Release**, v. 86, p. 267-278, 2003.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; FESSI, H.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Influence of Stabilizing Agents and Preparative Variables on the Formation of Poly(D,L-Lactic Acid) Nanoparticles by an Emulsification-Diffusion Technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 143, p. 133-141, 1996.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. A Mechanistic Study of the Formation of Polymer Nanoparticles by the Emulsification-Diffusion Technique. **Colloid and Polymer Science**, v. 275, p. 640-647, 1997.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; FESSI, H.; DOELKER, E.; ALLÉMANN, E. **Methods of Preparing Vesicular Nanocapsules**. PCT Patent W09904766A, 1999.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998a.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 7, p. 1056-1062, 1998b.

- QUINTANAR-GUERRERO, D.; TAMAYO-ESQUIVEL, D.; GANEM-QUINTANAR, A.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E. Adaptation and Optimization of the Emulsification-Diffusion Technique to Prepare Lipid Nanospheres. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 26, p. 211-218, 2005.
- RAFFIN, R.P.; OBACH, E.S.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 163-172, 2003.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- REITER, R. J.; OH, C-S.; FUJIMORI, O. Melatonin: Its Intracellular and Genomic Actions. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 7, p. 22-27, 1996.
- REITER, R. J.; TANG, L.; GARCIA, J.J.; MUÑOZ-HOYOS, A. Pharmacological Actions of Melatonin in Oxygen Radical Pathophysiology. **Life Sciences**, v. 60, p. 2255-2271, 1997.
- REITER, R. J. Oxidative Damage in the Cerebral Nervous System: Protection by Melatonin. **Progress in Neurobiology**, v. 56, p. 359-384, 1998.
- REITER, R. J.; TAN, D-X.; BURKHARDT, S. Reactive Oxygen and Nitrogen Species and Cellular and Organismal Decline: Amelioration with Melatonin. **Mechanism of Aging and Development**, v. 123, p. 1007-1019, 2002.
- REITER, R. J.; Melatonin: Clinical Relevance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 273-285, 2003.
- ROBLOT-TREUPEL, L.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Some Physicochemical Properties of Polyalkylcyanoacrylate Nanospheres and Nanocapsules. **Chimicaoggi**, p. 37-39, [Sep.], 1988.
- RODRIGUEZ, C.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. Regulation of Antioxidant Enzymes: a Significant Role for Melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, p. 1-9, 2004.
- RUAN, G.; FENG, S-S.; LI, Q-T. Effects of Material Hydrophobicity on Physical Properties of Polymeric Microspheres Formed by Double Emulsion Process. **Journal of Controlled Release**, v. 84, p. 151-160, 2002.
- SAEZ, M.; GUZMÁN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R. Freeze-Drying of Polycaprolactone and Poly(D,L-Lactic-Glycolic) Nanoparticles Induce Minor Particle Size Changes Affecting the Oral Pharmacokinetics of Loaded Drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 379-387, 2000.
- SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; PELLEGRINO, M.L.; TITA, B.; CARUSO, S.; CASTELLI, F. Interaction of Melatonin with Model Membranes and Possible Implications in its Photoprotective Activity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 209-215, 2002.

SAHOO, S.K.; LABHASETWAR, V. Nanotech Approaches to Drug Delivery and Imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 1112-1120, 2003.

SANDOR, M.; ENSCORE, D.; WESTON, P.; MATHIOWITZ, E. Effect of Protein Molecular Weight on Release from Micron-Sized PLGA Microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 76, p. 297-311, 2001.

SCHAFFAZICK, S. R. **Caracterização físico-química e avaliação biológica de liofilizados de nanopartículas poliméricas contendo diclofenaco**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.21, n.2, p. 99-106, 2002.

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

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S.S. Freeze-drying Polymeric Colloidal Suspensions: Nanocapsules, Nanospheres and Nanodispersion. A Comparative Study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501-505, 2003b.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DE CORDOVA, C.A.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GUTERRES, S.S. Protective Properties of Melatonin-loaded Nanoparticles against Lipid Peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 209-213, 2005.

SCHMIDT, C.; BODMEIER, R. Incorporation of Polymeric Nanoparticles into Solid Dosage Forms. **Journal of Controlled Release**, v. 57, p.115-125, 1999.

SHAM, J.O.H.; ZHANG Y.; FINLAY, W.H.; ROA, W.H.; LÖBENBERG, R. Formulation and Characterization of Spray-Dried Powders Containing Nanoparticles for Aerosol Delivery to the Lung. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 457-467, 2004.

SHEA, T.B.; ORTIZ, D.; NICOLOSI, R.J.; KUMAR, R.; WATTERSON, A.C. Nanosphere-Mediated Delivery of Vitamin E Increases its Efficacy against Oxidative Stress Resulting from Exposure to Amyloid Beta. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 7, p. 297-301, 2005.

SHEN, Y.X.; XU, S.Y.; WEI, S.; SUN, X.X.; LIU, L.H.; YANG, J.; DONG, C. The Protective Effects of Melatonin from Oxidative Damage Induced by Amyloid Beta-Peptide 25-35 in Middle-Aged Rats. **Journal of Pineal Research**, v. 32, p. 85-89, 2002.

SIU, A.W.; REITER, R.J.; TO, C.H. Pineal Indolamines and Vitamin E Reduce Nitric Oxide-Induced Lipid Peroxidation in Rat Retinal Homogenates. **Journal of Pineal Research**, v. 27, p. 122-128, 1999.

- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.
- SUHNER, A.; WERNER, I.; WILDE, A.; SCHLAGENHAUF, P. Over-the-Counter Melatonin – Quality or Quackery. **Pharmazie**, v. 54, p. 863-864, 1999.
- SUTINEN, R.; LAASANEN, V.; PARONEN, P.; URTTI, A. pH-Controlled Silicone Microspheres for Controlled Drug Delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 33, p. 163-171, 1995.
- TAKADA, S.; UDA, Y.; TOGUCHI, H.; OGAWA, Y. Preparation and Characterization of Copoly(d,l-Lactid/Glycolic Acid) Microparticles for Sustained Release of Thyrotropin Releasing Hormone by Double Nozzle Spray Drying Method. **Journal of Controlled Release**, v. 32, p. 79-85, 1994.
- TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S. Preparation of Enteric-Coated Microcapsules for Tableting by Spray-Drying Technique and In vitro Simulation of Drug Release from the Tablet in GI Tract. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 12, 1980.
- TAYSI, S.; KOC, M.; BÜYÜKOKUROGLU, ME.; ALTINKAYNAK, K.; SAHIN, N. Melatonin Reduces Lipid Peroxidation and Nitric Oxide During Irradiation-Induced Oxidative Injury in the Rat Liver. **Journal of Pineal Research**, v. 34, p. 173-177, 2003.
- TEIXEIRA, A.; MORFIM, M.P.; CORDOVA, C.A.S.; CHARÃO, C.C.T.; LIMA, V.R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Melatonin Protects against Pro-Oxidant Enzymes and Reduces Lipid Peroxidation in Distinct Membranes Induced by the Hydroxyl and Ascorbil Radicals and by Peroxynitrite. **Journal of Pineal Research**, v. 35, p. 262-268, 2003.
- THIES, C. A Survey of Microencapsulation Processes. In: BENITA, S. **Microencapsulation : Methods and Industrial Applications**. 10th ed. New York : Marcel Dekker, 1996. Cap. 1, p. 1-19.
- TORII, K.; UNEYAMA, H.; NISHINO, H.; KONDOH, T. Melatonin Suppresses Cerebral Edema Caused by Middle Cerebral Artery Occlusion/Reperfusion in Rats Assessed by Magnetic Resonance Imaging. **Journal of Pineal Research**, v. 36, p. 18-24, 2004.
- TOSINI, G.; FUKUHARA, C. Photic and Circadian Regulation of Retinal Melatonin in Mammals. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, p. 364-369, 2003.
- TROTTA, M.; DEBERNARDI, F.; CAPUTO, O. Preparation of Solid Lipid Nanoparticles by a Solvent Emulsification-Diffusion Technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, p. 153-160, 2003.
- TUNCAY, M.; CALIS, S.; KAS, H. S.; ERCAN, M. T.; PEKSOY, I.; HINCAL, A. A. Diclofenac Sodium Incorporated PLGA (50:50) Microspheres: Formulation Considerations and in Vitro/in Vivo Evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 195, p. 179-188, 2000.

- TÚNEZ, I.; MUÑOZ, M. C.; VILLAVICENCIO, M. A.; MEDINA, F. J.; de PRADO, E. P.; ESPEJO, I.; BARCOS, M.; SALCEDO, M.; FEIJÓO, M.; MONTILLA, P. Hepato- and Neurotoxicity by Thiocetamide: Protective Effects of Melatonin and Dimethylsulfoxide. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 223-228, 2005.
- TURSILLI, R.; CASOLARI, A.; IANNUCELLI, V.; SCALIA, S. Enhancement of Melatonin Photostability by Encapsulation in Lipospheres. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 910-914, 2006.
- VAUTHLER-HOLTZSCHERER, C.; BENABBOU, S.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M.; COUVREUR, P. Methodology for the Preparation of Ultra-Dispersed Polymer Systems. **SPT Pharma Sciences**, v. 1, n. 2, p. 109-116, 1991.
- VIDGREN, P.; VIDGREN, M.; ARPPE, J.; HAKULI, T.; LAINE, E.; PARONEN, P. In Vitro Evaluation of Spray-Dried Mucoadhesive Microspheres for Nasal Administration. **Drug Developmente and Industrial Pharmacy**, v. 18, n. 5, p. 581-597, 1992.
- VIJAYALAXMI, C.R.T.; REITER, R.J.; HERMAN, T.S. Melatonin: From Basic Research to Cancer Treatment Clinics. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 10, p. 2575-2601, 2002.
- VIJAYALAXMI, C.R.T.; REITER, R.J.; TAN, D-X.; HERMAN, T.S.; THOMAS, C.R. Melatonin as a Radioprotective Agent : A Review. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 59, n. 3, p. 639-653, 2004.
- VURAL, H.; SABUNCU, T.; ARSLAN, S.O.; AKSOY, N. Melatonin Inhibits Lipid Peroxidation and Stimulates the Antioxidant Status of Diabetic Rats. **Journal of Pineal Research**, v. 31, p. 193-198, 2001.
- WALTON, D.E. The Morphology of Spray-Dried Particles: A Qualitative View. **Drying Technology**, v. 18, n. 9, p. 1943-1986, 2000.
- WAN, L. S. C.; HENG, P. W. S.; CHIA, C. G. H. Preparation of Coated Particles Using a Spray-Drying Process with an Aqueous System. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 77, p. 183-191, 1991.
- WAN, L. S. C.; HENG, P. W. S.; CHIA, C. G. H. Spray Drying as a Process for Microencapsulation and the Effect of Different Coating Polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 18, n. 9, p. 997-1011, 1992.
- WANG, D.; YANG, M.; WONG, C. Formulation Development of Oral Controlled-Release Pellets of Diclofenac Sodium. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, n. 10, p. 1013-1017, 1997.
- WANG, F-J.; WANG, C-H. Sustained Release of Etanidazole from Spray-Dried Microspheres Prepared by Non-Halogenated Solventes. **Journal of Controlled Release**, v. 81, p. 263-280, 2002.
- WANG, H.; WEI, W.; ZHANG, S-Y.; SHEN, Y-X.; YUE, L.; WANG, N-P.; XU, S-Y. Melatonin-Selenium Nanoparticles Inhibit Oxidative Stress and Protect against Hepatic Injury Induced by Bacillus Calmette-Guérin/Lipopolysaccharide in Mice. **Journal of Pineal Research**, v. 39, p. 156-163, 2005.

WEISS, V. **Avaliação tecnológica de suspensões e nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo indometacina.** 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

XU, F.M.; HO, S.; QIAN, M.; TANG, P.L. Melatonin Protects against Cardiac Toxicity of Doxorubicin in Rat. **Journal of Pineal Research**, v. 31, p. 301-307, 2001.

YAMADA, T.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Sustained Release Ketoprofen Microparticles with Ethylcellulose and Carboxymethylethylcellulose. **Journal of Controlled Release**, v. 75, p. 271-282, 2001.

YOO, H. S.; LEE, K. H.; OH, J. E.; PARK, T. G. In Vitro and in Vivo Anti-Tumor Activities of Nanoparticles Based on Doxorubicin-PLGA Conjugates. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p. 419-431, 2000.

YOUAN, B.B.C.; JACKSON, T.L.; DICKENS, L.; HERNANDEZ, G.; OWUSU-ABABIO, G. Protein Release and Morphology of Biodegradable Microcapsules Containing an Oily Core. **Journal of Controlled Release**, v. 76, p. 313-326, 2001.

PARECERES DA BANCA EXAMINADORA

BIOGRAFIA

BIOGRAFIA

Graduação:

- Farmácia Industrial (1994 – 1998): Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS.

Pós-Graduação:

- Nível Mestrado (1999 – 2001): Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

Dissertação: Caracterização físico-química e avaliação biológica de liofilizados de nanopartículas poliméricas contendo diclofenaco.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

- Nível Doutorado (2002 – 2006): Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

Tese: Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Artigos científicos publicados:

MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREIRAS, L. L.; SILVEIRA, P.; COSTA, T. D.; GUTERRES, S. S. Spray-Dried Diclofenac-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules and Nanospheres. Preparation and Physicochemical Characterization. **Pharmazie**, v. 56 , n. 11, p. 864-867, 2001.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.21, n.2, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S.S. Freeze-Drying Polymeric Colloidal Suspensions: Nanocapsules, Nanospheres and

Nanodispersion. A Comparative Study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501-505, 2003.

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

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R; DE CORDOVA, C.A.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GUTERRES, S.S. Protective Properties of Melatonin-Loaded Nanoparticles Against Lipid Peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 209-213, 2005.

DALCIN, K.B.; SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S. Vitamina C e seus derivados em produtos dermatológicos: aplicações e estabilidade. **Caderno de Farmácia**, v. 19, n. 2, p. 69-79, 2003.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S.S. Development of Nanocapsule Suspensions and Nanocapsule Spray-Dried Powders Containing Melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 562-569, 2006.

CRUZ, L.; SCHAFFAZICK, S.R.; DALLA COSTA, T.; SOARES, L.U.; MEZZALIRA, G., DA SILVEIRA, N.P.; SCHAPOVAL, E.S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Physico-Chemical Characterization and *in vivo* Evaluation of Indomethacin Ethyl Ester-Loaded Nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, Interfacial Alkaline Hydrolysis and Antiedematogenic Activity, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, *in press*.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R; GUTERRES, S.S. Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: preparation, characterization and stability evaluation. **Pharmazie**, *in press*.