

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

Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação biológica de quitossomas
para liberação cutânea da melatonina

MANUELA DE CASTILHOS FRANÇA GONÇALVES

PORTO ALEGRE, 2008

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

Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação biológica de quitossomas
para liberação cutânea da melatonina

Dissertação apresentada por **Manuela de
Castilhos França Gonçalves** para obtenção
do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nádyá Pesce da Silveira

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25 de junho de 2008, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Angela Machado de Campos
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Profa. Teresa C. T. Dalla Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

G635d	Gonçalves, Manuela de Castilhos França Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação biológica de quitossomas para liberação cutânea da melatonina / Manuela de Castilhos França Gonçalves – Porto Alegre: UFRGS, 2008. – xviii p., 117 p.: il., tab., graf. Dissertação(mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. Quitossomas. 2. Melatonina. 3. Estresse oxidativo. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. II. Silveira, Nádyá Pesce. III. Título. CDU: 615.4
-------	---

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria C. F. Ferreira – CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro da Rede Nanocosméticos MCT/CNPq e CAPES.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Sílvia Guterres, pela oportunidade em participar de seu grupo de pesquisa. Agradeço a confiança, a orientação, a amizade e a paciência. À Prof^ª. Nádyá Pesce da Silveira, pela co-orientação, incentivo, amizade e ensinamentos a mim dispensados. À Prof^ª Adriana Pohlmann, pelas contribuições feitas a este trabalho e aos ensinamentos ministrados.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto e à Prof^ª. Dr^a Ionara Siqueira do Departamento de Bioquímica da UFRGS pelas análises dos experimentos *in vivo*.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton, que possibilitou a realização dos experimentos de raios-X a baixo ângulo.

Ao Bernardo, pelo companheirismo, amor, compreensão, incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos meus pais, Maria Cristina e José Fernando, e às minhas irmãs, Fernanda, Luiza e Natália pelo incentivo constante, carinho, compreensão e amizade.

À Vó Maria, pelo carinho, força e exemplo de pessoa que és para mim e, é claro, pelas orações. Aos meus familiares e amigos, que sempre torceram por mim.

Aos colegas do laboratório 405, pelo companheirismo e pelas trocas de conhecimentos ao longo destes dois anos. Aos colegas de mestrado, Karina, Nataly, Eliézer, Cândice e, aos colegas de laboratório, Alessandro, Fernanda Poletto, Letícia Sias e Letícia Cruz, meu agradecimento especial por todo o incentivo, apoio, companheirismo e amizade. À Marta Alves pelos ensinamentos de reologia e à Valéria Angeli pela contribuição na confecção da caixa de irradiação.

À Rede Nanocosméticos MCT/CNPq e à CAPES, pelo financiamento deste projeto e pela bolsa de estudos.

Ao PPGCF da UFRGS, pela oportunidade de realizar este trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
2.1 Geral	9
2.2 Específicos	9
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Pele	13
3.2 Radiação ultravioleta (UV)	14
3.3 Radicais livres	15
3.4 Melatonina (MEL)	15
3.4.1 Atividade antioxidante da MEL	19
3.5 Lipossomas	23
3.6 Quitosana	26
3.7 Quitossomas	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Materiais	31
4.1.1 Matérias-primas	31
4.1.2 Reagentes	31
4.1.3 Solventes e outros materiais	32
4.1.4 Aparelhos e Equipamentos	32
4.1.5 Animais de laboratório	34
4.2 Métodos	35
4.2.1 Preparação dos lipossomas (L) e quitossomas (Q)	35
4.2.1.2 Incorporação da MEL nas suspensões de nanovesículas	35
4.2.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanovesículas	36
4.2.2.1 Determinação do pH	36
4.2.2.2 Determinação do diâmetro médio de partícula e do índice de polidispersão (PDI)	36
4.2.2.3 Determinação do potencial zeta (ξ)	37
4.2.2.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	39
4.2.2.5 Quantificação de MEL	38
4.2.2.6 Validação de metodologia analítica para quantificação de MEL	39
4.2.2.7 Eficiência de encapsulação	40
4.2.2.8 Estabilidade frente ao armazenamento	41
4.2.2.9 Avaliação morfológica	41
4.2.2.10 Análise de fenômenos de instabilidade via Turbiscan <i>Lab</i> ®	41
4.2.3 Incorporação das suspensões de nanovesículas em hidrogel	42
4.2.4 Caracterização dos hidrogéis	43
4.2.4.1 Determinação do pH	43

4.2.4.2	Quantificação de MEL nos hidrogéis e validação de metodologia analítica	43
4.2.4.3	Determinação do diâmetro médio das partículas após incorporação nos hidrogéis	44
4.2.4.4	Avaliação da viscosidade	44
4.2.4.5	Análise de fenômenos de instabilidade via Turbiscan <i>LAB</i> ®	45
4.2.5	Avaliação do efeito da MEL sobre o estresse oxidativo induzido por radiação UVA em camundongos	45
4.2.5.1	Protocolo para experimentos de exposição à radiação UVA	46
4.2.5.2	Preparação das amostras	48
4.2.5.3	Ensaio de estresse oxidativo	48
4.2.5.3.1	Níveis de radicais livres (DCF)	48
4.2.5.3.2	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	49
4.2.5.3.3	Teor de tióis totais	49
4.2.5.3.4	Atividade da superóxido desmutase (SOD)	50
4.2.5.3.5	Determinação da proteína	50
4.2.6	Análise estatística	50
4.3	Descarte de resíduos químicos e biológicos	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Preparação dos lipossomas (L) e quitossomas (Q)	55
5.2	Caracterização físico-química das suspensões de nanovesículas	55
5.2.1	Determinação do pH	55
5.2.2	Determinação do diâmetro médio de partícula e do índice de polidispersão (PDI)	56
5.2.3	Determinação do potencial zeta (ξ)	57
5.2.4	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	58
5.2.5	Quantificação de MEL e eficiência de encapsulação	63
5.2.6	Estabilidade frente ao armazenamento	64
5.2.7	Avaliação morfológica	67
5.2.8	Análise de fenômenos de instabilidade via Turbiscan <i>LAB</i> ®	69
5.3	Caracterização dos hidrogéis	72
5.3.1	Determinação do pH	72
5.3.2	Quantificação de MEL nos hidrogéis	73
5.3.3	Distribuição do diâmetro médio de partículas presentes nos hidrogéis	73
5.3.4	Avaliação da viscosidade	75
5.3.5	Análise de fenômenos de instabilidade via Turbiscan <i>LAB</i> ®	77
5.4	Ensaio de estresse oxidativo	79
5.4.1	Níveis de radicais livres (DCF)	81
5.4.2	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	83
5.4.3	Teor de tióis totais	85
5.4.4	Atividade da superóxido desmutase (SOD)	86
6	CONCLUSÕES	89
7	REFERÊNCIAS	93
8	ANEXOS	105

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estrutura molecular da MEL
- Figura 2** Rotas biossintéticas da MEL
- Figura 3** Estrutura molecular da fosfatidilcolina
- Figura 4** Estrutura molecular da quitosana
- Figura 5** Espectros de SAXS das suspensões de nanovesículas das séries L e Q com aplicação de funções Lorentzianas. O espectro real é representado pela linha ruidosa, primeira Lorentziana (---) e segunda Lorentziana (—).
- Figura 6** Diâmetros médios das formulações das séries L (A) e Q (B) contendo, ou não, MEL nos dias 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento
- Figura 7** Índices de polidispersão (PDI) das formulações das séries L (A) e Q (B) contendo, ou não, MEL nos dias 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento
- Figura 8** Valores de potencial zeta das formulações das séries L (A) e Q (B) contendo, ou não, MEL nos dias 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento
- Figura 9** Valores de teor (%) das formulações das séries L (A) e Q (B) contendo MEL nos dias 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento
- Figura 10** Fotomicrografias obtidas por MET da suspensão de nanovesículas Q0
- Figura 11** Gráficos de transmissão (*T*) e *backscattering* (*BS*) (%) das suspensões L0, L1, L2, L3, Q0, Q1, Q2 e Q3 obtidos em um período de 24 h à 25°C
- Figura 12** Comparação entre as distribuições dos diâmetros médios de partícula das nanovesículas incorporadas em hidrogéis (L0, L2, Q0, Q2) em relação ao hidrogel branco (B0)
- Figura 13** Perfis reológicos dos hidrogéis descritos pelo modelo de Ostwald
- Figura 14** Gráficos de transmissão (*T*) e *backscattering* (*BS*) (%) dos hidrogéis B0, BMEL, L0, L2, Q0 e Q2 obtidos em um período de 24 h à 25 °C
- Figura 15** Níveis de DCF na pele controle (C), pele exposta à radiação UV (I) e pele exposta à radiação UV e tratada com hidrogéis (Q0, Q2, B0 e BMEL)
- Figura 16** Níveis de MDA na pele controle (C), pele exposta à radiação UV (I) e pele exposta à radiação UV e tratada com hidrogéis (Q0, Q2, B0 e BMEL)
- Figura 17** Níveis de Tióis Totais na pele controle (C), pele exposta à radiação UV (I) e pele exposta à radiação UV e tratada com hidrogéis (Q0, Q2, B0 e BMEL)
- Figura 18** Atividade da SOD na pele controle (C), pele exposta à radiação UV (I) e pele exposta à radiação UV e tratada com hidrogéis (Q0, Q2, B0 e BMEL)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Composição quali-quantitativa das nanovesículas preparadas pelo método de evaporação em fase reversa
- Tabela 2** Condições analíticas cromatográficas utilizadas para quantificação de MEL por CLAE
- Tabela 3** Composição quali-quantitativa dos hidrogéis
- Tabela 4** Tratamentos empregados nos grupos experimentais
- Tabela 5** Valores de pH das suspensões de nanovesículas
- Tabela 6** Valores de diâmetro médio e PDI das suspensões de nanovesículas obtidos no tempo 0
- Tabela 7** Valores de ξ das suspensões de nanovesículas obtidos no tempo 0
- Tabela 8** Valores de raio hidrodinâmico (R_h) obtidos por espalhamento de luz dinâmico, potencial zeta (ξ), espessura da bicamada (d), diâmetro médio do núcleo aquoso (D) e volume médio encapsulado (V) das suspensões de nanovesículas
- Tabela 9** Valores de eficiência de encapsulação das formulações contendo diferentes concentrações de MEL
- Tabela 10** Valores de pH dos hidrogéis
- Tabela 11** Valores dos coeficientes de regressão linear (R^2), índices de escoamento (n) e de consistência (K) dos hidrogéis obtidos a partir de seus perfis reológicos

LISTA DE ABREVIATURAS

DL₅₀: Dose letal média;

DP: Desvio padrão;

DPR: Desvio padrão relativo;

ERO: Espécies reativas de oxigênio;

FPS: Fator de proteção solar;

Gel/Hidrogel B0: gel de Natrosol[®] branco;

Gel/Hidrogel BMEL: gel de Natrosol[®] contendo melatonina livre;

Gel/Hidrogel L0: gel de Natrosol[®] contendo suspensão de lipossomas sem melatonina;

Gel/Hidrogel L2: gel de Natrosol[®] contendo suspensão de lipossomas contendo 0,1 % (m/m) de melatonina;

Gel/Hidrogel Q0: gel de Natrosol[®] contendo suspensão de quitossomas sem melatonina;

Gel/Hidrogel Q2: gel de Natrosol[®] contendo suspensão de quitossomas contendo 0,1 % (m/m) de melatonina;

L: Lipossomas;

L0: Suspensão de lipossomas sem melatonina;

L1: Suspensão de lipossomas contendo 0,025 % (m/m) de melatonina;

L2: Suspensão de lipossomas contendo 0,1 % (m/m) de melatonina;

L3: Suspensão de lipossomas contendo 0,25 % (m/m) de melatonina;

L4: Suspensão de lipossomas contendo 0,5 % (m/m) de melatonina;

L5: Suspensão de lipossomas contendo 0,75 % (m/m) de melatonina;

MEL: Melatonina;

Q: Quitossomas;

Q0: Suspensão de quitossomas sem melatonina;

Q1: Suspensão de quitossomas contendo 0,025 % (m/m) de melatonina;

Q2: Suspensão de quitossomas contendo 0,1 % (m/m) de melatonina;

Q3: Suspensão de quitossomas contendo 0,25 % (m/m) de melatonina;

Q4: Suspensão de quitossomas contendo 0,5 % (m/m) de melatonina;

Q5: Suspensão de quitossomas contendo 0,75 % (m/m) de melatonina;

UV: Ultravioleta;

UVA: Ultravioleta A;

UVB: Ultravioleta B;

UVC: Ultravioleta C.

RESUMO

Quitossomas são lipossomas revestidos por quitosana que representam uma alternativa aos lipossomas convencionais, no sentido de apresentarem uma melhor estabilidade e bioadesividade, características interessantes para formulações destinadas à via cutânea. Este trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar suspensões de quitossomas contendo diferentes concentrações de melatonina (MEL) e avaliar *in vivo* a capacidade antioxidante da MEL associada aos quitossomas a partir da incorporação destes em hidrogéis. As suspensões de lipossomas e quitossomas apresentaram diâmetros médios entre 150 nm e 254 nm, índices de polidispersão em torno de 0,4, valores de potencial zeta entre -38 mV e -28 mV, pH em torno de 4,0, teor médio de MEL próximo a 100 % e eficiência de encapsulação entre 31,4 % e 60,8 %. Os resultados obtidos por raios-X a baixo ângulo revelaram a presença de estruturas unilamelares, também observadas nas fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão. O estudo de estabilidade indicou que, no período de 90 dias, as suspensões de lipossomas apresentaram redução nos valores de diâmetro médio e de polidispersão, mas os valores de potencial zeta e do teor de MEL não sofreram alterações. As suspensões de quitossomas permaneceram estáveis em relação a estes parâmetros. Os resultados obtidos por Turbiscan *LAB*[®] foram semelhantes aos resultados demonstrados no estudo de estabilidade. As suspensões de lipossomas, de quitossomas e a solução hidroalcoólica da MEL foram incorporadas em hidrogéis de Natrosol[®] e apresentaram comportamento reológico pseudoplástico. Os gráficos de Turbiscan *LAB*[®] mostraram que os hidrogéis não apresentaram tendência à instabilidade. Os ensaios de estresse oxidativo revelaram uma maior proteção da pele dos camundongos que receberam tratamento tópico com hidrogéis contendo MEL frente aos efeitos deletérios gerados pela radiação UVA, apresentando menores níveis de formação de radicais livres e maiores níveis de tióis totais, comparados ao grupo submetido somente à radiação UV. As peles que receberam tratamento tópico com o hidrogel contendo MEL associada aos quitossomas apresentaram uma maior atividade da superóxido desmutase em relação aos demais tratamentos, indicando uma maior proteção cutânea.

Palavras-chave: quitossomas, melatonina, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Chitosomes are chitosan coated liposomes that represent an alternative to conventional liposomes since they present a better stability and bioadhesivity, characteristics which are interesting for formulations intended to cutaneous administration. The aim of this work was to prepare and characterize different concentrations of melatonin (MEL) loaded in chitosome suspensions and to evaluate, *in vivo*, the antioxidant capacity of MEL associated to chitosomes and incorporated in hydrogels. The liposome and chitosome suspensions presented mean diameters between 150 nm and 254 nm, polydispersity indexes around 0.4, zeta potential values between -38 mV and -28 mV, pH values close to 4.0, MEL content close to 100 % and encapsulation efficiency between 34.4 % and 60.8 %. The small angle X-rays analysis revealed the presence of unilamellar structures, also observed by transmission electronic microscopy. The stability studies indicated that, within 90 days, the liposome suspensions had a decrease in mean diameter values and in polydispersity indexes, but no alterations were detected in zeta potentials and MEL content. The chitosome suspensions remained stable in relation to these parameters during 90 days. The Turbiscan *LAB*[®] results were similar to those found in the stability studies. The liposome and chitosome suspensions and the hydroalcoholic melatonin solution were incorporated into Natrosol[®] hydrogels and presented pseudoplastic rheological profiles. The Turbiscan *LAB*[®] results showed that the hydrogels did not present instability tendency. The oxidative stress assays revealed an increase in mouse skin protection of those that were treated with hydrogels containing MEL, presenting free radical lower levels and total thiols higher levels compared to the group only submitted to UVA radiation. The skin that received hydrogels containing MEL associated to chitosomes presented higher superoxide dismutase activities compared to the other treatments, indicating a better cutaneous protection.

Key words: chitosomes, melatonin, oxidative stress.

1. Introdução

A pele, por ser a primeira região a ser exposta aos raios solares, sofre danos foto-oxidativos causados pela radiação UV. Estudos demonstram que a radiação UVA é, pelo menos, tão mutagênica e carcinogênica quanto a UVB, pois tem uma maior penetração cutânea. Estudos recentes apontam que espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são responsáveis pelos danos induzidos pela radiação UV, podendo causar câncer de pele, fotoenvelhecimento e desordens inflamatórias cutâneas. Os radicais livres promovem danos nas membranas celulares através da peroxidação lipídica, alterando a estrutura dos fosfolipídeos que as constituem. Além disso, a reatividade dos radicais livres faz com que haja a geração de uma reação em cadeia formadora de mais espécies reativas, desencadeando uma seqüência de efeitos destrutivos (INAL *et al.*, 2001).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (MEL) é um hormônio produzido, principalmente, pela glândula pineal dos vertebrados sendo também detectada em outros órgãos e em outros organismos como, por exemplo, nas plantas e bactérias. As propostas de utilização clínica da MEL estão relacionadas ao controle e tratamento de afecções ligadas ao ritmo circadiano (ARENDR, 1995) e, mais recentemente, às ações protetoras ligadas ao efeito antioxidante desta molécula (EPSTEIN, 1997; BEYER *et al.*, 1998). A primeira abordagem tem sido empregada em estudos de controle dos distúrbios do sono e aqueles decorrentes de desajuste do relógio endógeno em relação ao ciclo geofísico (*jet lag*) e em indivíduos que trabalham em horários irregulares (trabalhadores de turnos). A segunda abordagem fundamenta-se na atuação da MEL como uma potente seqüestradora de radicais livres, principalmente de radical hidroxila (OH^-) e peroxidrila (ROO^-). Uma vez que apresenta absorção oral variável, curto tempo de meia-vida, baixa biodisponibilidade oral, sofre extenso metabolismo de primeira passagem e possui baixo peso molecular (232,28 g/mol), a MEL torna-se uma boa candidata para incorporação em sistemas de liberação controlada em vias de administração alternativas como, por exemplo, os sistemas transdérmicos e tópicos carreadores de fármacos (DREHER *et al.*, 1998).

O conceito de vetorização surgiu como resposta aos inconvenientes apresentados pela terapia sistêmica convencional. A vetorização é uma estratégia terapêutica que visa modular a distribuição de uma substância por meio da sua associação a um vetor ou sistema carreador. Assim, as características físico-químicas do mesmo, e não somente aquelas do fármaco passam a governar o perfil de distribuição tecidual do ativo ou do fármaco. Os sistemas utilizados são de natureza variável, mas o princípio geral da vetorização é o mesmo e consiste na liberação do fármaco de forma preferencial no órgão ou célula-alvo, permitindo deste modo, acentuar o efeito farmacológico e reduzir possíveis efeitos colaterais (CALVO *et al.*, 1996). Esta abordagem também vem sendo estudada para a administração seletiva de substâncias na pele.

Dentro do conceito de vetorização, diferentes estruturas nanométricas têm sido estudadas para encapsular fármacos com intuito de modular e/ou otimizar sua ação terapêutica como, por exemplo, os lipossomas. As vantagens de utilizar estas estruturas coloidais são a similaridade com as membranas biológicas e, também, a versatilidade destes sistemas, que podem sofrer alterações na superfície conforme o alvo desejado (IMURA *et al.*, 2003). Na atualidade, sistemas que lhes garantam uma maior estabilidade frente a diferentes meios e que os impeçam de desestruturar e perder os compostos encapsulados têm sido estudados. Dentre as abordagens inovadoras, destaca-se a modificação da superfície dos lipossomas através do seu revestimento com polímeros.

A utilização de polímeros naturais vem recebendo atenção crescente de diversas áreas de pesquisa, em especial, o biopolímero quitosana. A quitosana é um polissacarídeo natural e apresenta propriedades que a tornam bastante atraente: baixo custo, biodegradabilidade e bioadesividade, o que permite um maior contato da formulação com o órgão alvo ou superfície de ação (KHOR *et al.*, 2003).

Considerando o exposto, este trabalho teve como objetivo estudar a potencialidade da aplicação cutânea da MEL, tendo em vista seu efeito antioxidante, veiculada em sistemas nanoestruturados inovadores, os quitossomas (lipossomas

modificados com quitosana). Em uma primeira etapa, os experimentos foram centrados na preparação e caracterização físico-química dos sistemas nanovesiculados contendo MEL. Na segunda etapa, realizou-se a incorporação de suspensões de nanovesículas selecionadas para os estudos subseqüentes em hidrogéis de hidroxietilcelulose, bem como, a caracterização físico-química desses semi-sólidos. A terceira etapa consistiu na avaliação *in vivo* do efeito antioxidante da MEL sobre o estresse oxidativo induzido por radiação UVA em pele de camundongos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Preparação, caracterização físico-química e avaliação biológica do efeito antioxidante de lipossomas modificados com quitosana (quitossomas) contendo melatonina.

2.2 Objetivos Específicos

I. Preparar lipossomas (L) e quitossomas (Q) contendo melatonina através do método de evaporação reversa;

II. Caracterizar físico-quimicamente os lipossomas (L) e quitossomas (Q) contendo melatonina quanto aos seguintes aspectos: pH, diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, fenômenos de instabilidade por Turbiscan *LAB*[®], espalhamento de raios-X a baixo ângulo, estabilidade frente ao armazenamento por 90 dias e eficiência de encapsulação;

III. Incorporar os lipossomas (L) e quitossomas (Q) contendo ou não melatonina e o fármaco livre em hidrogéis de hidroxietilcelulose e caracterizar quanto aos parâmetros pH, reologia e fenômenos de instabilidade por Turbiscan *LAB*[®];

IV. Avaliar *in vivo* em camundongos a eficiência dos hidrogéis contendo o sistema nanovesiculado na proteção cutânea contra estresse oxidativo induzido por radiação UVA através da análise da atividade enzimática da superóxido desmutase (SOD) e dos níveis de radicais livres (DCF), de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA) e de tióis totais.

3. Revisão de Literatura

3.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo e exerce inúmeras funções como proteção, regulação térmica, percepção sensorial e respostas imunológicas. Ela é constituída de três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

A epiderme, camada superior da pele, é formada por queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação celular, melanócitos (pigmento), células de Langerhans (apresentação de antígenos) e células de Merkel (percepção sensorial). A epiderme é formada pelas camadas basal (mais interna), espinhosa, granulosa e córnea (WYATT *et al.*, 2003).

A camada basal é a mais profunda delas e mantém-se em contato com a derme através dos desmossomas (junções especializadas). É constituída por células cúbicas pouco diferenciadas que se dividem continuamente, dando origem às outras camadas. Logo acima, encontra-se a camada espinhosa, que é formada por células cúbicas (mais profundas) ou achatadas (mais superficiais) unidas através das junções especializadas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). A camada granulosa é constituída por células achatadas contendo grânulos de queratina sendo responsável pela manutenção da hidratação das camadas adjacentes, bem como, pela produção de lipídeos pró-barreira como glicolipídeos, glicoproteínas e fosfolipídeos. Esses lipídeos e proteínas são secretados por exocitose na interface entre as camadas granulosa e córnea, sendo hidrolisados para formar ceramidas e ácidos graxos livres. As ceramidas, os ácidos graxos e o colesterol, conhecidos como lipídeos de barreira, formam o cimento intercelular do estrato córneo (WYATT *et al.*, 2003).

Os queratinócitos, que são a parte proliferativa da epiderme, contem queratina, que fornece a estrutura interna. À medida que os queratinócitos amadurecem e se diferenciam, tornam-se maiores e mais planos e acabam perdendo seus núcleos. A etapa final da diferenciação dos queratinócitos é a formação do estrato córneo. O

estrato córneo, portanto, protege a pele da perda de água e evita a absorção de agentes nocivos (WYATT *et al.*, 2003).

A via cutânea representa uma via de administração bastante atrativa e acessível. Ela apresenta como vantagens, em relação à via oral, a ausência de metabolismo de primeira passagem, de possíveis efeitos colaterais, bem como, um efeito sistêmico mínimo e permite, também, a possibilidade de vetorização de substâncias ativas quando o efeito tópico é desejado (GUTERRES *et al.*, 2007).

3.2 Radiação ultravioleta (UV)

A radiação solar é formada principalmente por radiação UV, luz visível e infravermelho. O espectro UV abrange comprimentos de onda que variam de 100 nm a 400 nm e divide-se em três faixas: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm).

Em relação à absorção da radiação UV pela pele, os raios UVC, altamente agressivos aos tecidos biológicos, são quase totalmente retidos/absorvidos pela camada de ozônio. Os raios UVB, 70 % são refletidos pela camada córnea da epiderme e 30 % conseguem penetrá-la, onde são absorvidos pelos queratinócitos e pela melanina. Destes, 10 % alcançam a porção superior da derme. Os raios UVB são responsáveis pelas queimaduras solares e pelas alterações celulares que predispõem ao câncer de pele. Os raios UVA apresentam menor energia, porém são mais abundantes que os raios UVB. Cerca de 80 % dos raios UVA atingem a derme e 20% alcançam a derme profunda. Eles atuam como principais responsáveis pelo fotoenvelhecimento, alterando as fibras elásticas e colágenas, provocando rugas, perda da elasticidade e manchas na pele. Tem importante participação destes raios nas fotoalergias e também predispõe a pele ao surgimento do câncer (NAKAGAWARA *et al.*, 1995).

3.3 Radicais livres

Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula que contenha um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência (HALLIWELL *et al.*, 1989). Exemplos de radicais livres são: oxigênio molecular (O_2), radicais hidroxil (OH^\cdot), peroxil (ROO^\cdot), alcoxil (RO^\cdot), ânion superóxido (O_2^\cdot), óxido nítrico (NO^\cdot), ânion peroxinitrito ($ONOO^\cdot$), ácido peroxinitroso ($OHOOH$) e ácido hipocloroso ($HOCl$). Dentre estes, OH^\cdot e O_2^\cdot são os radicais que apresentam maior importância biológica, pois são formados durante processos normais, ou exacerbados, de redução do O_2 no interior das mitocôndrias (BENZI, 1993), durante a metabolização de bases purínicas (LOWESTEIN, 1990) ou devido à redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelo ânion O_2^\cdot catalisada por redutores como o Fe_2^+ , Cu^+ ou ascorbato (YU, 1994). Os radicais livres e demais moléculas que surgem em função de suas ações oxidativas nos sistemas biológicos são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO).

Assim, antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparado a um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL *et al.*, 1989).

3.4 Melatonina (MEL)

A MEL (N-acetil-5-metoxitriptamina, Figura 1), derivada do triptofano, pertencente à classe química indolamina, foi primeiramente isolada a partir da glândula pineal de bovinos e estruturalmente identificada em 1958 (LERNER *et al.*, 1958). Estudos recentes demonstram que também ocorre síntese extrapineal da MEL como, por exemplo, no trato gastrointestinal (BUBENIK *et al.*, 2002), nos olhos (CAHILL *et al.*, 1992), na medula óssea (TAN *et al.*, 1999), no sistema imune (especialmente em linfócitos) (CARRILLO-VICO *et al.*, 2004), nos ovários (ITO *et*

al., 1999), na pele (SLOMINSKI *et al.*, 2003) sendo também encontrada em plantas (REITER *et al.*, 2002) e em bactérias (CLAUSTRAT *et al.*, 2005).

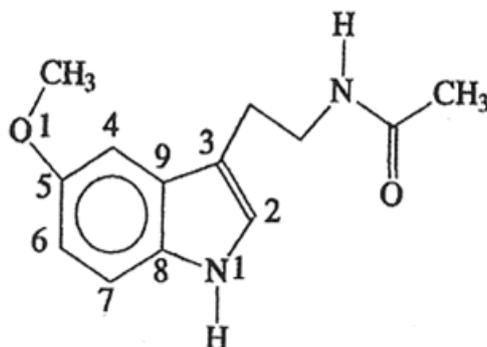


Figura 1. Estrutura molecular da MEL (REITER *et al.*, 2003).

A principal via para a síntese de MEL parte da retina, que recebe os impulsos do ciclo claro-escuro ambiental. Através do trato retino-supraquiasmático, estes impulsos atingem o núcleo supraquiasmático, situado no hipotálamo, que constitui o relógio biológico mestre no organismo dos mamíferos. As fibras nervosas da retina captam a luminosidade do ambiente e transmitem essa informação para o núcleo supraquiasmático fazendo a interação entre o ambiente externo e o relógio interno. Durante o dia, a síntese de MEL, bem como o fluxo da atividade simpática, está reduzida. Porém, no momento em que escurece, ocorre a ativação simpática e liberação de noradrenalina que, através dos receptores β -adrenérgicos presentes nas células da glândula pineal, ativa a proteína quinase A, que aumenta a síntese de adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Este, por sua vez, ativa a N-acetiltransferase que catalisa a síntese da MEL (SEABRA *et al.*, 2000). A biossíntese da MEL nos pinealócitos utiliza o aminoácido triptofano, pouco abundante em dietas regulares. Pela ação da enzima hidroxilase, o triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano que, pela ação de uma descarboxilase, origina a serotonina (5-hidroxitriptamina). As concentrações de serotonina são elevadas na glândula pineal e sua conversão em MEL envolve duas enzimas principais: a N-acetil-transferase (NAT) e a hidroxiindol-*O*-metil-transferase (HIOMT). A primeira converte a serotonina em N-acetilserotonina e

a segunda transfere um grupo metil da S-adenosil-metionina para a N-acetilserotonina, originando a 5-metoxitriptamina (Figura 2).

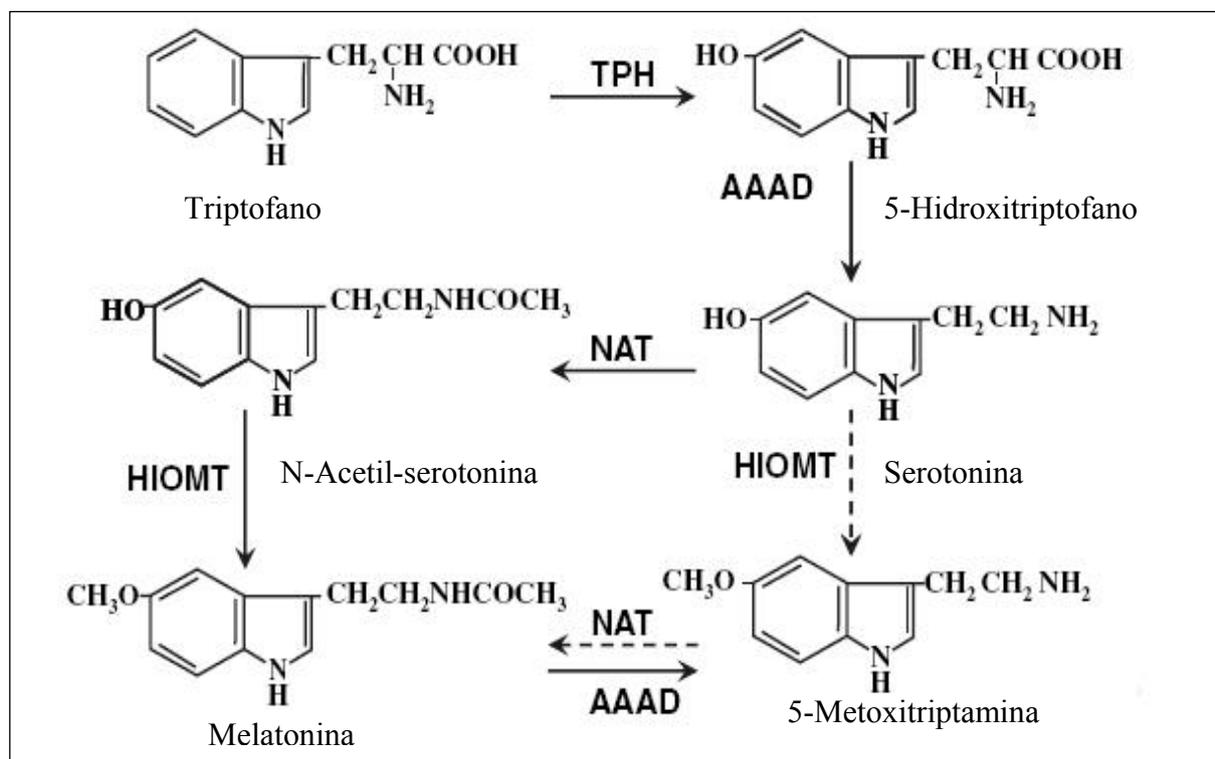


Figura 2. Rotas biossintéticas da MEL. TPH (triptofano hidroxilase), AAAD (Aminoácido aromático descarboxilase), AAA (arilacilamidase), NAT (N-acetiltransferase), HIOMT (hidroxiindol-O-metiltransferase) (adaptado de TAN *et al.*, 2007).

A MEL, liberada de forma rápida e passiva na corrente sanguínea, distribui-se para todos os órgãos e atravessa membranas devido ao seu caráter anfifílico (ARENDDT, 1995). Os níveis séricos de MEL são baixos durante o dia (< 10 pg/mL) e altos durante a noite (concentração endógena média plasmática é cerca de 50 a 70 pg/mL), atingindo os maiores picos entre 2:00 e 4:00 horas da madrugada, permanecendo elevados durante a noite e decaindo antes do amanhecer (BÉNÈS *et al.*, 1997; BRZEZINSKI, 1997; HOFFMANN *et al.*, 1998; RANG *et al.*, 2001; REITER *et al.*, 2003; BARRENETXE *et al.*, 2004). O significado fisiológico deste aumento nos níveis de MEL durante a noite está provavelmente relacionado a diversos efeitos como, por exemplo, redução da temperatura corporal, alterações dos níveis das

monoaminas cerebrais e indução da sonolência e podem ocorrer em uma ampla faixa de doses: desde os níveis fisiológicos (250 µg) até os farmacológicos (1-10 mg). A MEL apresenta o seu pico máximo de produção aos 3 anos de idade e declina de forma considerável entre os 60 e 70 anos, fazendo com que o idoso tenha um sono de má qualidade (CAGNACCI *et al.*, 1992; DOLLINS *et al.*, 1994; ZAIDAN *et al.* 1994). A diminuição da secreção de MEL é dependente da idade e pode estar relacionada a uma função permissiva no desenvolvimento de vários processos degenerativos e carcinogênicos (BEYER *et al.*, 1998; REITER *et al.*, 2002). Através da regulação do ritmo circadiano, a secreção de MEL está intimamente sincronizada com o período de sono. Desta forma, formulações orais foram desenvolvidas e sua administração exógena tem sido empregada para o tratamento de alguns transtornos deste ritmo como, por exemplo, a síndrome do atraso e do avanço de fase do sono (BOIVIN *et al.*, 2003), síndrome dos trabalhadores de turnos e *jet-lag* (DAHLITZ *et al.*, 1991; WALDHAUSER *et al.*, 1989).

O desenvolvimento de formulações contendo MEL usualmente destina-se à administração oral, ainda que esta apresente um curto tempo de meia-vida (varia entre 30 - 65 min). A fim de contornar este problema, a sua utilização em formulações de liberação controlada foi considerada, mas devido ao extenso metabolismo de primeira passagem e à absorção variável desta, a MEL apresentou baixa biodisponibilidade (< 15 %) (MALLO *et al.*, 1990; DEMURO *et al.*, 2000). Além disso, a MEL possui baixa solubilidade em água e dissolução lenta (LUI e FAN, 2005). Tendo em vista as características citadas acima, vias de administração alternativas como a transdérmica (BÉNÈS *et al.*, 1997; KANDIMALLA *et al.*, 1999a; KANDIMALLA *et al.*, 1999b; DUBEY *et al.*, 2006), transbucal (BÉNÈS *et al.*, 1997) e intranasal (MAO *et al.*, 2004) têm sido investigadas. Desta forma, evita-se o metabolismo de primeira passagem e permitem-se níveis plasmáticos sustentados. Dentre as vias de administração mencionadas acima, a via transdérmica destaca-se pelo simples e fácil acesso à aplicação de formulações e, também, a natureza protetora e não irritante da MEL reforça sua potencialidade em ser incorporada a sistemas carreadores transdérmicos (DREHER *et al.*, 1998; KANNIKKANAN *et al.*, 2001).

Além dos efeitos cronobióticos, a MEL apresenta efeitos oncostáticos, mostrando-se eficaz na redução do crescimento tumoral (LISSONI, 2002), da proliferação de células cancerígenas (SAUER *et al.*, 2001) e da incidência de metástases (LISSONI *et al.*, 1999). Possui efeitos sobre o sistema imune, onde a administração oral diária de MEL aumenta a atividade das células NK (*natural killer*) (MAESTRONI, 1993; GUERRERO e REITER, 2002), regula a expressão gênica de várias citocinas imunomodulatórias incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o fator de transformação do crescimento beta (TGF β), os níveis de interleucina I beta (IL-1 β) e de interferon gama (INF γ) (LIU *et al.*, 2001). O aumento dos níveis plasmáticos em humanos à noite estimula o aumento da produção tímica de peptídeos, tais como timosina I α e timulina (MOLINERO *et al.*, 2000) e a MEL atua como um potente inibidor da apoptose de células do sistema imune (SAINZ *et al.*, 2000). Nos últimos anos, inúmeras publicações relataram o efeito antioxidante da MEL, enfatizando sua atuação como uma potente seqüestradora de radicais livres (TAN, *et al.*, 1993).

3.4.1 Atividade antioxidante da MEL

A MEL aparentemente atua de diferentes formas para reduzir o estresse oxidativo. A sua ação antioxidante pode se dar de forma direta, ou seja, seqüestrando espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ALLEGRA *et al.*, 2003), ou indireta, atuando na ativação de enzimas antioxidantes (REITER *et al.*, 2000), na estimulação da síntese de glutathiona, um importante antioxidante intracelular (URATA *et al.*, 1999), potencializando outros antioxidantes (GITTO *et al.*, 2001), protegendo enzimas antioxidantes de danos oxidativos (MAYO *et al.*, 2002; 2003) ou aumentando a eficiência da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons que, conseqüentemente, diminui o escoamento de elétrons e reduz a produção de radicais livres (ACUÑA-CASTRO-VIEJO *et al.*, 2002).

Tan e colaboradores (2002), baseando-se em análises da relação estrutura-atividade da MEL, apontam o grupamento indol da molécula como o centro reativo da

interação com substâncias oxidantes devido à sua elevada estabilidade de ressonância e baixa energia de ativação nas reações com radicais livres. Os grupamentos metóxi e amida também contribuem significativamente para a capacidade antioxidante da MEL. O grupamento metóxi no C5 impede que a molécula apresente atividade pró-oxidativa. A substituição deste grupamento por uma hidroxila (sob condições adequadas *in vitro*) tende a aumentar sua capacidade antioxidante, porém diminui sua lipofilia e aumenta seu potencial pró-oxidativo. Os mecanismos de interação da MEL com espécies reativas provavelmente envolve a doação de um elétron originando o cátion melatonil, ou através da adição de um radical no C3. Outras possibilidades incluem a doação do hidrogênio a partir do átomo de nitrogênio ou a substituição nas posições C2, C4, C7 e a nitroação. Diferentemente dos antioxidantes clássicos, a MEL não apresenta atividade pró-oxidativa, assim como seus intermediários gerados a partir da interação desta com radicais livres, que também atuam como seqüestradores de espécies reativas. Este fenômeno é conhecido como a reação da cascata seqüestradora de radicais livres da família MEL. Devido a este fato, uma molécula de MEL tem o potencial de captar até 4 vezes mais espécies reativas quando comparada a antioxidantes clássicos.

Schaffazick e colaboradores (2005) prepararam nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões contendo MEL nas concentrações de 200 μM e 400 μM e avaliaram as propriedades protetoras de cada formulação frente à peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil. Como substratos da lipoperoxidação, foram utilizados lipossomas e microsomas. Comparando as diferentes formulações contendo MEL, em ambas as concentrações, com seus respectivos controles (sem MEL), verificou-se que houve proteção significativa dos lipídeos contra a peroxidação na presença da MEL em uma faixa de 8 a 51 %. Observou-se que na dose de 400 μM , comparando as diferentes formulações de nanocarreadores contendo MEL com uma solução aquosa de MEL, a atividade antioxidante do fármaco foi significativamente aumentada quando associada às suspensões coloidais e, os lipossomas, utilizados como substrato. Observou-se, também, que utilizando microsomas como substrato somente as formulações que continham polímero em sua composição (nanocápsulas e nanoesferas) demonstraram

um aumento significativo no efeito antioxidante da MEL. Este fato foi explicado pela maior taxa de encapsulação da MEL nas formulações que apresentavam polímero em sua composição, as nanocápsulas e as nanoesferas (55 %). As nanoemulsões apresentaram taxa de encapsulação de 33 %. Desta forma, este trabalho demonstrou que o polímero presente nas suspensões de nanocarreadores permitiu maiores taxas de encapsulação de MEL, promoveu uma maior aderência destes aos substratos e, portanto, contribuiu para um maior efeito antioxidante da MEL.

Em outro estudo, Schaffazick e colaboradores (2008) compararam, *in vivo*, o efeito antioxidante agudo da administração intraperitoneal de uma suspensão de nanocápsulas contendo MEL com a administração de uma solução aquosa da mesma avaliando tecidos cerebrais (córtex e hipocampo) e o fígado de camundongos. Os parâmetros analisados foram a lipoperoxidação, a partir dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, a reatividade antioxidante total das formulações testadas e os níveis de radicais livres formados a partir da administração das formulações. Os resultados demonstraram que a administração da solução aquosa de MEL não exerceu efeito antioxidante frente aos parâmetros analisados nos diferentes tecidos. Por outro lado, a administração da suspensão de nanocápsulas contendo MEL reduziu significativamente a lipoperoxidação em todos os tecidos analisados e, no hipocampo, aumentou a reatividade antioxidante total. Não foi observada alteração significativa dos níveis de radicais livres nos tecidos.

Dreher e colaboradores (1998) verificaram os efeitos protetores de diferentes antioxidantes (vitamina C, vitamina E e MEL) isolados e combinados, em um estudo randomizado realizado em humanos. As soluções dos antioxidantes [vitamina C: 0-5 % (m/m), vitamina E: 0-2 % (m/m) e MEL: 0-2,5 % (m/m)] foram aplicados topicamente, em região delimitada, 30 minutos antes da exposição aos raios UV e seus efeitos foram avaliados logo após a exposição, 6 horas, 24 horas e 48 horas após o tratamento. O fator de proteção solar (FPS) *in vitro* das formulações de antioxidantes também foi determinado, assim como as características de absorção destas substâncias na região do UV. Os resultados obtidos apontam que a combinação de MEL [1 e 2,5 % (m/m)] com as vitaminas C (5 % (m/m)) e E (2 % (m/m)) apresentou uma maior ação

protetora contra eritema induzido por raios UV quando comparada aos seus efeitos isolados. As formulações que continham MEL apresentaram absorção UVB/UVC significativa de forma dose-dependente. O FPS estimado para as formulações que continham MEL foi de 1,4-1,7 [1 % (m/m)] e de 2,0-2,2 (2,5 % (m/m)], independentemente da presença das vitaminas C e E.

Saija e colaboradores (2002) investigaram, por calorimetria diferencial exploratória (DSC), a interação da MEL com modelos de membranas (vesículas unilamelares e multilamelares de dimiristoilfosfatidilcolina) e sua possível implicação na atividade fotoprotetora da MEL. A atividade antioxidante da MEL foi testada em 2 modelos experimentais *in vitro*: a peroxidação induzida por radiação UV (UVC) nas vesículas multilamelares e a atividade sequestradora de radicais contra o óxido nítrico (NO). No teste de peroxidação induzida por UV, a dispersão de lipossomas ficou exposta à radiação UVC durante 1,5 h com dose correspondente a 105 erg/mm²/s. A este sistema foram adicionadas diferentes concentrações de MEL (0,1-1,5 mM) para posterior doseamento dos níveis de malondialdeído (MDA), produto final da degradação de ácidos graxos. No teste de verificação da atividade sequestradora de radicais da MEL contra o NO, a solução do fármaco foi diluída em diferentes concentrações e incubada com uma solução de nitroprussiato de sódio. Desta forma, as concentrações de nitrito foram determinadas espectrofotometricamente e comparadas a uma solução padrão. Os resultados dos testes antioxidantes *in vitro* mostraram um efeito protetor da MEL, que inibiu significativamente a formação de MDA e de NO de forma dose-dependente. Os autores sugerem que o efeito fotoprotetor da MEL foi, provavelmente, decorrente da ação captadora de radicais livres (neste caso o NO) e, também, pela atuação como um filtro que absorve a radiação UV. Os resultados de DSC evidenciaram uma boa capacidade de interação da MEL com as membranas uni- e multilamelares, ocasionando um efeito fluidificante nas mesmas, o que pode facilitar seu efeito protetor diante dos danos gerados pela lipoperoxidação. Além disso, a MEL apresenta a capacidade de atravessar biomembranas, o que pode auxiliar a proteção dos componentes intracelulares contra danos de peroxidação.

3.5 Lipossomas

Lipossomas, ou vesículas lipossômicas, são estruturas coloidais, geralmente esféricas, formadas a partir da agregação espontânea de (fosfo) lipídeos em solução (BANGHAM *et al.*, 1965). Apresentam um núcleo interno aquoso delimitado por uma ou mais membranas constituídas de moléculas fosfolipídicas que se associam em bicamadas e possuem caráter anfifílico, podendo encapsular tanto substâncias hidrofílicas quanto substâncias hidrofóbicas (POLOZOVA *et al.*, 1999). As vesículas podem diferir quanto ao tamanho de partícula (diâmetros que variam de 15 nm a 100 µm) e forma (partículas individuais ou fundidas). A partir de uma mesma composição química, estes parâmetros irão depender exclusivamente dos métodos de preparação (hidratação do filme, injeção de solvente orgânico e evaporação em fase reversa) (BANGHAM *et al.*, 1965; BATZRI *et al.*, 1973; DEMER *et al.*, 1976), uma vez que, as vesículas lipossômicas geralmente são metaestáveis. Isto é, a entalpia livre do sistema vesicular não está em equilíbrio com o ambiente. Como resultado, as vesículas tendem a alterar, com o tempo, sua lamelaridade, diâmetro, distribuição de diâmetro e formato. Entretanto, estas possíveis alterações não afetam a qualidade do sistema, uma vez que, as propriedades da fosfatidilcolina (componente base dos lipossomas, Figura 3) permanecem inalteradas. Suspensões de lipossomas estáveis provavelmente apresentam vesículas com diâmetros entre 100 a 300 nm (LAUTENSCHLÄGER, 2006).

Tendo em vista as características estruturais dos lipossomas, estes vêm sendo intensamente estudados, comprovando sua potencialidade como sistemas carreadores de fármacos como, por exemplo, na vetorização para células específicas, reduzindo os efeitos colaterais apresentados pelos tratamentos convencionais contra o câncer (HAYASHI *et al.*, 2000) e na terapia gênica, encapsulando os genes nas vesículas lipossômicas (NISHIKAWA *et al.*, 2000). Além disso, os lipossomas vêm sendo amplamente incorporados em formulações farmacêuticas e cosméticas.

A utilização dos lipossomas visa à administração de fármacos por via cutânea e parenteral, com liberação controlada, diretamente no local de ação. Dessa forma, ocorre diminuição de efeitos colaterais e uma maior eficiência terapêutica dos fármacos, pois apresentam a vantagem de mimetizar as membranas biológicas (IMURA *et al.*, 2003), facilitando a penetração da formulação e também são passíveis de sofrerem alterações estruturais de acordo com a ação desejada.

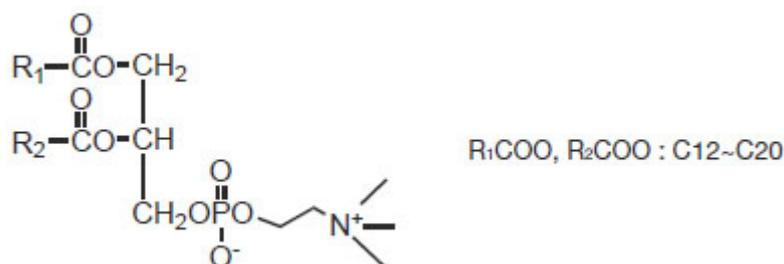


Figura 3. Estrutura molecular da fosfatidilcolina.

Dubey e colaboradores (2006) prepararam lipossomas elásticos contendo MEL em concentrações crescentes [0,1, 0,5, 1,0, 1,2, 2,0 % (m/m)] a fim de verificar a capacidade máxima de encapsulação. A concentração de fármaco em que ocorreu a máxima taxa de associação foi a de 1,0 %. Lipossomas elásticos são vesículas lipídicas ultradeformáveis e consistem de uma combinação de fosfatidilcolina com desoxicolato de sódio, que originam membranas flexíveis. Utilizando microscopia confocal de varredura à laser e pele da região abdominal de cadáver humano, verificaram que lipossomas elásticos contendo MEL apresentaram um melhor fluxo transdérmico ($51,2 \pm 2,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), um menor tempo de lag time (1,1 h) quando comparados a lipossomas convencionais e à solução de MEL e um ótimo coeficiente de permeabilidade ($15,06 \pm 0,52 \text{ cm}/\text{h}$) para a MEL. Além disso, observaram que os lipossomas elásticos promoveram uma maior deposição de fármaco na pele, permitindo uma liberação sustentada.

Ogiso e colaboradores (2001) prepararam lipossomas contendo MEL com carga de superfície positiva e negativa com o objetivo de avaliar a influência da carga

superficial na permeação cutânea deste fármaco através de experimentos *in vitro* com pele de rato. Os lipossomas foram preparados a partir da lecitina de ovo, colesterol, diacetilfosfato (superfície negativa) ou estearilamina (superfície positiva) na proporção 10: 1,1 (mol/mol) e os estudos de penetração cutânea foram avaliados com auxílio de uma sonda fluorescente (*Nile Red*). Os resultados obtidos *in vitro* indicaram que a MEL encapsulada nos lipossomas com carga superficial negativa apresentou uma maior taxa de penetração cutânea comparada à encapsulada nos lipossomas de carga de superfície positiva. Estudos histológicos revelaram que os lipossomas carregados negativamente difundem até a derme e às porções mais profundas dos folículos pilosos através do estrato córneo e dos folículos de forma mais rápida do que as vesículas carregadas positivamente. Sendo assim, lipossomas carregados negativamente devem contribuir para um aumento na penetração de fármacos através da pele.

Alguns mecanismos sobre a interação das vesículas lipossômicas com a pele tem sido descritos na literatura. Dois dos mecanismos considerados seriam: (1) a adsorção seguida da desintegração e fusão das vesículas na superfície da pele, o que levaria a um aumento da atividade termodinâmica e da penetração de fármacos lipofílicos; (2) a interação das vesículas com as camadas mais profundas da pele, onde os componentes presentes nas vesículas, molecularmente dispersos, penetrariam na matriz intracelular lipídica e se misturariam com os lipídeos subcutâneos, modificando a lamela lipídica (HOFLAND *et al.*, 1994; ZELLMER *et al.*, 1995; KIRJAVAINEN *et al.*, 1996).

A estabilidade de suspensões de lipossomas é geralmente limitada. Para tanto, modificações estruturais têm sido propostas, visando uma ação mais eficiente, um aumento das taxas de encapsulação e de durabilidade do sistema coloidal. A modificação da superfície destas vesículas através do revestimento com polímeros como polietilenoglicol ou copolímeros em bloco (JOHNSSON *et al.*, 2001) já está bem estabelecida. Porém, nos últimos anos, a utilização de produtos naturais e alternativos tem despertado a atenção de diferentes grupos de pesquisa. O reconhecimento da existência de polissacarídeos nas superfícies celulares originou estudos sobre interações entre lipossomas e diferentes grupos de polissacarídeos

(HENRIKSEN *et al.*, 1994). O polissacarídeo quitosana tem sido proposto como um bom candidato para estabilização e modificação do potencial superficial de lipossomas (PERUGINI *et al.*, 2000) originando, assim, os quitossomas.

3.6 Quitosana

A quitosana (Figura 4) é um polímero derivado da quitina, que se encontra nas paredes celulares de fungos e nas carapaças de crustáceos e insetos. Ela é obtida pela desacetilação total ou parcial da quitina e caracteriza-se por ser um copolímero de unidades combinadas de glucosamina e N-acetil-glucosamina solúvel em soluções aquosas ácidas. Uma vez que a quitosana forma sal em solução ácida produzindo cadeias polieletrólitas com cargas positivas nos átomos de nitrogênio dos grupos amino (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001), suas interações com as regiões polares dos lipossomas são favorecidas, levando à sua deposição nas mesmas. Por outro lado, dependendo do método de preparação dos lipossomas, as interações apolares entre as regiões hidrofóbicas das bicamadas lipídicas e do polímero também podem ocorrer.

Devido ao seu caráter básico (atribuído à presença de grupamentos amina nas unidades repetidas que impõem uma natureza catiônica), à biodegradabilidade, à biocompatibilidade, à baixa toxicidade (DL50= 16 g/kg, v.o, estudos *in vivo* em camundongos quando submetidos a uma dieta à base de quitosana por um longo período) e às suas propriedades bioadesivas, a quitosana vem despertando bastante interesse na produção de novos materiais destinados à área biomédica e farmacêutica (KHOR *et al.*, 2003) como, por exemplo, sistemas bioadesivos carreadores de fármacos.

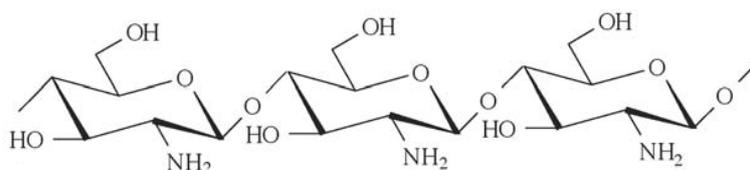


Figura 4. Estrutura molecular da quitosana.

3.7 Quitossomas

Quitossomas é a denominação dada às vesículas lipossômicas revestidas com o biopolímero quitosana. Mertins e colaboradores (2005) descreveram a preparação de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana utilizando o método de evaporação em fase reversa. Todas as etapas de preparação foram monitoradas: a formação das micelas reversas em acetato de etila, o organogel formado após a evaporação do solvente orgânico e a suspensão de nanovesículas oriundas da dispersão do organogel. Diferentes concentrações de quitosana foram empregadas (0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL) para obtenção dos quitossomas. Os resultados obtidos a partir dos gráficos de raios-X a baixo ângulo (SAXS) dos organogéis demonstraram que o organogel contendo quitosana possui uma espessura menor de bicamada fosfolipídica quando comparada ao organogel sem quitosana. Provavelmente, a fosfatidilcolina (componente da bicamada) encontra-se confinada devido à presença do biopolímero. Analisando os gráficos de raios-X a baixo ângulo (SAXS) das suspensões pode-se inferir que as nanovesículas estão cobertas interna e externamente pela quitosana. Os autores verificaram, também, que a presença de polímero influencia o método de preparação das nanovesículas aumentando o número de estruturas multilamelares e propiciando boa estabilidade destas em meio aquoso à medida que se aumenta a concentração de quitosana.

Perugini e colaboradores (2000) prepararam lipossomas, lipossomas revestidos por quitosana, lipossomas contendo quitosana e microesferas de quitosana com intuito de otimizar o efeito cosmético do ácido glicólico e reduzir seus efeitos colaterais através de sistemas de liberação controlada. Lipossomas compostos de fosfatidilcolina e colesterol foram preparados com diferentes razões ácido glicólico: lipídeo através do método de evaporação em fase reversa. Avaliaram-se dois tipos de interações entre os lipossomas e a quitosana: a adição da quitosana durante e após a preparação dos lipossomas. Para avaliar a capacidade dos sistemas microparticulados de modular a liberação do ácido glicólico, foram realizados ensaios de dissolução *in vitro* utilizando

o método de diálise. Os resultados obtidos demonstraram que os lipossomas foram capazes de modular a liberação do ácido glicólico e a melhor razão para se obter sistemas microparticulados destinados à liberação controlada do ácido glicólico é 5:1 (ácido glicólico: lipídeo). A formulação de melhor desempenho na modulação da liberação do ácido glicólico foi a do lipossoma em que a quitosana foi adicionada durante a sua preparação. As microesferas de quitosana não foram capazes de controlar a liberação do ácido glicólico.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- Melatonina (Acros Organics);
- Quitosana, grau de desacetilação= 87%; MM= 5,64X10⁵ g/mol (Polymar);
- Epikuron 170[®] - lecitina de soja (70 % de fosfatidilcolina) (Lucas Meyer GmbH);
- Fosfatidilcolina S75 - lecitina de soja (75 % de fosfatidilcolina) (Lipoid GmbH);
- Natrosol[®] (Pharmaspecial);
- Diazolidiniluréia (Sarfam);
- EDTA dissódico (Via Farma).

4.1.2 Reagentes

- Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) (Sigma);
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) (Merck);
- 1,1,3,3- tetrametoxipropano (Merck);
- Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) (Merck);
- Kit RANSOD (Randox);

- 2',7'- diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma).

4.1.3 Solventes e outros materiais

- Acetato de etila p.a (Merck);
- Água milliQ[®] (Millipore);
- Acetonitrila grau CLAE (Merck);
- Ácido acético p.a (Synth);
- Álcool etílico p.a (Nuclear);
- η-butanol (Merck);
- Membranas de polivideno HVLP 0,45 μm (Millipore);
- Filtros ultrafree[®] MC GPMC 10,000 NMWL filter unit (Millipore);
- Lâmpada fluorescente UVA, 130 V, 30 W (Starlux);
- Lâmpada fluorescente UVA, 130 V, 30 W (Sanzio);
- Pré-coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (Merck);
- Coluna LiChrospher[®] 100 RP-18, 250 mm, 4,0 mm, 5 μm (Merck);
- Cetamin - Cloridrato de Cetamina 10 % (Syntec);
- Calmiun – Xilazina 2 % (União Química).

4.1.4 Aparelhos e Equipamentos

- Balança analítica modelo APX-200 (Denver Instrument);

- Centrífuga modelo 5417R (Eppendorff);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência:
 - Auto-injetor S-200 (Perkin-Elmer)
 - Detector UV-Vis S-200 (Perkin-Elmer)
 - Bomba S-200 (Perkin-Elmer)
 - Software: Total Chrom Workstation[®];
- Zetasizer[®], zetasizer nanoseries, modelo ZEN 3600 (Malvern instruments);
- Evaporador rotatório R-114 (Büchi);
- Bomba de vácuo V-500 (Büchi Vac[®]);
- Ultrason Transsonic 460 (Elma[®]);
- Ultraturrax[®] T 25 basic (Ika[®] Werke) ;
- Potenciômetro B474 (Micronal) e Ultra-Basic (Denver Instrument);
- Turbiscan[®] *Lab* (Formulation):
 - Software: TLab EXPERT 1.13;
- Viscosímetro LV-DV-II+Pro (Brookfield):
 - Spindle SC4-25
 - Software: Rheocalc[®];
- Câmera de Irradiação UVA para camundongos (confeccionada na Universidade de Caxias do Sul – UCS);
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII (Jeol);

- Radiômetro – Medidor de ultravioleta modelo UV-400 (Icel);
- Barbeador elétrico (Philips);
- Espectrofluorímetro (Hitachi F-2000);
- Espectrofotômetro – Cary 50 (Varian).

4.1.5 Animais de laboratório

Foram utilizados camundongos CF1 machos com massa corpórea entre 30-40 g provindos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS, Porto Alegre/RS, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos lipossomas (L) e quitossomas (Q)

Os L e Q foram preparados pelo método da evaporação em fase reversa, de acordo com a técnica descrita por Mertins e colaboradores (2005):

- I. Dissolução do fosfolipídio e da MEL (m/m) em solvente orgânico (acetato de etila);
- II. Adição da solução contendo o polímero quitosana (1 mg/mL) (Q) ou água (L): formação de duas fases;
- III. Sonicação: formação de micelas reversas;
- IV. Evaporação do solvente orgânico em evaporador rotatório;
- V. Formação de um organogel;
- VI. Obtenção das nanovesículas pela adição de água sob intensa agitação manual;
- VII. Homogeneização das nanovesículas em Ultraturrax[®]: L (10 minutos a 16000 rpm) e Q (5 minutos a 11000 rpm e 5 minutos a 16000 rpm).

4.2.1.2 Incorporação da MEL nas suspensões de nanovesículas

A MEL foi adicionada, em concentrações crescentes de 0,025 % (L1 ou Q1), 0,1 % (L2 ou Q2), 0,25 % (L3 ou Q3), 0,5 % (L4 ou Q4) e 0,75 % (L5 ou Q5) (m/m) do fármaco em relação à formulação, juntamente com o fosfolipídeo para posterior solubilização em solvente orgânico e obtenção dos L e Q. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. A composição quali-quantitativa das nanovesículas é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição quali-quantitativa das nanovesículas preparadas pelo método de evaporação em fase reversa.

Componentes	L0	L1	L2	L3	L4	L5	Q0	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
Fosfolípideo (g)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Água (mL)	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-
Sol. quitosana 1 mg/mL (mL)	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2	2
MEL (mg)	-	12,5	50	125	250	375	-	12,5	50	125	250	375
Água (mL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

4.2.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanovesículas

4.2.2.1 Determinação do pH

Os valores de pH aparente das suspensões das séries L e Q foram determinados logo após a preparação, utilizando um potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0. Os resultados expressam a média de três amostras.

4.2.2.2 Determinação do diâmetro médio de partícula e do índice de polidispersão (PDI)

O diâmetro médio das partículas, bem como o PDI das mesmas foram determinados após a diluição das amostras (500 vezes) em água Milli-Q[®] previamente filtrada em filtro 0,45 µm por espalhamento de luz dinâmico em Zetasizer[®] nanoseries (Malvern Instruments, modelo ZEN 3600). As determinações ocorreram à temperatura ambiente e os resultados foram expressos através da média de três repetições.

4.2.2.3 Determinação do potencial zeta (ξ)

O potencial zeta das suspensões foi determinado através de mobilidade eletroforética em Zetasizer[®] nanoseries (Malvern Instruments, modelo ZEN 3600). Esta determinação foi realizada após diluição das amostras (500 vezes) em NaCl 10 mM previamente filtrado em membrana 0,45 μm . Os resultados foram expressos através da média de três repetições.

4.2.2.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Os espectros de SAXS foram obtidos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil. As suspensões aquosas das vesículas foram investigadas em porta-amostra para amostras líquidas, fechado por duas janelas de mica. As mesmas foram termostatizadas à 20°C. Com base em experiências anteriores do grupo de pesquisa, com sistemas semelhantes (MERTINS *et al.*, 2006), cada amostra ficou exposta à radiação por pelo menos 10 minutos. Considerando-se que o comprimento de onda disponível na linha de SAXS é em torno de 1,6 Å, que corresponde às dimensões atômicas, o detector foi colocado a uma distância de aproximadamente 45 cm da amostra, de forma a permitir a observação de um pico de difração característico nestes sistemas, que ocorre na região de médio SAXS.

Uma vez que as vesículas analisadas possuíam diâmetros superiores a 50 nm, o comprimento característico d da distância de repetição das bicamadas fosfolipídicas foi determinado através da lei de Bragg (equação 1):

$$d = n (2\pi/q) \quad (\text{equação 1})$$

onde n é um número inteiro e q é o vetor de onda correspondente à intensidade máxima do pico de Bragg.

Considerando que no espalhamento de luz o vetor de onda q se relaciona com o tamanho da amostra observada e, a partir dos dados de espalhamento de raios-X a baixo ângulo se obtém informações dimensionais de estruturas significativamente maiores do que as dimensões atômicas, o domínio típico nesta última técnica compreende valores de q inferiores a $0,1 \text{ \AA}^{-1}$ ($\theta \cong 1^\circ$).

A relação $[2Rh - (2\langle N \rangle \times d)]$ foi aplicada para estimar o diâmetro interno das vesículas (D), onde N corresponde ao número médio de bicamadas das nanovesículas. Aplicando a relação $[4/3\pi(D/2)^3]$ obteve-se, também, o volume médio encapsulado no núcleo aquoso (V), parâmetro de grande importância para as nanovesículas destinadas à liberação de fármacos.

4.2.2.5 Quantificação de MEL

A quantificação de MEL foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com metodologia descrita por Schaffazick e colaboradores (2005). Uma alíquota da suspensão foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e tratada com acetonitrila, a fim de ocasionar o rompimento/dissolução das nanovesículas e, logo após, completou-se o volume com o mesmo solvente. A fase móvel constitui-se de uma mistura acetonitrila/água (55: 45) (v/v). Após a preparação, a fase móvel foi filtrada em membranas de polivinilideno (0,45 μm , 47 mm, Millipore). As condições analíticas utilizadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições analíticas cromatográficas utilizadas para quantificação de MEL por CLAE.

Característica	Descrição
Detecção	UV ($\lambda=229$ nm)
Fluxo	0,7 mL/min
Coluna	LiCrospher [®] 100 RP-18 (250mm x 4 mm, 5 μ m - Merck)
Fase móvel	Acetonitrila:água (55:45 v/v)
Volume de injeção	20 μ L

4.2.2.6 Validação de metodologia analítica para quantificação de MEL

Com o objetivo de assegurar a confiabilidade do método analítico empregado, o mesmo foi validado segundo os critérios preconizados pela ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) de 1996 e pela resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância em Saúde) RE n° 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, precisão, especificidade, exatidão, limites de detecção e quantificação. Os ensaios foram realizados por CLAE sob as condições descritas na Tabela 2.

- Linearidade: sete níveis de concentração foram avaliados (2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0, 17,5 μ g/mL). Foram obtidas três curvas padrão em diferentes dias determinando-se a equação da reta e o coeficiente correlação (r). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva padrão e sua inclinação, conforme as equações (ICH, 1996) (equações 2 e 3):

$$LD = 3,33 DP/b \quad \text{(equação 2)}$$

$$LQ = 10 DP/b \quad \text{(equação 3)}$$

- Precisão: foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) obtido na determinação de MEL presente na suspensão de quitossomas analisada na mesma concentração teórica (10 µg/mL), no mesmo dia (repetibilidade – seis determinações) e em três dias consecutivos (precisão intermediária – seis determinações), sob as mesmas condições analíticas;
- Exatidão: foi determinada através do teste de recuperação de uma quantidade conhecida do fármaco presente na suspensão de nanovesículas (2,5 µg/mL) adicionada à solução amostra originando as concentrações de 5,0, 10,0, 15,0 µg/mL. Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação (R %).
- Especificidade: foi determinada através da análise do cromatograma obtido a partir da suspensão de quitossomas sem fármaco (Q0).

Os resultados da validação da metodologia analítica são apresentados no Anexo 1.

4.2.2.7 Eficiência de encapsulação

A quantificação de MEL livre deu-se da mesma forma que para MEL total descrita no item 4.2.2.5. A MEL livre, ou seja, não associada às nanovesículas, foi determinada através de ultrafiltração-centrifugação (Ultrafree[®]-MC 10.000 MW, Millipore) a 12000 rpm por 10 minutos à 20 °C. Esta centrifugação promoveu a passagem de MEL livre (não associada às nanovesículas) através do filtro do Ultrafree[®] originando o ultrafiltrado. Este, bem como a MEL total, foram quantificados por CLAE a partir da dissolução do ultrafiltrado ou de uma alíquota da suspensão em acetonitrila e detectados a 229 nm. O cálculo da eficiência de encapsulação deu-se através da diferença entre as concentrações de MEL total e livre.

4.2.2.8 Estabilidade frente ao armazenamento

As suspensões das séries L e Q foram armazenadas em frascos âmbar de vidro, com batoque e tampa rosqueável, à temperatura ambiente e protegidas da luz por 3 meses. Além do aspecto físico destas formulações, foram avaliados o diâmetro médio, polidispersão, o potencial zeta e o teor (%) de MEL presente nas suspensões de nanovesículas a partir do dia de preparo e após 30, 60 e 90 dias de armazenamento. Os resultados expressam a média de três amostras.

4.2.2.9 Avaliação morfológica

A suspensão de nanovesículas Q0, foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1200 Exll, operando a 80 kV (Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS, Brasil). Uma pequena alíquota da suspensão de nanovesículas foi colocada sobre o *grid* composto de cobre e filme de Formwar-Carbono (Electron Microscopy Sciences), sem diluição prévia, por 2 minutos. Retirou-se o excesso de suspensão com papel filtro e, em seguida, adicionou-se uma gota de solução de acetato de uranila a 2 %, que manteve contato com a formulação por 1 minuto. Após, retirou-se o excesso do agente de contraste com papel filtro.

4.2.2.10 Análise de fenômenos de instabilidade via Turbiscan *LAB*[®]

As suspensões de nanovesículas das séries L e Q foram submetidas a análises em Turbiscan *LAB*[®] para a verificação de possíveis fenômenos de instabilidade inerentes ao sistema nanoestruturado. Este equipamento permite determinar a ocorrência de fenômenos tais como cremagem, sedimentação, coalescência e, também, avaliar a homogeneidade da amostra. O Turbiscan[®] consiste de uma fonte de luz de infravermelho próximo e de dois detectores que agem de forma sincronizada. Desta

forma, o detector de transmissão recebe informações da luz transmitida através do produto (*T*) e o detector de *backscattering* mede a luz refletida (*BS*) pelo produto (LEMARCHAND *et al.*, 2003). As condições analíticas para todas as amostras foram as seguintes:

- Volume de amostra: 20 mL
- Tempo de análise: 24 h
- Temperatura de análise: 25 °C

4.2.3 Incorporação das suspensões de nanovesículas em hidrogel

As suspensões selecionadas das séries L (L0 e L2), Q (Q0 e Q2) e a solução hidroalcoólica [0,5:20 (v/v)] contendo MEL (BMEL), ou não (B0) foram incorporadas a um gel não iônico (Natrosol[®]) a 1 % (m/v). As suspensões selecionadas para serem incorporadas ao gel possuíam uma concentração final de MEL de 1 mg/mL. A composição quali-quantitativa das formulações está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Composição quali-quantitativa dos hidrogéis.

Componentes	L0	L2	Q0	Q2	B0	BMEL
Natrosol [®] 1 % (g)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Diazolidiniluréia 0,5 % (g)	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Suspensão qsp (g)	25	25	25	25	-	-
Álcool etílico p.a (mL)	-	-	-	-	0,5	0,5
MEL (mg)	-	-	-	-	-	25
Água qsp (g)	-	-	-	-	25	25

A preparação dos hidrogéis consistiu na dispersão manual dos componentes descritos na Tabela 3 à temperatura ambiente. A formação do gel foi verificada após o armazenamento em geladeira (10 °C) por 36 h e posterior homogeneização em gral de porcelana. As formulações foram acondicionadas em frascos plásticos, de parede dupla, com tampa rosqueável e mantidos em geladeira.

4.2.4 Caracterização dos hidrogéis

4.2.4.1 Determinação do pH

Os valores de pH dos hidrogéis foram determinados após sua preparação em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0. As amostras foram diluídas em água, a uma concentração de 10 % (m/v). Os resultados expressam a média de três amostras.

4.2.4.2 Quantificação de MEL nos hidrogéis e validação de metodologia analítica

A quantificação de MEL presente nas formulações semi-sólidas foi realizada por CLAE sob as mesmas condições analíticas das suspensões de nanovesículas conforme descrito na Tabela 2.

Com o objetivo de assegurar a confiabilidade do método analítico empregado, o mesmo foi validado (ICH, 1996; BRASIL, 2003). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, precisão, especificidade e exatidão. O gel utilizado na validação foi o que continha a formulação Q2. A preparação das amostras para a análise cromatográfica deu-se da seguinte forma: pesou-se 2 g de gel (Q2) em um béquer, sob agitação magnética constante, adicionou-se 80 mL de água milli-Q[®] e aguardou-se 1h. Após, adicionou-se 20 mL de acetonitrila e aguardou-se mais 1h. Em seguida, transferiu-se a amostra para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com

acetonitrila. A amostra foi, então, vertida sobre o papel filtro e o filtrado resultante do gel Q2 foi utilizado na análise por CLAE, empregando-se metodologia descrita no item 4.2.2.5. Os resultados da validação da metodologia analítica são apresentados no Anexo 2.

4.2.4.3 Determinação do diâmetro médio das partículas após incorporação nos hidrogéis

A determinação do diâmetro médio das nanovesículas contidas nos hidrogéis foi realizada através de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer[®]). Todas as amostras foram diluídas 500 vezes (m/v) em água ultrapura filtrada através de membrana 0,45 µm à temperatura ambiente. As soluções obtidas foram, então, submetidas às análises. As análises foram realizados em triplicata.

4.2.4.4 Avaliação da viscosidade

As características reológicas dos géis foram avaliadas em viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LV-DV-II+Pro, utilizando-se *spindle* SC4-25. As amostras foram acondicionadas em um porta-amostras Brookfield, específico para avaliação de pequenas quantidades de amostras, acoplado a um banho termostaticado com água circulante à temperatura de 25 °C ± 1 °C. As análises foram feitas em triplicatas.

As velocidades de rotação do *spindle* foram selecionadas a partir de determinações preliminares, respeitando os limites de valores de torque (superiores a 10 % e inferiores a 100 %). Após o ajuste das velocidades de rotação do *spindle*, efetuaram-se as leituras das viscosidades, tensões de cisalhamento e velocidades de cisalhamento de cada amostra. A partir destas leituras, construíram-se os reogramas de cada amostra através da representação gráfica das velocidades de cisalhamento em função das tensões de cisalhamento. As propriedades reológicas dos hidrogéis foram

determinadas seguindo o modelo de Ostwald, proposto para descrever fluídos não-newtonianos de comportamento pseudoplástico conforme a equação (equação 4) abaixo:

$$\tau = K\gamma^n \quad (\text{equação 4})$$

onde $n < 1$.

Na equação, τ é a tensão de cisalhamento, γ representa a taxa de cisalhamento, K é o coeficiente de consistência e n é o índice de escoamento ou coeficiente de fluxo, que é adimensional, e pode ser utilizado na caracterização das formulações, visto que ele caracteriza o desvio em relação ao comportamento newtoniano. A constante K está relacionada à própria viscosidade do produto e é representada pelas unidades de viscosidade (ALVES, 2007).

4.2.4.5 Análise de fenômenos de instabilidade via Turbiscan *LAB*[®]

Os hidrogéis contendo as suspensões de nanovesículas L0, L2, Q0, Q2, B0 e BMEL foram submetidas a análises em Turbiscan *LAB*[®] para a verificação de possíveis fenômenos de instabilidade. As condições analíticas para as amostras dos hidrogéis foram as seguintes:

- Quantidade de amostra: 25 g
- Tempo de análise: 24 h
- Temperatura de análise: 25 °C

4.2.5 Avaliação do efeito da MEL sobre o estresse oxidativo induzido por radiação UVA em camundongos

Com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante *in vivo* da MEL encapsulada nos Q e livre na solução hidroalcoólica do fármaco, as suspensões ou a

solução destes e suas respectivas formulações brancas (sem MEL) foram incorporadas em hidrogéis de Natrosol[®] conforme descrito na Tabela 4. No presente trabalho, a avaliação do efeito antioxidante da MEL sobre o estresse oxidativo induzido pela radiação UVA foi realizada em camundongos CF1, de acordo com metodologia adaptada descrita por Inal e colaboradores (2001).

4.2.5.1 Protocolo para experimentos de exposição à radiação UVA

- **Animais**

Camundongos CF1 machos, com livre acesso à água e alimentação (ração certificada Nuvilab[®] CR1), foram utilizados neste estudo. Os animais, previamente aos experimentos, foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia em gaiolas com no máximo 6 animais, com temperatura controlada (23 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas (07:00 h – 19:00 h) e umidade monitorada. Os experimentos foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (número 2006663, Anexo 3).

- **Anestesia**

Previamente à manipulação dos animais, estes foram anestesiados com uma associação dos anestésicos cetamina 10 % (v/v) (80 mg/Kg) e xilazina 2 % (v/v) (15 mg/Kg), administrando-se intraperitonealmente 0,3 mL da solução anestésica.

- **Tricotomização**

Sob efeito da solução anestésica, a região dorsal dos camundongos foi tricotomizada primeiramente com barbeador elétrico seguida por lâmina depilatória para uma melhor remoção dos pêlos remanescentes. Delimitou-se uma região de dimensões 3x2 cm no dorso tricotomizado para a aplicação dos géis.

- **Grupos experimentais**

Os animais foram aleatoriamente divididos em 6 grupos experimentais (n= 9) e receberam diferentes tratamentos exibidos na Tabela 4.

Tabela 4. Tratamentos empregados nos grupos experimentais indicados pelo marcador x (n= 9).

Grupos	Radiação UVA	Gel B0	Gel BMEL	Gel Q0	Gel Q2
C	-	-	-	-	-
I	x	-	-	-	-
B0	x	x	-	-	-
BMEL	x	-	x	-	-
Q0	x	-	-	x	-
Q2	x	-	-	-	x

- **Aplicação dos hidrogéis**

Os animais, previamente tricotomizados, foram tratados topicamente na região dorsal com 0,5 g do gel correspondente aos seus respectivos grupos. A concentração de MEL presente em 0,5 g de hidrogel (BMEL e Q2) ficou em torno de 450 μ M. Aplicaram-se os géis 30 minutos antes da exposição à radiação UVA (DREHER *L*, 1998). O tratamento tópico consistiu em uma única aplicação diária durante 9 dias consecutivos. A MEL presente nos hidrogéis foi previamente doseada conforme descrito no item 4.2.4.2.

- **Irradiação**

Durante o período de irradiação, os camundongos ficaram imobilizados em uma caixa de contenção composta por 15 contentores individuais a uma distância de 30 cm

da fonte luminosa (5 lâmpadas fluorescentes BLB, 130 V, 30 W, (3) Starlux e (2) Sanky). Os animais foram irradiados por 9 dias consecutivos, durante 6 horas/dia. A intensidade da luz UVA foi medida com um radiômetro modelo UV-400 (Icel) e, a 30 cm das lâmpadas, a radiação UV era 1,25 mW/cm² e a dose total diária foi 18 J/cm². Após o término do tratamento, os animais foram sacrificados por decapitação e submetidos à remoção da pele dorsal e descartados em local específico para este fim na Faculdade de Farmácia. As peles removidas foram pesadas, acondicionadas em microtubos e armazenadas à -70°C para posterior análise.

4.2.5.2 Preparação das amostras

A preparação das amostras consistiu na homogeneização das peles em 10 volumes de tampão fosfato (0,02 M, pH 7,0) contendo EDTA (1 mM) e PMSF (1 mM) em um homogeneizador de tecidos. Os homogeneizados foram centrifugados a 5000 rpm à 4 °C durante 10 minutos para a remoção dos núcleos e dos restos celulares. Para os experimentos de estresse oxidativo utilizaram-se os sobrenadantes. Todos os procedimentos foram conduzidos à 4 °C (banho gelo) .

4.2.5.3 Ensaio de estresse oxidativo

As análises das amostras foram realizadas no Departamento de Bioquímica da UFRGS em colaboração com o Professor Dr. Carlos Alexandre Netto.

4.2.5.3.1 Níveis de radicais livres (DCF)

Para avaliar o conteúdo de radicais livres utilizou-se o reagente DCFH-DA (2', 7'-diclorofluoresceína diacetato) como marcador (LEBEL *et al.*, 1990). Uma alíquota de cada amostra foi incubada com DCFH-DA (100 mM) à 37°C por 30 minutos. O término da reação ocorreu com resfriamento da mistura de reação no gelo. A formação

do derivado oxidado fluorescente DCF (2', 7'-diclorofluoresceína) foi monitorado em comprimentos de onda de excitação (488 nm) e emissão (525 nm) utilizando-se um espectrofluorímetro (Hitachi F-2000). Todos os procedimentos foram realizados no escuro e o branco, contendo DCFH-DA (sem homogeneizado), foi processado para a determinação da autofluorescência (DRIVER *et al.*, 2000; SRIRAM *et al.*, 1997). O conteúdo de radicais livres foi quantificado a partir de uma curva padrão de DCF e os resultados foram expressos em pmol de DCF formado/mg de proteína (SRIRAM *et al.*, 1997).

4.2.5.3.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A lipoperoxidação foi avaliada pelo teste de TBARS (BROMONT *et al.*, 1989). Alíquotas das amostras foram incubadas com TCA 10 % (v/v) e TBA 0,67 % (m/v). A mistura de reação foi aquecida em banho de água fervente por 30 minutos. Após, adicionou-se à mistura η -butanol e esta foi centrifugada a 1000 x g por 10 minutos. Coletou-se a fase orgânica para a determinação da fluorescência nos comprimentos de onda de excitação (515 nm) e emissão (553 nm). 1,1,3,3-tetrametoxipropano, que se converte em malondialdeído (MDA), foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em pmol MDA/mg de proteína.

4.2.5.3.3 Teor de tióis totais

Os tióis celulares (-SH), grupamentos presentes na glutatona e nas proteínas, foram medidos. Alíquotas das amostras foram incubadas com 100 mM de DTNB (concentração final) durante 15 minutos no escuro. A absorvância da mistura de reação foi medida a 412 nm (KHAJURIA *et al.*, 1999). Os resultados foram expressos em nmols SH/mg de proteína.

4.2.5.3.4 Atividade da superóxido desmutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada utilizando o kit RANSOD (RANDOX). Este método consiste na geração de radicais superóxido a partir da xantina e da xantina oxidase que reagem com o cloro 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazólio gerando uma coloração avermelhada. Esta é avaliada espectrofotometricamente a 505 nm à 37°C. A inibição da produção do cromógeno é proporcional à atividade da SOD presente na amostra. A atividade específica desta enzima foi expressa em U/mg de proteína.

4.2.5.3.5 Determinação da proteína

A proteína presente nos homogeneizados de peles foi determinada pelo método do *Coomassie Blue* (BRADFORD *et al.*, 1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 595 nm.

4.2.6 Análise estatística

Os resultados dos experimentos *in vivo* foram avaliados por análise da variância (ANOVA) de uma via seguidos pelo teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 0,05. As suspensões de L e Q foram submetidas ao teste estatístico não paramétrico de medidas repetidas (*Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks*). Os testes foram realizados utilizando-se o programa SigmaStat 3.5.

4.3 Descarte de resíduos químicos e biológicos

O descarte de resíduos químicos seguiu procedimento padrão realizado pela Faculdade de Farmácia – UFRGS. Os resíduos químicos foram acondicionados em frascos de 1 litro de bocal largo ou em bombonas plásticas de 5 ou 10 litros e preenchidos até 80 % da sua capacidade. Os recipientes foram rotulados com informações sobre o tipo de resíduo contido, a sala, o telefone, a data do início do envase, o responsável, se é passível ou não de purificação e o pH da solução.

Os resíduos químicos convenientemente acondicionados e devidamente rotulados foram entregues à Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT/FAR) desta Faculdade, que é responsável pelo envio dos resíduos ao Instituto de Química da UFRGS, onde são realizados os procedimentos adequados de reciclagem e/ou descarte do material químico.

Após o sacrifício, os animais foram acondicionados em sacos plásticos brancos opacos e armazenados em freezer utilizado exclusivamente para esta finalidade até o recolhimento semanal realizado pela coleta especial para resíduos biológicos da Prefeitura de Porto Alegre.

Os materiais perfurocortantes foram acondicionados em recipientes rígidos para evitar rupturas, sendo armazenados e recolhidos pela coleta especial de resíduos biológicos.

5. Resultados e Discussão

5.1 Preparação dos lipossomas (L) e quitossomas (Q)

As formulações L0, L1, L2, L3, Q0, Q1, Q2 e Q3 foram preparadas com sucesso seguindo a metodologia descrita. Entretanto, as formulações L4, Q4, L5 e Q5 apresentaram instabilidade, visualmente constatada. As formulações L4 e Q4 apresentaram instabilidade no sétimo dia de armazenamento podendo visualizar-se precipitados nos frascos de acondicionamento e, L5 e Q5, mostraram-se instáveis durante o preparo (fármaco aderido à parede do balão do rota-evaporador). Sendo assim, as formulações L4 e L5 e Q4 e Q5 não foram utilizadas nos estudos subseqüentes.

Todas as suspensões de nanovesículas das séries L e Q apresentaram um aspecto turvo de esbranquiçado a amarelo pálido, devido à presença de partículas em suspensão.

5.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanovesículas

5.2.1 Determinação do pH

Os resultados obtidos na determinação dos valores de pH das suspensões de nanovesículas das séries L e Q estão descritos na Tabela 5. As medidas de pH foram realizadas logo após a preparação das suspensões.

Tabela 5. Valores de pH das suspensões de nanovesículas (n=3).

Formulações	pH	Formulações	pH
L0	4,40 ± 0,45	Q0	4,10 ± 0,24
L1	4,48 ± 0,48	Q1	4,31 ± 0,16
L2	4,59 ± 0,34	Q2	4,24 ± 0,26
L3	4,34 ± 0,46	Q3	4,25 ± 0,45

Os valores de pH de todas as suspensões variaram entre 4,10 e 4,59. A presença de MEL, bem como seu emprego em concentrações crescentes, não influenciaram os valores de pH final das suspensões. A presença de quitosana na série Q também não provocou alterações no pH. Além disso, para ambas as séries, os valores de pH foram compatíveis para a aplicação tópica das suspensões (ALVES *et al.*, 2007), posteriormente incorporadas em hidrogéis.

5.2.2 Determinação do diâmetro médio de partícula e do índice de polidispersão (PDI)

Os valores médios de diâmetro e de PDI das suspensões de nanovesículas após a preparação das mesmas (tempo 0) estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de diâmetro médio e PDI das suspensões de nanovesículas obtidos no tempo 0 (n=3).

Formulações	Diâmetro (nm)	PDI
L0	195 ± 14	0,42± 0,03
L1	150 ± 19	0,42 ± 0,03
L2	254 ± 21	0,41 ± 0,03
L3	202 ± 22	0,45 ± 0,03
Q0	220 ± 20	0,32 ± 0,02
Q1	232 ± 17	0,40 ± 0,03
Q2	223 ± 16	0,36 ± 0,03
Q3	251 ± 13	0,37 ± 0,03

Os diâmetros médios de partícula das nanovesículas da série L variaram entre 150 nm e 254 nm e da série Q entre 220 nm e 251 nm, valores característicos de suspensões de nanovesículas estáveis. Os valores de polidispersão situaram-se em torno de 0,4, valor bastante aceitável para estes tipos de sistemas (LAUTENSCHLÄGER, 2006). Curiosamente, a presença de MEL (em concentrações crescentes) e a inclusão de quitosana, não provocaram alterações nos diâmetros médios e nos valores de polidispersão das suspensões.

5.2.3 Determinação do potencial zeta (ξ)

A determinação do ξ fornece indícios sobre o potencial de estabilidade de um sistema coloidal. Ele representa a carga de superfície e depende da natureza da partícula, assim como do meio que a envolve. A carga não pode ser medida diretamente, mas após a aplicação de um campo elétrico em torno dela. As partículas movem-se na presença deste campo elétrico em direção ao eletrodo de carga oposta e, desta forma, o ξ pode ser determinado pela medida da sua velocidade de migração

(MALVERN, 2004). Se as partículas em suspensão apresentarem valores de ξ elevados, tanto positivos quanto negativos, elas tenderão a se repelir, reduzindo as chances de agregação. Assim, normalmente consideram-se estáveis as suspensões que apresentem valores de ξ maiores, em módulo, que 25 mV (LIEBERMAN *et al.*, 1988).

O ξ das partículas foi avaliado logo após a preparação das suspensões de nanovesículas (tempo 0) e seus valores estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de ξ das suspensões de nanovesículas obtidos no tempo 0 (n=3).

Formulações	ξ (mV)	Formulações	ξ (mV)
L0	$-34 \pm 1,5$	Q0	$-30 \pm 1,7$
L1	$-28 \pm 0,8$	Q1	$-28 \pm 0,7$
L2	$-38 \pm 1,6$	Q2	$-32 \pm 6,8$
L3	$-38 \pm 2,0$	Q3	$-34 \pm 5,3$

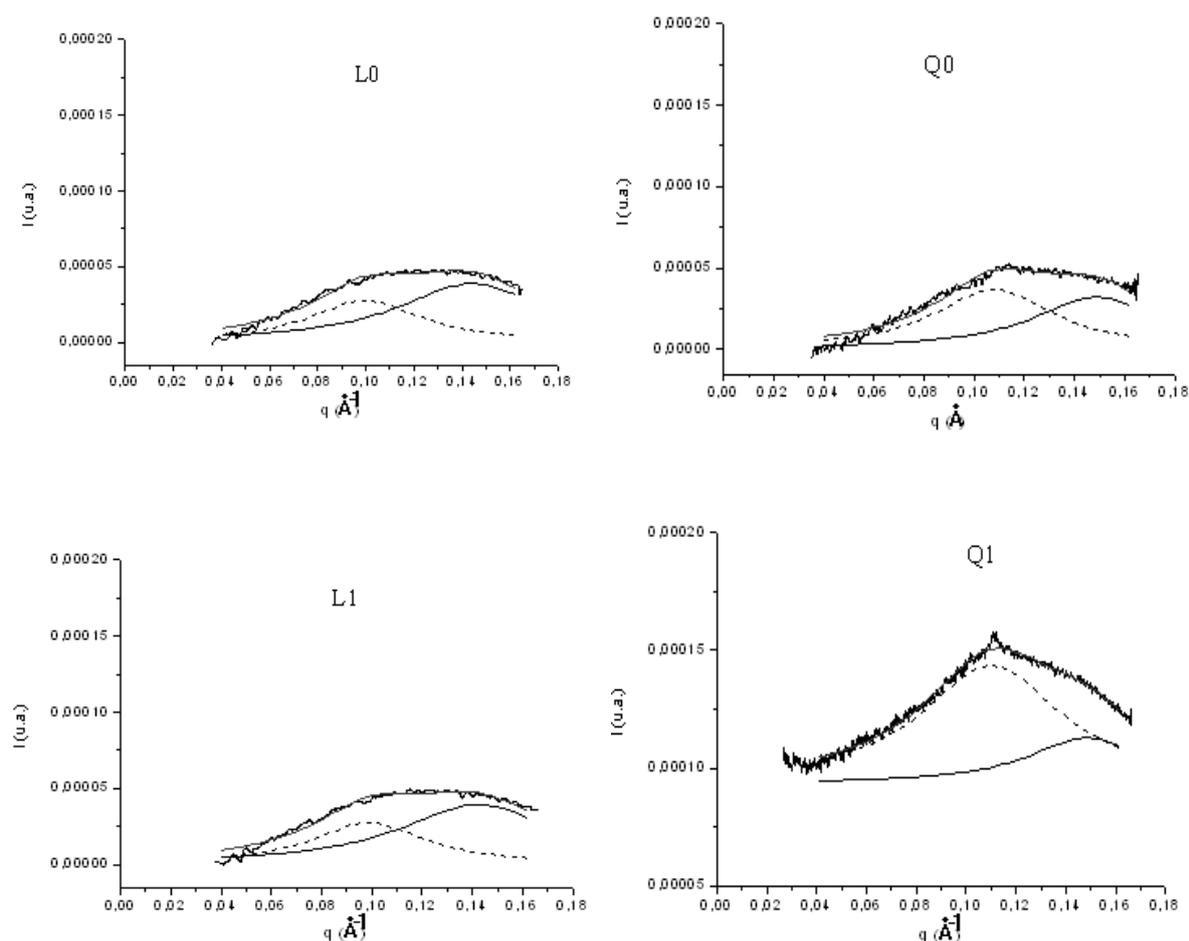
Observa-se que todas as formulações, inclusive as que possuem o biopolímero quitosana em sua composição (série Q), apresentaram valores negativos de ξ variando entre -28 mV a -38 mV, caracterizando-as como sistemas estáveis. A carga superficial negativa das nanovesículas deve-se, possivelmente, à presença do ácido fosfatídico da fosfatidilcolina, principal constituinte das nanovesículas. Nota-se, também, que nem a presença de MEL, nem a de quitosana influenciou os valores de ξ .

5.2.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Este método baseia-se na interação dos elétrons com a estrutura sob investigação. O espalhamento dos raios-X é caracterizado pela amplitude, que é diretamente proporcional à densidade eletrônica do sistema investigado e pela fase, que vai depender da localização dos centros de espalhamento na estrutura. As medidas

de raios-X ocorrem em um grande período de tempo comparado à escala de tempo associada à mobilidade dos átomos. Portanto, os padrões de difração dos raios-X informam sobre a organização da densidade eletrônica na amostra. Esta técnica permite, então, a obtenção de informações sobre os perfis da densidade eletrônica das bicamadas das vesículas, a localização de substâncias associadas a elas (fármacos, por exemplo) e permite uma estimativa do número médio de bicamadas das vesículas em suspensão (BOWSTRA *et al.*, 1993).

Abaixo (Figura 5) encontram-se os espectros de SAXS das suspensões de nanovesículas das séries L e Q, onde os perfis de espalhamento foram representados graficamente pela intensidade (I) em função de q .



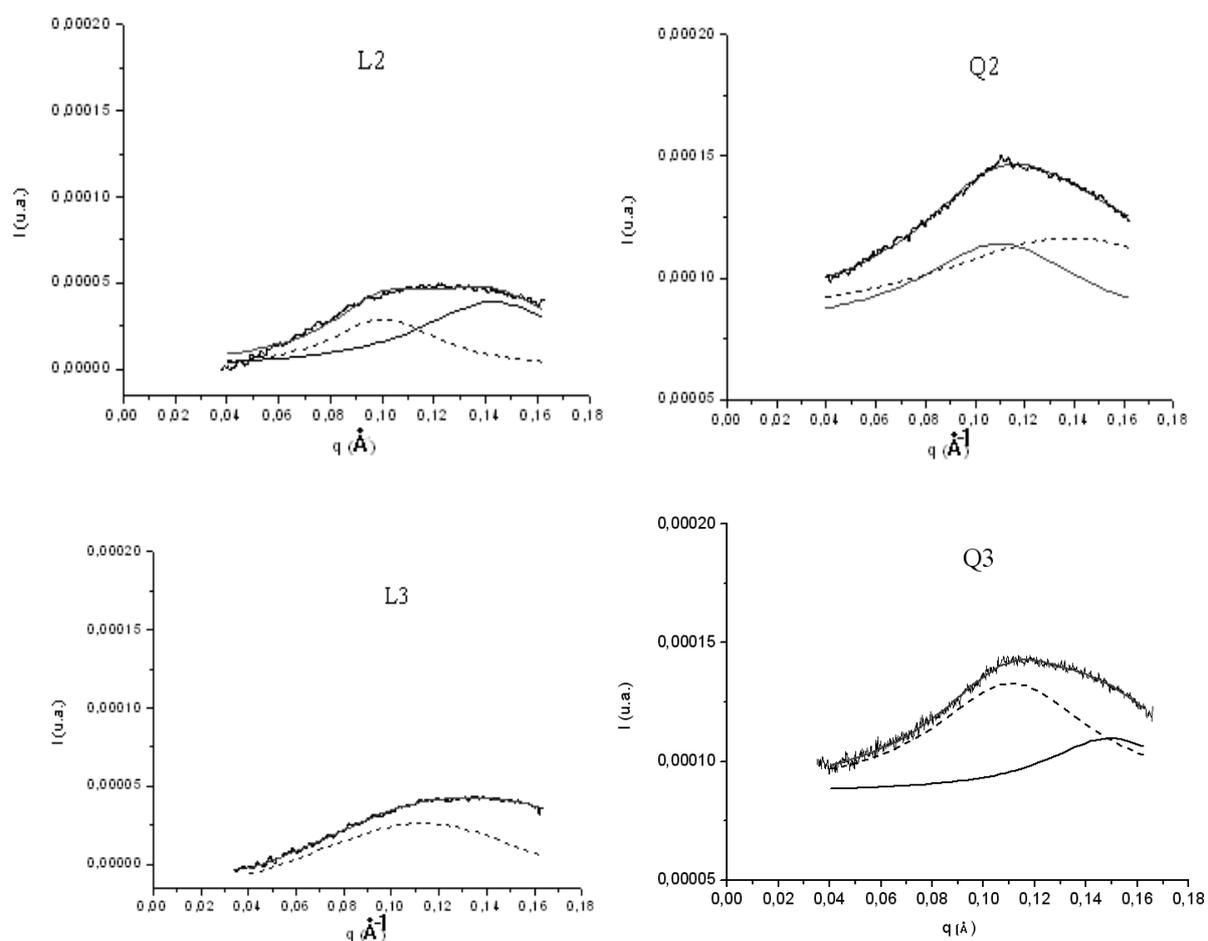


Figura 5. Espectros de SAXS das suspensões de nanovesículas das séries L e Q com aplicação de funções Lorentzianas. O espectro real é representado pela linha ruidosa, primeira Lorentziana (---) e segunda Lorentziana (—).

A análise dos espectros de SAXS com a aplicação de funções Lorentzianas permitiu a avaliação da estrutura lamelar das nanovesículas. Através do ajuste teórico foi possível a localização de duas curvas de espalhamento em praticamente todos os espectros, com exceção do espectro obtido com a amostra L3. A primeira Lorentziana está associada com o pico de Bragg, confirmando a presença de estruturas lamelares, enquanto a segunda corresponde ao fator forma, ou mais exatamente, a uma porção do espectro originado pela presença de estruturas esféricas em suspensão. Para as nanovesículas da série L pode-se observar uma maior contribuição da segunda Lorentziana, que corresponde ao fator forma, característico de estruturas unilamelares

esféricas (BOWSTRA *et al.*, 1993; MERTINS *et al.*, 2005; 2006), estando portanto de acordo com o método de preparação das nanovesículas neste trabalho. As nanovesículas da série Q apresentaram as funções Lorentzianas correspondentes ao pico de Bragg mais bem definidas que os da série L. Em 0,11 Å, para as amostras Q1 e Q2, observa-se inclusive um pequeno pico, sugerindo a presença de estruturas com mais de uma lamela (MERTINS *et al.*, 2005; 2006). Por outro lado, este pequeno pico não é observado em Q3, o que leva a crer que ocorreu uma saturação de fármaco nesta amostra, provocando uma desestruturação do sistema lamelar.

O enaltecimento do pico de Bragg na série Q, bem como as intensidades mais elevadas observadas para estes espectros, quando comparados aos espectros da série L, sugerem que a MEL encontra-se adsorvida na quitosana presente na região lamelar destas nanovesículas. Já a MEL encapsulada nas nanovesículas da série L, provavelmente, encontra-se adsorvida à membrana destas nanoestruturas.

Perfis de difração bem definidos denotam estruturas rígidas e de alta organização molecular resultante da sobreposição das bicamadas. Fang e colaboradores (2001) relataram a formação de estruturas multilamelares na presença de quitosana em que esta interagia com as caudas apolares da fosfatidilcolina. Pode-se inferir, portanto, que a quitosana tende a aumentar a fração de estruturas multilamelares nas suspensões de nanovesículas.

Os perfis de difração de estruturas unilamelares, como os observados acima, relacionam-se a uma certa dinâmica da monocamada, que sofre alterações constantes devido à força de difusão na água produzindo um espalhamento incoerente e de intensidade difusa. Na Tabela 8 estão os dados obtidos pela análise dos espectros de SAXS.

Tabela 8. Valores de raio hidrodinâmico (R_h) obtidos por espalhamento de luz dinâmico, potencial zeta (ξ), espessura da bicamada (d), diâmetro médio do núcleo aquoso (D) e volume médio encapsulado (V) das suspensões de nanovesículas.

Formulação	R_h (nm)	ξ (mV)	$d \pm \Delta$ (nm)	D (nm)	V (cm ³)
L0	110	-30	$6,3 \pm 0,1$	207	$4,67 \times 10^{-15}$
L1	148	-27	$6,4 \pm 0,1$	283	$1,19 \times 10^{-14}$
L2	137	-34	$6,2 \pm 0,1$	262	$9,36 \times 10^{-15}$
L3	122	-34	$5,6 \pm 0,8$	233	$6,61 \times 10^{-15}$
Q0	191	-31	$5,8 \pm 0,1$	359	$2,42 \times 10^{-14}$
Q1	142	-31	$5,7 \pm 0,1$	261	$9,33 \times 10^{-15}$
Q2	161	-30	$5,7 \pm 0,1$	299	$1,40 \times 10^{-14}$
Q3	158	-31	$5,7 \pm 0,1$	293	$1,32 \times 10^{-14}$

As espessuras das bicamadas das nanovesículas da série L foram superiores as da série Q, provavelmente devido ao confinamento da fosfatidilcolina pelo polímero. Resultados semelhantes foram obtidos por Mertins e colaboradores (2005; 2006), em que a espessura das nanovesículas contendo quitosana (6,5 nm) foi ligeiramente inferior que a das nanovesículas sem quitosana (6,6 nm). Pela análise do organogel precursor destas nanovesículas, os autores verificaram que a quitosana pode provocar uma maior interação entre as cadeias polares das moléculas de fosfatidilcolina, fornecendo a energia que leva à redução da espessura das bicamadas.

Os resultados expressos na Tabela 8 combinam dados obtidos pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico e SAXS. Para o cálculo de D , considerou-se o número médio de bicamadas $\langle N \rangle$ para série L igual a 1 e para série Q igual a 2, tendo em vista os perfis de espalhamento de raios-X das amostras, bem como os resultados obtidos por Mertins *et al*, 2005.

Os valores de D e V demonstraram um grande volume aquoso encapsulado no núcleo das nanovesículas e estes se apresentaram superiores nas amostras da série Q,

estando de acordo com resultados obtidos por espalhamento de luz. A quitosana, portanto, originou nanovesículas de Rh, D e V relativamente maiores e com um menor d . Além disso, este polímero mostrou uma leve tendência em gerar nanovesículas multilamelares nas amostras analisadas (da série Q).

5.2.5 Quantificação de MEL e eficiência de encapsulação

O teor médio de MEL presente nas nanovesículas foi próximo a 100 % para todas as formulações no tempo 0. A validação da metodologia analítica para quantificação de MEL presente nas suspensões de nanovesículas encontra-se descrita no Anexo 1.

Os valores de eficiência de encapsulação (EE %) obtidos pela análise das formulações de nanovesículas contendo diferentes concentrações de MEL estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de eficiência de encapsulação das formulações contendo diferentes concentrações de MEL.

Formulações	EE (%)	Formulações	EE (%)
L1	34,9	Q1	31,4
L2	60,8	Q2	48,8
L3	56,5	Q3	56,5

Os valores de EE das suspensões de nanovesículas contendo MEL variaram de 31,4 % a 60,8 % estando condizentes com os resultados obtidos na literatura para lipossomas convencionais e elásticos (DUBEY *et al.*, 2006). Observa-se que as nanovesículas que possuíam uma menor concentração de MEL apresentaram uma menor EE possivelmente devido ao fato de que o sistema ainda não havia atingido a sua saturação. As formulações L3 e Q3 possuíam a maior concentração de MEL e, no entanto, apresentaram valores de EE inferiores à L2. De acordo com os resultados

observados nos espectros de SAXS, pode-se notar uma leve redução nas intensidades de espalhamento destas amostras e isso pode ter ocorrido devido à saturação do sistema em relação a MEL presente nestas nanovesículas, o que provocou uma desorganização na bicamada das mesmas.

5.2.6 Estabilidade frente ao armazenamento

Os parâmetros avaliados na estabilidade das formulações foram: diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ξ) e teor (%) de MEL presente nas suspensões de nanovesículas. A estabilidade foi avaliada a partir dos dias 0, 30, 60 e 90 de armazenamento à temperatura ambiente. Os resultados estão expressos nas Figuras 6, 7, 8 e 9.

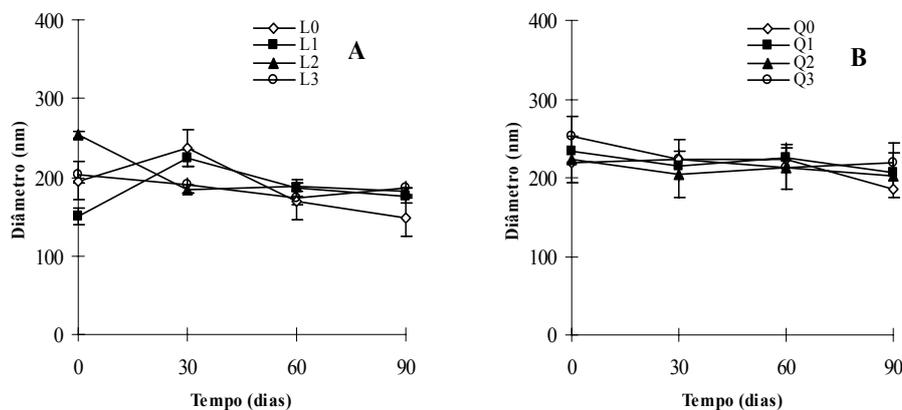


Figura 6. Diâmetros médios das formulações das séries L (A) e Q (B) contendo, ou não, MEL nos dias 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento. Os resultados representam média \pm DP (n=3).

Os diâmetros médios das nanovesículas da série L apresentaram-se variáveis ao longo de 90 dias de armazenamento apresentando, de forma geral, uma redução nos tamanhos de partículas no final deste período. Na formulação L0 não houve alterações significativas nos diâmetros médios. L1 apresentou alterações significativas de diâmetros observadas entre os dias 0 e 30 e entre 30 e 90 ($p < 0,05$). L2 apresentou

alterações significativas entre 0 e 30, 60, 90 dias ($p < 0,05$). L3 não mostrou diâmetros médios variáveis significativos.

As nanovesículas da série Q não apresentaram variabilidade significativa nos diâmetros médios durante os 90 dias de armazenamento. Este resultado sugere que a quitosana promoveu uma maior estabilidade no sistema nanovesiculado.

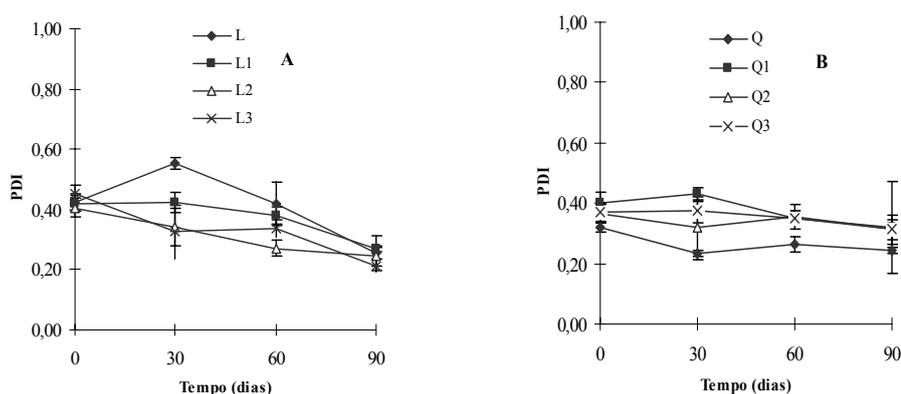


Figura 7. Índices de polidispersão (PDI) das formulações das séries L (A) e Q (B) contendo, ou não, MEL nos dias 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento. Os resultados representam média \pm DP ($n=3$).

Os valores de PDI da série L apresentaram uma maior variabilidade durante os 90 dias de armazenamento, podendo-se notar uma redução da PDI em todas as formulações. L0 mostrou alterações significativas nos valores de PDI nos dias 30 e 90 ($p < 0,05$), L1 entre os dias 0 e 90 e 60 e 90 ($p < 0,05$), L2 entre 0 e 60 e 0 e 90 ($p < 0,05$) e L3 entre 0 e 30, 60, 90, entre 30 e 90 e entre 60 e 90 dias ($p < 0,05$).

Por outro lado, as formulações da série Q não apresentaram alterações significativas nos valores de PDI durante os 90 dias de armazenamento, reforçando a hipótese de que o polímero estaria agindo no sentido de estabilizar as suspensões de nanovesículas.

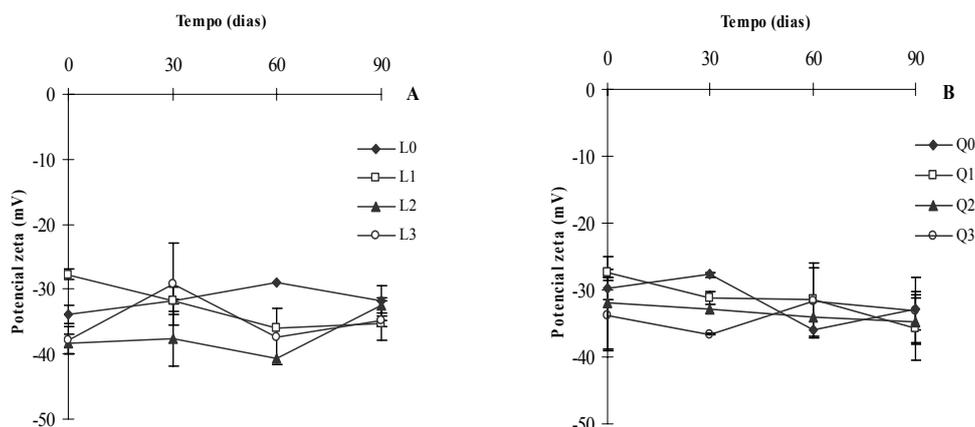


Figura 8. Valores de potencial zeta das formulações das séries L (A) e Q (B) contendo, ou não, MEL nos dias 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento. Os resultados representam média \pm DP (n=3).

Observou-se que durante os 90 dias de armazenamento os valores de ξ , tanto para as formulações da série L quanto para as formulações da série Q, não apresentaram diferenças significativas. Os valores de ξ dos colóides permaneceram negativos concentrando-se na faixa de -27 mV e -36 mV, caracterizando-os como formulações estáveis.

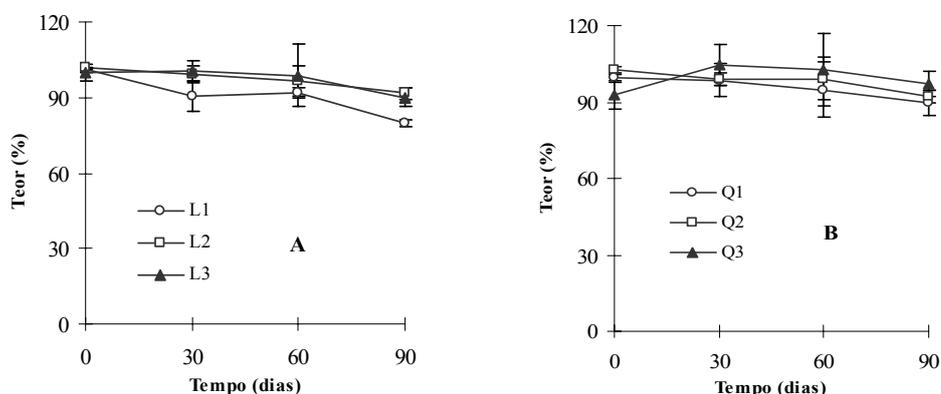


Figura 9. Valores de teor (%) das formulações das séries L (A) e Q (B) contendo MEL nos dias 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento. Os resultados representam média \pm DP (n=3).

Os teores de MEL das suspensões de nanovesículas das séries L e Q resultantes de 90 dias de armazenamento não apresentaram alterações significativas. Todas as suspensões de L e Q apresentaram um teor de MEL no tempo 0 em torno de 100 % e, no final de 90 dias, apresentavam os seguintes teores de MEL: L1 (80 % \pm 1,3), L2 (92 % \pm 2,2), L3 (90 % \pm 3,9), Q1 (90 % \pm 5,0), Q2 (92 % \pm 2,6) e Q3 (97 % \pm 5,1).

5.2.7 Avaliação morfológica

A análise morfológica da suspensão de nanovesículas Q0 foi realizada por MET com aumentos de 20.000 e 50.000 vezes (Figura 10).

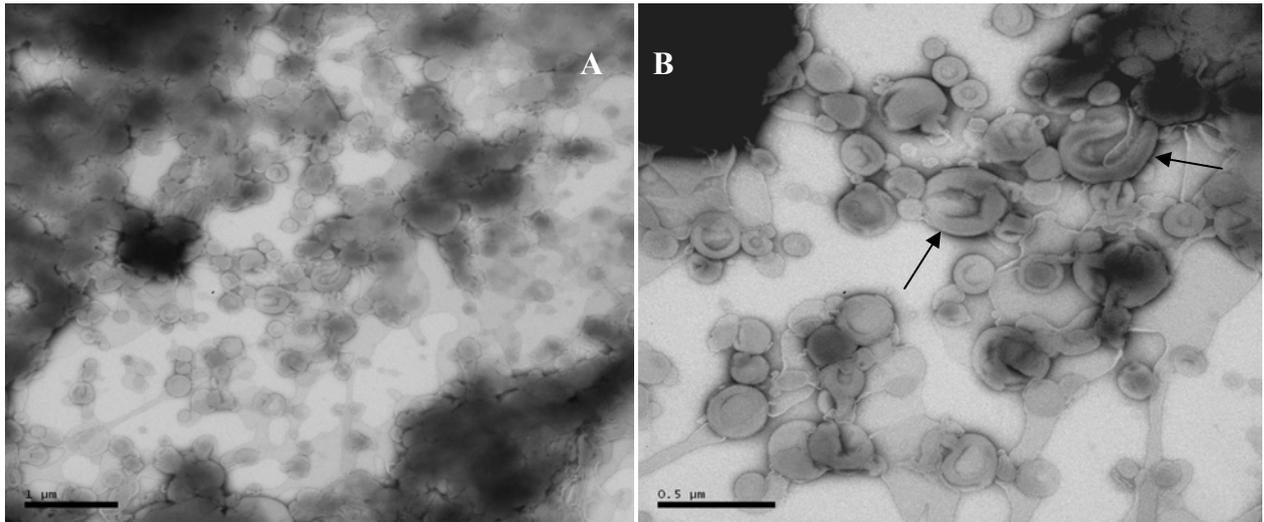


Figura 10. Fotomicrografias obtidas por MET da suspensão de nanovesículas Q0 em diferentes aumentos (A) 20.000x e (B) 50.000x.

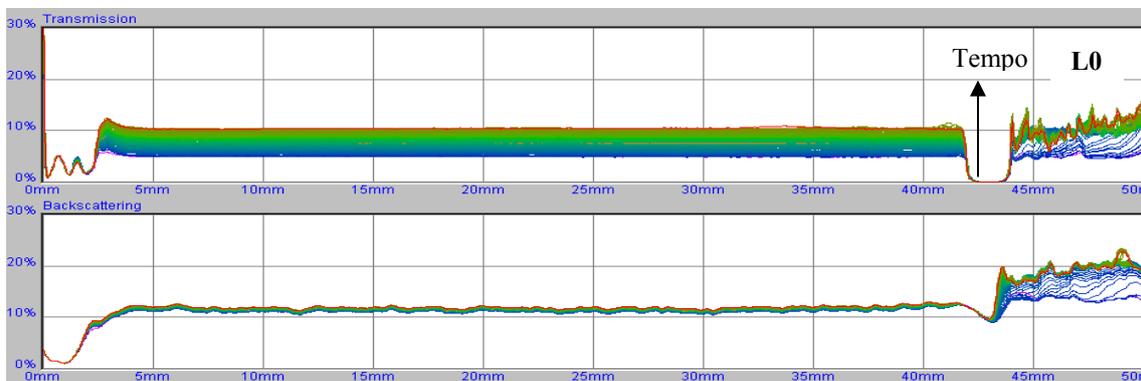
Analisando as fotomicrografias da suspensão Q0, observam-se estruturas esféricas com a bicamada lipídica bem delimitada, apresentando coloração escura nas bordas externas e centrais, provavelmente devido à deposição de quitosana. As nanoestruturas apresentam diâmetros médios em torno de 150 nm e 250 nm. O diâmetro médio destas nanovesículas, determinado por espalhamento de luz dinâmico em Zetasizer[®], foi 268 nm e a de PDI 0,4, o que justifica a visualização de mais de uma população. Verifica-se que o diâmetro obtido através da técnica de espalhamento de luz dinâmico foi superior ao visualizado através de MET. Isto se deve à técnica de espalhamento de luz, em que o diâmetro obtido representa o raio hidrodinâmico da partícula.

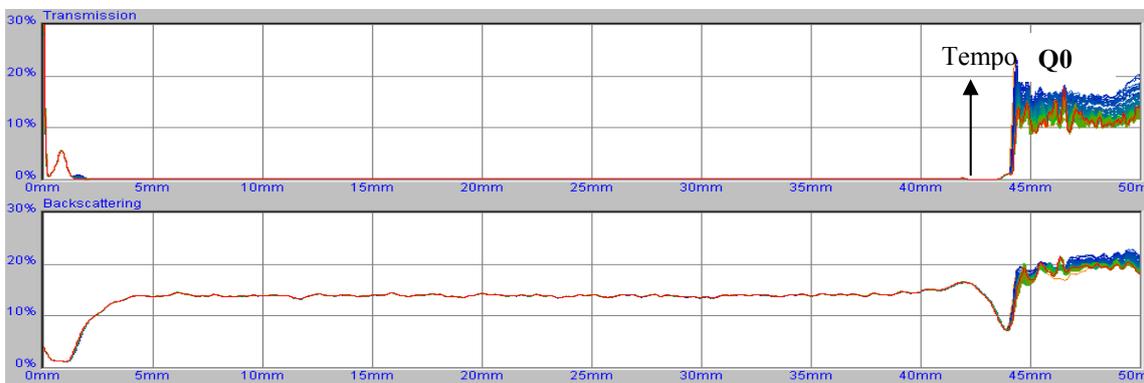
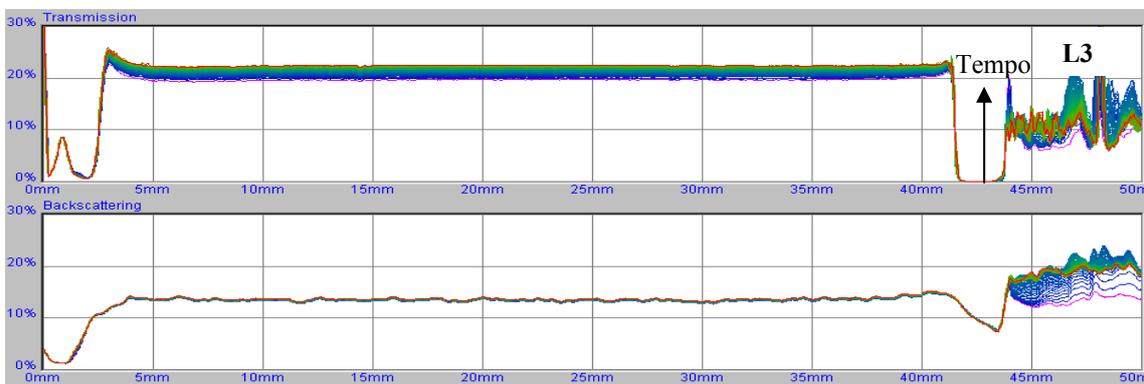
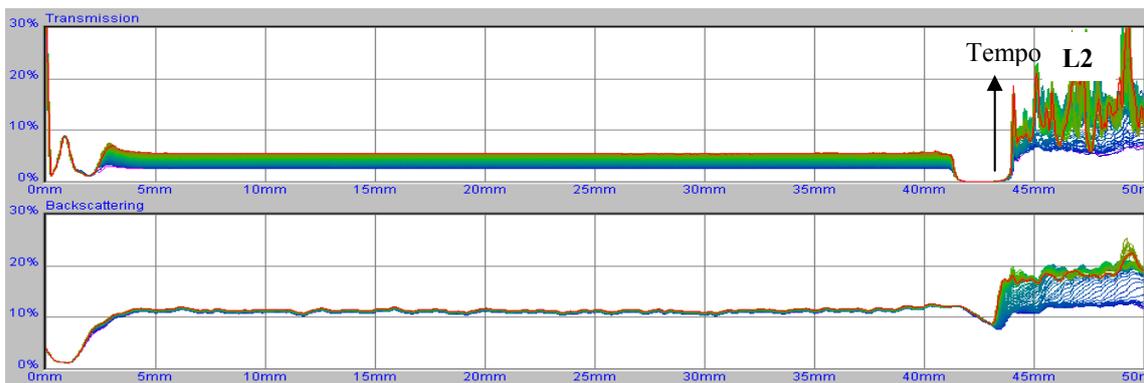
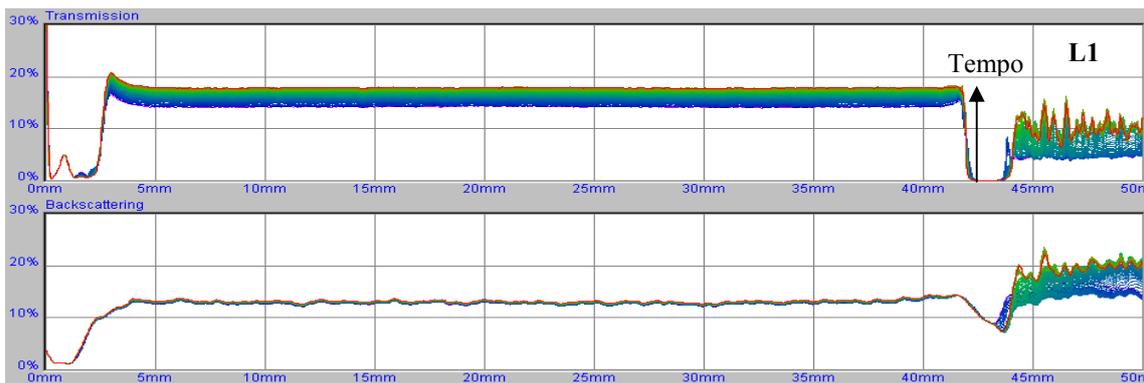
Algumas nanovesículas apresentaram invaginações (Figura 10B, indicadas pelas setas), situação semelhante à verificada por Johnsson (2001). De acordo com o autor, invaginações nas nanovesículas podem ocorrer pela pressão osmótica ocasionada pelo aumento da concentração de sal (neste caso, o agente de contraste acetato de uranila) na amostra devido à evaporação da suspensão durante o período de preparação do *grid*.

5.2.8 Análise de fenômenos de instabilidade via Turbiscan LAB[®]

O analisador óptico, Turbiscan, tem sido empregado no estudo de estabilidade de emulsões e dispersões coloidais concentradas. Dentre as vantagens apresentadas por este equipamento, destaca-se a detecção de possíveis fenômenos de instabilidade muito antes que estes sejam detectados por observação visual do analista, especialmente no caso de sistemas opacos e concentrados. Em sistemas opacos as destabilizações serão visualizadas através de alterações no retroespalhamento de luz (*backscattering*) e em sistemas translúcidos será visualizado através de alterações nas medidas de transmissão da luz. A destabilização de uma suspensão frequentemente se deve a dois tipos de fenômenos físicos: variação no tamanho de partícula (coalescência) e agregação de partículas (floculação) e a migração das partículas (cremagem ou sedimentação) (MENGUAL *et al.*, 1999; LEMARCHAND *et al.*, 2003).

A Figura 11 apresenta os gráficos resultantes das análises de fenômenos de instabilidade das suspensões de nanovesículas das séries L e Q utilizando Turbiscan LAB[®], sob condições analíticas descritas no item 4.2.2.10.





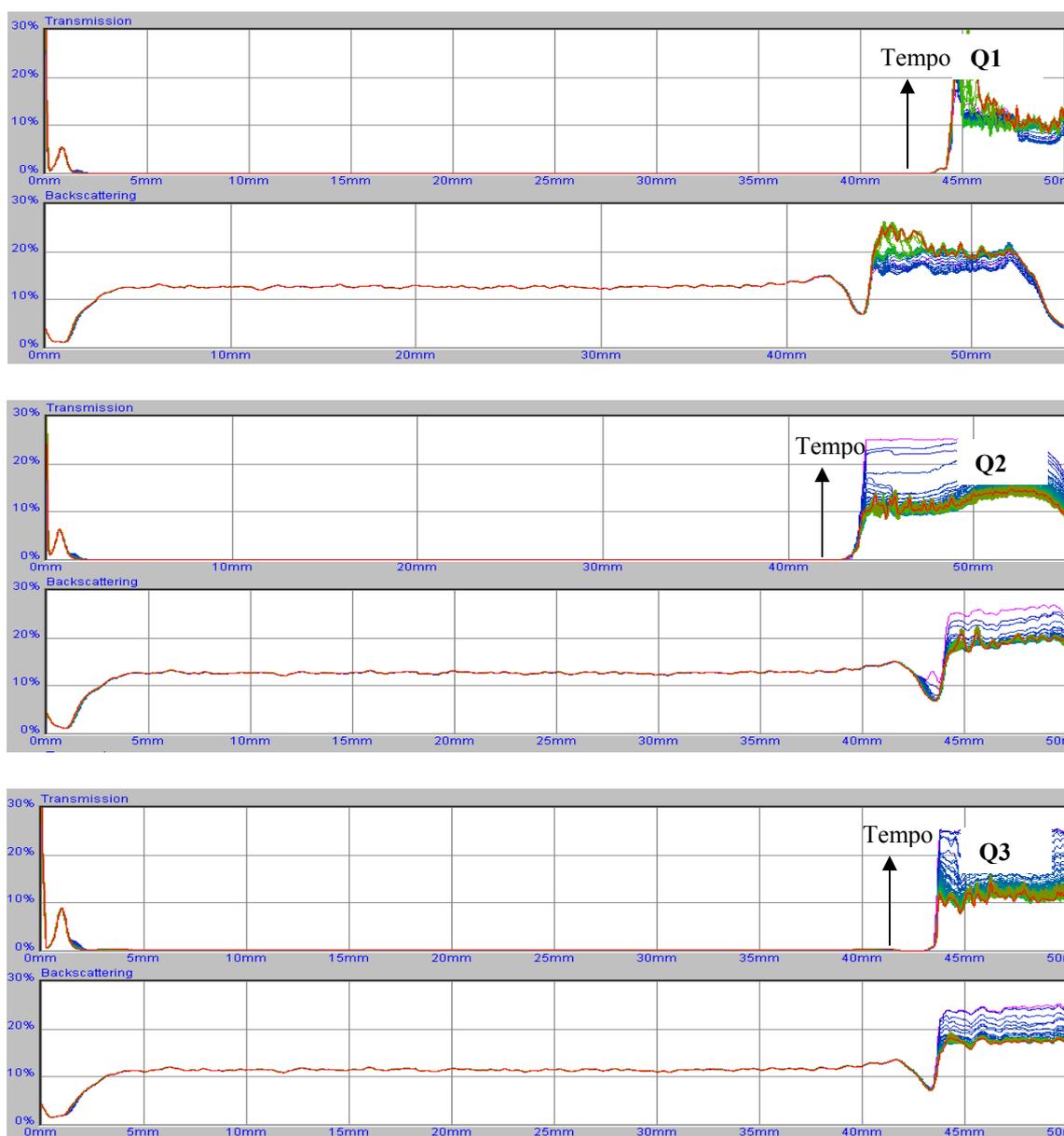


Figura 11. Gráficos de transmissão (T) e *backscattering* (BS) (%) das suspensões L0, L1, L2, L3, Q0, Q1, Q2 e Q3 obtidos em um período de 24 h à 25°C. Os dados encontram-se expressos em função da altura do porta-amostras (0-50 mm), onde 0 mm corresponde o fundo e 50 mm corresponde o topo do porta-amostras. O sentido do tempo de análise é indicado pela seta.

Observando os gráficos da série L, verifica-se que o sinal de transmissão (T) não é nulo e, portanto, a reflexão parcial da luz que atravessa a parede do porta-amostra e a amostra interferem no sinal de *backscattering* (BS). Sendo assim, somente os sinais de T deverão ser avaliados (LEMARCHAND *et al.*, 2003). Em todas as suspensões de nanovesículas ocorreu um aumento na intensidade de transmissão ao longo de 24 h e o sinal de BS permaneceu constante, indicando que não ocorrera

fenômenos de cremagem e de sedimentação (LEMARCHAND *et al.*, 2003). Todos os gráficos apresentaram o mesmo perfil, porém, intensidades de T diferentes. No final de 24 h de *scanning*, a suspensão L0 apresentou intensidade de T em torno de 10 %, L1 um valor pouco abaixo de 20 %, L2 um valor pouco abaixo de 10 % e L3 apresentou valor de T pouco acima de 20 %. Os aumentos, ainda que discretos, das intensidades de T observadas nos gráficos referentes às suspensões da série L sugerem uma tendência à redução do tamanho de partícula, fato também observado no estudo de estabilidade do diâmetro médio de partícula, conduzido por espalhamento de luz dinâmico, das mesmas.

Os gráficos referentes às suspensões da série Q apresentam o mesmo perfil, onde o sinal de BS (em torno de 10 %) permaneceu constante durante as 24 h de análise. A ausência de qualquer outro sinal indicativo de fenômenos instabilidade evidencia a estabilidade destas formulações, apontando a influência da quitosana na organização e estruturação das nanovesículas presentes nas suspensões.

5.3 Caracterização dos hidrogéis

5.3.1 Determinação do pH

Na Tabela 11 encontram-se os valores de pH dos hidrogéis analisados após a preparação.

Tabela 11. Valores de pH dos hidrogéis. Os resultados estão expressos como a média \pm DP (n=3).

Géis	pH	Géis	pH
B0	6,6 \pm 0,28	BMEL	6,7 \pm 0,11
L0	6,6 \pm 0,07	L2	6,3 \pm 0,33
Q0	6,1 \pm 0,36	Q2	6,1 \pm 0,19

Todos os hidrogéis apresentaram valores de pH semelhantes, variando entre 6,1 e 6,7, indicando que a incorporação das suspensões de nanovesículas, contendo ou não MEL e da MEL livre, não provocou alterações no pH original do hidrogel de hidroxietilcelulose clássico (B0, pH 6,6). Uma vez que o pH da pele varia de 4,0 a 7,0, estes hidrogéis se mostram adequados para aplicação cutânea (BARATA, 2002).

5.3.2 Quantificação de MEL nos hidrogéis

Os doseamentos de MEL a partir dos hidrogéis apresentaram os seguintes teores (%) de fármaco: BMEL (100,2 %), L2 (101,3 %) e Q2 (101,5 %). Os ensaios foram conduzidos conforme o item 4.2.3.2 utilizando metodologia previamente validada.

5.3.3 Distribuição do diâmetro médio de partículas presentes nos hidrogéis

Os gráficos da distribuição dos diâmetros médios de partículas presentes nos hidrogéis são apresentados na Figura 12. Os dados foram plotados relacionando o número de partículas (%) em função de seus diâmetros (nm).

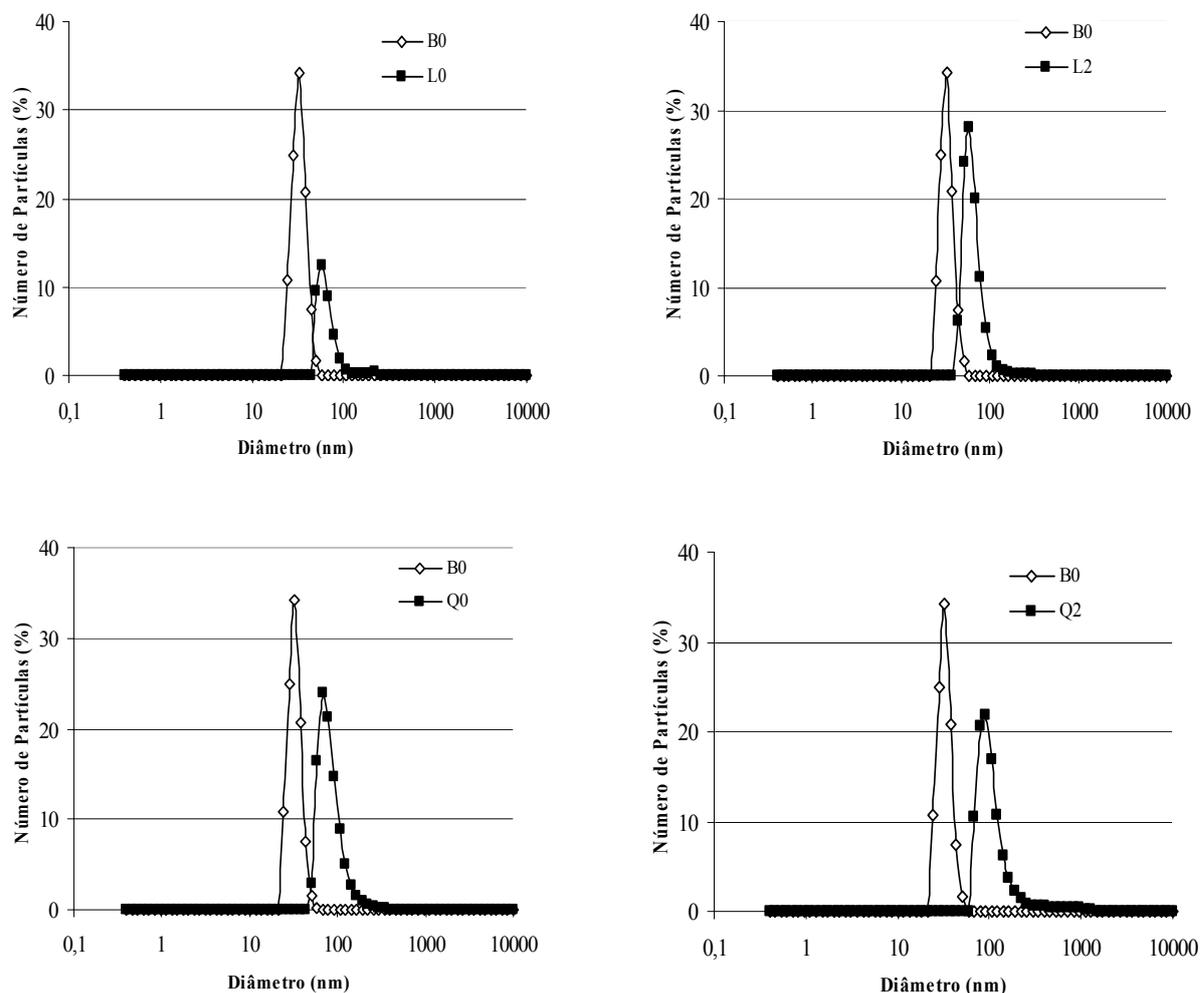


Figura 12. Comparação entre as distribuições dos diâmetros médios de partícula das nanovesículas incorporadas em hidrogéis (L0, L2, Q0, Q2) em relação ao hidrogel branco (B0).

A distribuição dos diâmetros médios de partículas das nanovesículas obtidos a partir das análises dos hidrogéis demonstra similaridade ao intervalo de diâmetros médios de partícula das suspensões de nanovesículas antes da incorporação destas aos hidrogéis. Nota-se que a distribuição do diâmetro da formulação branca não se sobrepôs à distribuição dos diâmetros das formulações contendo os nanossistemas, confirmando a presença das nanovesículas após a incorporação nos hidrogéis.

5.3.4 Avaliação da viscosidade

A determinação das propriedades reológicas de um sistema pode contribuir para a avaliação da influência que os processos de fabricação, bem como, dos componentes utilizados exercem na preparação de formulações e, também, para otimizar o desenvolvimento de novos produtos (BRUMMER e GODERSKY, 1999). Os estudos reológicos podem fornecer informações reais e versáteis sobre as propriedades estruturais de diferentes formas farmacêuticas e cosméticas utilizadas topicamente (ALVES, 2006).

A hidroxietilcelulose (Natrosol[®]) é formada a partir da reação da celulose com o óxido de etileno e vem sendo amplamente utilizada como agente suspensor e estabilizante, agente de consistência para emulsões e agente formador de gel não-iônico. Dentre as suas propriedades físico-químicas destacam-se a estabilidade em uma ampla faixa de pH (a viscosidade sofre pequenas alterações entre pH 2-12), a compatibilidade com substâncias aniônicas, não-iônicas, anfotéricas e catiônicas, a possibilidade de obtenção do gel tanto à frio quanto à quente e não requer a utilização de neutralizantes. Comporta-se como fluido não-newtoniano com perfil reológico pseudoplástico (BRAUN e ROSEN, 2000). As características citadas acima foram determinantes para a escolha da hidroxietilcelulose como base para a incorporação das suspensões de nanovesículas das séries L e Q, uma vez que, estas são termosensíveis e, portanto, a possibilidade de preparação à frio se torna interessante. Os comportamentos reológicos dos géis são apresentados na Figura 13.

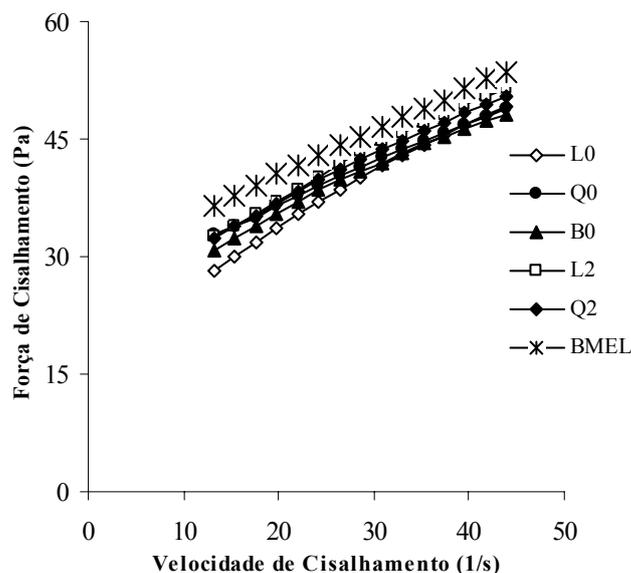


Figura 13. Perfis reológicos dos hidrogéis descritos pelo modelo de Ostwald.

Analisando os reogramas, observa-se que as bases semi-sólidas, preparadas à base de gel não iônico, contendo diferentes sistemas apresentaram comportamento reológico pseudoplástico e estiveram de acordo com modelo descrito por Ostwald.

Nota-se que a incorporação das suspensões de nanovesículas (L0, L2, Q0 e Q2), em total substituição à água, para obtenção dos hidrogéis não alterou o comportamento pseudoplástico original característico do hidrogel de Natrosol[®] (B0). Na Tabela 12 estão descritos os valores dos coeficientes de regressão linear e os parâmetros característicos do modelo de Ostwald.

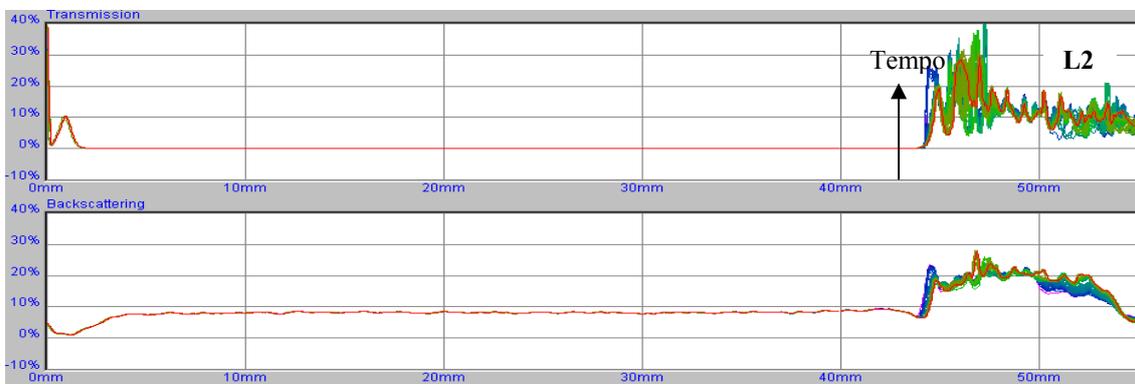
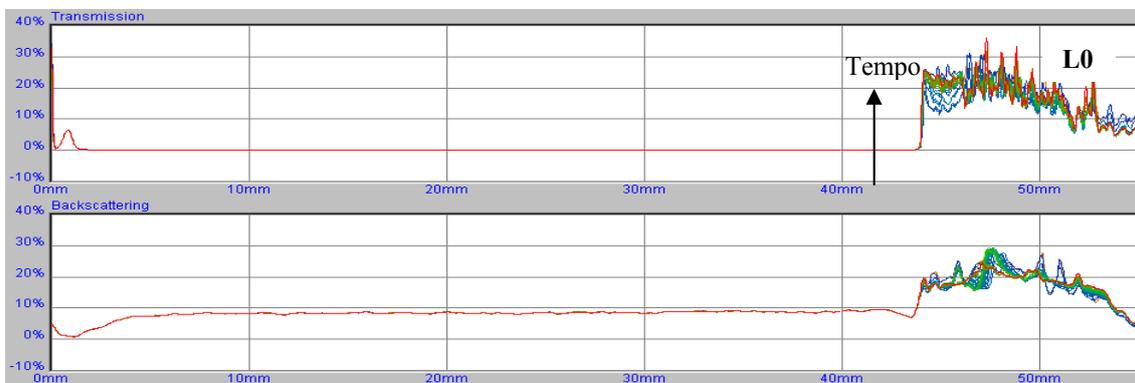
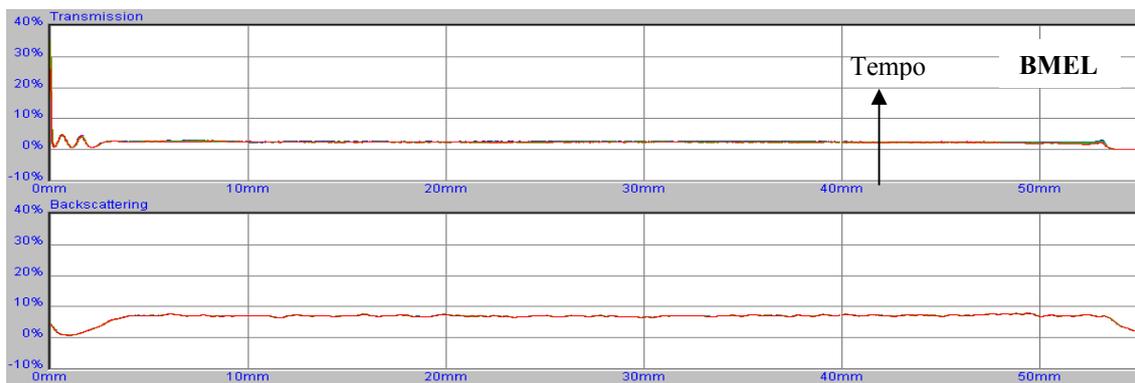
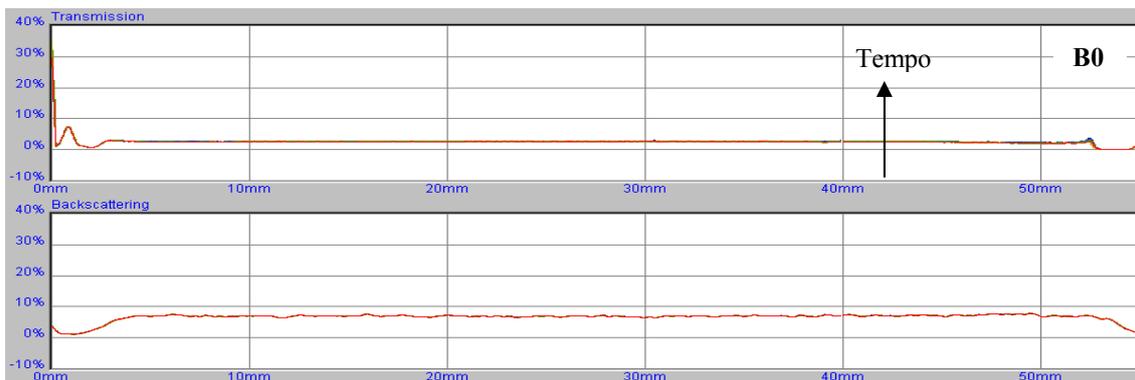
Tabela 12. Valores dos coeficientes de regressão linear (R^2), índices de escoamento (n) e de consistência (K) dos hidrogéis obtidos a partir de seus perfis reológicos. Os valores estão expressos como média \pm DP ($n=3$).

Géis	R^2	n	K (Pa.s ⁿ)
B0	0,9994 \pm 0,0002	0,38 \pm 0,02	11,11 \pm 1,08
BMEL	0,9896 \pm 0,0008	0,31 \pm 0,04	12,61 \pm 0,56
L0	0,9990 \pm 0,0003	0,41 \pm 0,01	11,25 \pm 1,67
L2	0,9963 \pm 0,0071	0,39 \pm 0	11,53 \pm 0,59
Q0	0,9983 \pm 0,0009	0,34 \pm 0,04	11,13 \pm 1,66
Q2	0,9969 \pm 0,0009	0,38 \pm 0,01	12,02 \pm 0,45

Os valores dos coeficientes de regressão linear obtidos a partir das equações da reta dos hidrogéis foram superiores a 0,99 para todos os géis analisados. Os índices de escoamento (n) obtidos foram inferiores a 1, estando de acordo com as características de fluidos pseudoplásticos e os índices de consistência (K) não apresentaram diferenças significativas com a adição das suspensões de nanovesículas das séries L e Q e da MEL livre aos hidrogéis. Ressalta-se, portanto, a adequação do comportamento reológico destes hidrogéis ao modelo pseudoplástico descrito por Ostwald.

5.3.5 Análise de fenômenos de instabilidade via Turbiscan *LAB*[®]

As formulações semi-sólidas foram submetidas a análises em Turbiscan *LAB*[®] com o objetivo de verificar a homogeneidade e estabilidade das mesmas. Os hidrogéis contendo as suspensões de nanovesículas das séries L e Q apresentaram uma coloração esbranquiçada/amarelo pálido e translúcida (coloração característica das suspensões de nanovesículas). O hidrogel contendo MEL livre (BMEL) e o hidrogel branco (B0) apresentaram coloração transparente. Os gráficos de T e BS dos hidrogéis obtidos sob condições analíticas descritas no item 4.2.3.5 são mostrados na Figura 14.



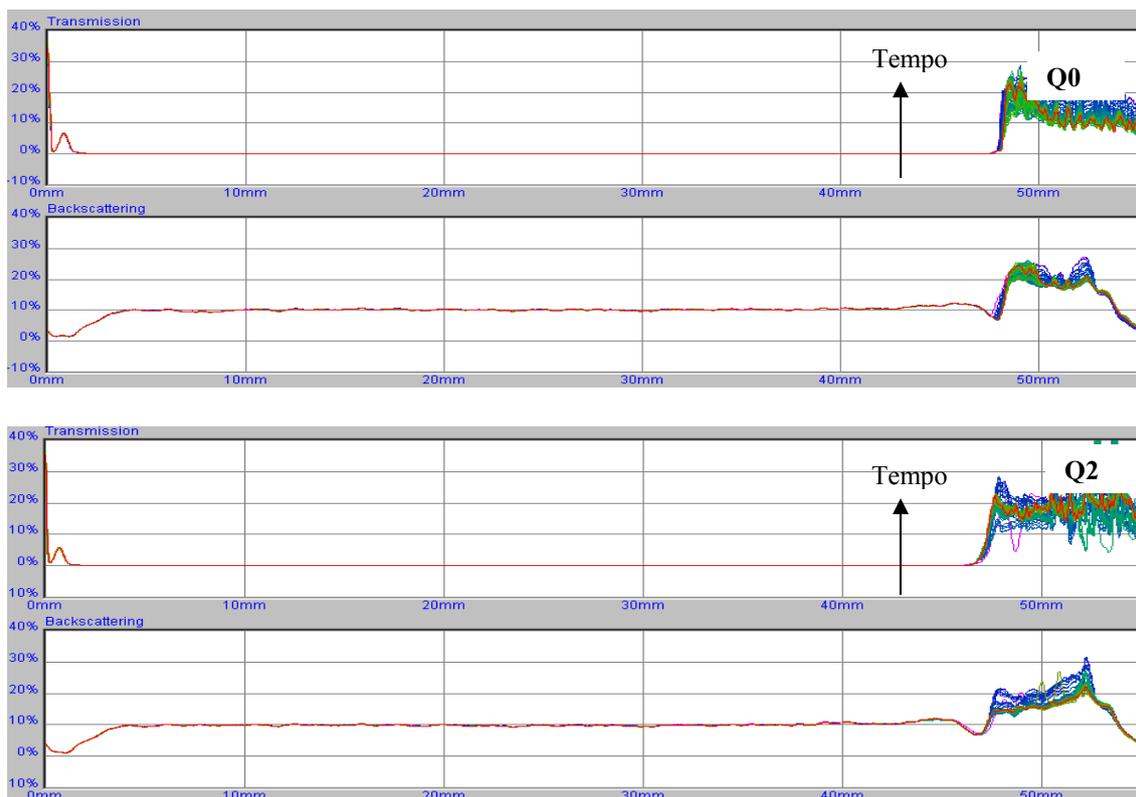


Figura 14. Gráficos de transmissão (T) e *backscattering* (BS) (%) dos hidrogéis B0, BMEL, L0, L2, Q0 e Q2 obtidos em um período de 24 h à 25°C. Os dados encontram-se expressos em função da altura do porta-amostras (0-50 mm), onde 0 mm corresponde o fundo e 50 mm corresponde o topo do porta-amostras. O sentido do tempo de análise é indicado pela seta.

A partir da análise dos gráficos de turbiscan, observa-se uma similaridade nos perfis e nos valores de BS , que ficaram em torno de 10 % durante todo o período de análise para as amostras dos hidrogéis L0, L2, Q0 e Q2. Os gráficos dos hidrogéis B0 e BMEL, por serem transparentes, apresentaram valores de ΔT em torno de 3 %, que permaneceram constantes ao longo do período de análise. Não foram detectados sinais indicativos de instabilidade nos hidrogéis analisados sendo considerados, portanto, estáveis.

5.4 Ensaios de estresse oxidativo

Estresse oxidativo (EO) é o termo geralmente utilizado para descrever os danos causados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) que causam danos à estrutura das biomoléculas (DNA), lipídios, carboidratos e

proteínas, além de outros componentes celulares. O nível de EO é determinado pelo balanço entre a atividade pró-oxidante e a atividade antioxidante do organismo. Sendo assim, pode-se dizer que o EO surge a partir do desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, resultando em um aumento da formação de radicais livres e de injúrias oxidativas. As ERO podem ser geradas de forma endógena, durante o metabolismo celular, ou de forma exógena, durante exposição ao álcool, tabagismo, drogas, raios UV, entre outras (URSO e CLARKSON, 2003).

O mecanismo pró-oxidante inclui radicais livres, tais como o ânion superóxido, o radical hidroxil, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete. Um dos principais mecanismos de lesão celular relativos ao EO é a lipoperoxidação, que se relaciona com a oxidação da camada lipídica das membranas celulares. Além disso, o EO pode gerar danos ao DNA, às proteínas e também tem implicações na patogênese de várias doenças em humanos, que incluem doença de Alzheimer, diabetes, hipercolesterolemia, síndrome hepatorenal, entre outras, além de estar envolvido no processo normal de envelhecimento. No sistema cardiovascular, o EO contribui para o início e a progressão de doenças como a hipertensão, a aterosclerose, a hipertrofia cardíaca e o infarto no miocárdio (URSO e CLARKSON, 2003).

Como as substâncias pró-oxidantes são constantemente formadas em pequenas quantidades no metabolismo normal, as células possuem mecanismos para evitar o desequilíbrio oxidativo e, assim, impedir o dano causado pelos mecanismos agressores (URSO e CLARKSON, 2003). Salienta-se que a composição das defesas antioxidantes difere quanto ao tecido, ao tipo de célula e, possivelmente, entre células do mesmo tipo, em um dado tecido, sendo dividida em dois sistemas: o enzimático e o não enzimático (DERESZ *et al.*, 2007).

O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já o não enzimático inclui substâncias sintetizadas pelo organismo, como a bilirrubina, a ceruloplasmina, os hormônios sexuais, a MEL, a coenzima Q e o ácido úrico. Além disso, outros antioxidantes são ingeridos através da dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C), o

α -tocoferol (vitamina E), o β -caroteno e os flavonóides (URSO e CLARKSON, 2003; DERESZ *et al.*, 2007).

5.4.1 Níveis de radicais livres (DCF)

A oxidação de DCFH (2', 7'-diclorofluoresceína) a DCF (2', 7'-diclorofluoresceína), um produto fluorescente resultante da oxidação de DCFH, é um indicador bastante sensível que tem sido utilizado para medir o nível de estresse oxidativo nas células. Foi demonstrado que a DCFH-DA (2', 7'-diclorofluoresceína diacetato) pode rapidamente atravessar as membranas e ser hidrolizada por esterases intracelulares a DCFH (não fluorescente). Na presença de ERO, a DCFH é oxidada ao produto altamente fluorescente DCF (LEBEL *et al.*, 1992).

No presente trabalho, os níveis de DCF foram avaliados em peles da região dorsal de camundongos submetidos à radiação UVA e a diferentes tratamentos. Os resultados são mostrados na Figura 15.

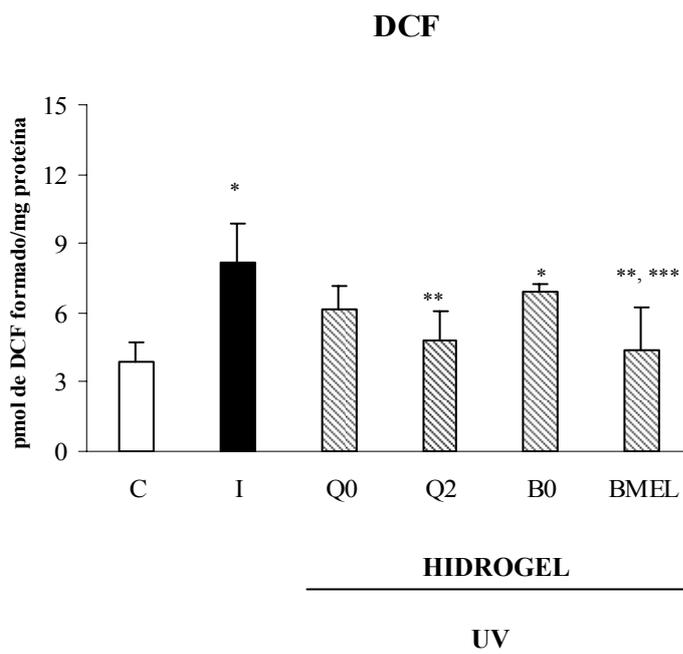


Figura 15. Níveis de DCF na pele controle (C), pele exposta à radiação UV (I) e pele exposta à radiação UV e tratada com hidrogéis (Q0, Q2, B0 e BMEL). * Indica diferença significativa ($p < 0,001$) do grupo I e ($p < 0,05$) do grupo B0 em relação ao grupo C, ** indica diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo Q2 e BMEL em relação ao grupo I, *** indica diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo BMEL em relação ao grupo B0.

Analisando os resultados de formação de radicais livres (ou de DCF), observa-se que houve um aumento significativo na produção de DCF entre o grupo que recebeu radiação UV (I) e o que recebeu radiação UV + aplicação tópica do gel branco (B0) em relação ao grupo controle (C), indicando que a dose de radiação UVA administrada foi suficiente para provocar a formação de radicais livres. Os grupos que receberam radiação UV + aplicação tópica dos géis que continham MEL (Q2 e BMEL) apresentaram uma redução significativa na formação de DCF, evidenciando o efeito antioxidante da MEL frente aos radicais livres. O grupo que recebeu a aplicação tópica do gel BMEL (BMEL) apresentou níveis de DCF significativamente menores que o grupo que recebeu aplicação tópica do gel B0 (B0) (ambos receberam radiação UV), o que demonstra, mais uma vez, o efeito protetor da MEL. Nesta situação, a nanoencapsulação da MEL nos quitossomas presentes no gel Q2 não apresentou proteção diferenciada daquela exibida pela MEL livre presente no gel BMEL. Uma

vez que, até este momento não se encontrou, na literatura, relatos acerca da ação antioxidante da MEL na pele a partir da análise dos dados de formação de radicais livres (DCF) pode-se inferir, dos resultados obtidos neste estudo, a potencialidade da ação antioxidante tópica da MEL em resposta aos danos ocasionados pela radiação UVA.

5.4.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A sensibilidade de se determinar substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico fez deste ensaio o método de escolha para a detecção e monitoração da lipoperoxidação, maior indicador do estresse oxidativo. Este ensaio permite que se obtenham informações importantes no que diz respeito aos efeitos gerados pelos radicais livres e tem sido amplamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante de inúmeras substâncias. Os resultados são expressos em relação aos níveis de MDA (malondialdeído), produto final da lipoperoxidação. Normalmente, as amostras biológicas contêm uma mistura de TBARS, incluindo hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, que aumentam seus níveis em resposta ao estresse oxidativo. Os níveis de TBARS retornam, com o tempo, a níveis normais, dependendo da presença de substâncias antioxidantes (JANERO, 1998; LEF'EVRE *et al.*, 1998).

No presente trabalho, os níveis de MDA foram avaliados em peles da região dorsal de camundongos submetidos à radiação UVA e a diferentes tratamentos. Os resultados são mostrados na Figura 16.

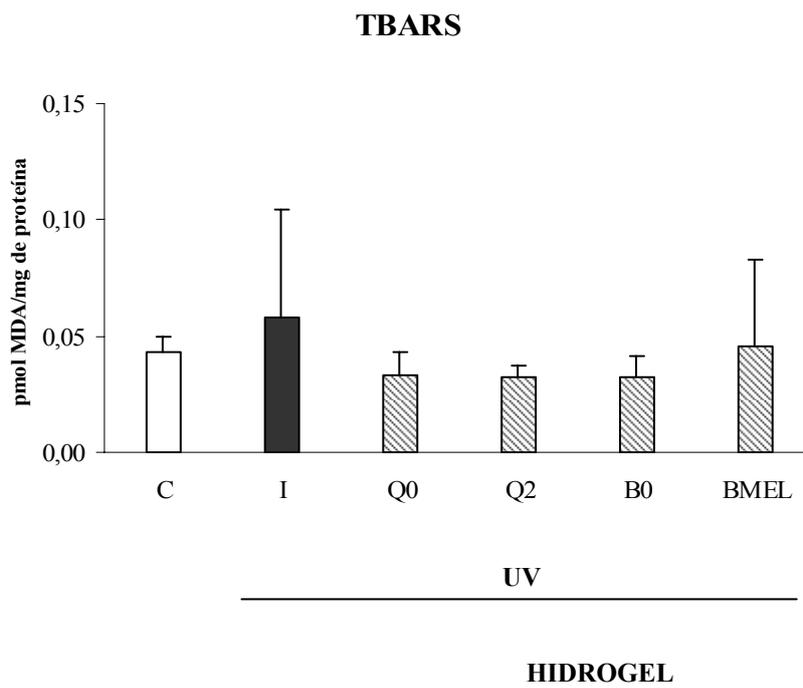


Figura 16. Níveis de MDA na pele controle (C), pele exposta à radiação UV (I) e pele exposta à radiação UV e tratada com hidrogéis (Q0, Q2, B0 e BMEL). Não houve diferenças significativas entre os 6 grupos experimentais.

Em relação aos níveis de MDA, não foram verificadas alterações significativas entre os 6 grupos. Observando o gráfico, pode-se notar uma maior formação de MDA nas amostras do grupo I, conforme o esperado. Por outro lado, os demais grupos (Q0, Q2, B0 e BMEL) apresentaram níveis de MDA semelhantes ao do grupo C. Comparando os grupos que receberam radiação UV + aplicação tópica de géis contendo MEL (Q2 e BMEL), pode-se visualizar uma maior variação entre as amostras do grupo BMEL, o que indica uma menor variabilidade e uma maior consistência nos dados exibidos pelo grupo Q2 frente à lipoperoxidação induzida por radiação UVA.

Estudos confirmam que a radiação UVA induz à peroxidação lipídica e à produção de MDA (FU *et al.*, 2000; INAL *et al.*, 2001). No presente estudo, devido à grande variabilidade entre as amostras observada no grupo I, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos experimentais.

5.4.3 Teor de tióis totais

Tióis são compostos que contém um grupo sulfidríla (-SH) ligado a um átomo de carbono. São moléculas endógenas que atuam como antioxidantes eficientes, protegendo as células contra os efeitos deletérios ocasionados pelos radicais livres. Os tióis intra- e extracelulares, desempenham papel importante na determinação da estrutura e função das proteínas, na regulação da atividade enzimática e na proteção antioxidante (WLODEK, 2002).

No presente trabalho, os níveis de tióis totais foram avaliados em peles da região dorsal de camundongos submetidos à radiação UVA e a diferentes tratamentos. Os resultados são mostrados na Figura 17.

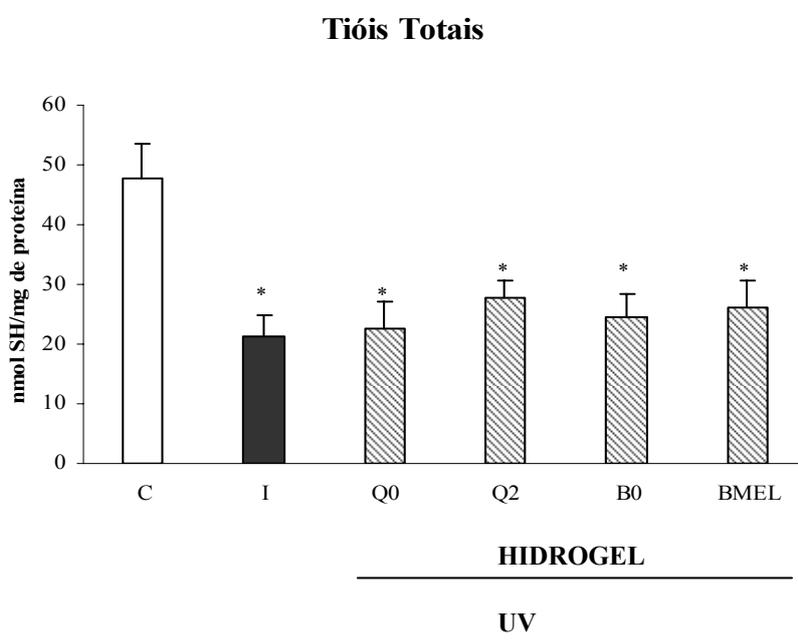


Figura 17. Níveis de Tióis Totais na pele controle (C), pele exposta à radiação UV (I) e pele exposta à radiação UV e tratada com hidrogéis (Q0, Q2, B0 e BMEL). * Indica diferença significativa ($p < 0,001$) dos grupos I, Q0, Q2, B0 e BMEL em relação ao grupo C.

Analisando os resultados obtidos em relação aos níveis de tióis totais, observou-se diferença significativa entre o nível de tióis exibido pelo grupo controle (C) e os demais grupos experimentais (I, Q0, Q2, B0 e BMEL), indicando que a dose de radiação UVA administrada causa danos aos grupamentos tióis, comprometendo sua proteção antioxidante. Nota-se, também, que os grupos que receberam radiação UV + aplicação tópica dos géis contendo MEL (Q2 e BMEL) exibiram níveis de tióis totais um pouco maiores que os demais (I, Q0 e B0), sugerindo um efeito protetor da MEL frente aos danos gerados pela radiação UVA. Até o presente momento, não há relato na literatura sobre a ação antioxidante da MEL a partir da análise dos níveis de tióis totais na pele. Sendo assim, estes resultados pontuam uma proteção antioxidante tópica exercida pela MEL.

5.4.4 Atividade da superóxido desmutase (SOD)

A SOD é uma enzima antioxidante que desempenha papel importante na redução dos danos celulares gerados pelo ânion superóxido, reduzindo-o a peróxido de hidrogênio e oxigênio. Três isoformas foram identificadas: Cobre/Zinco-SOD (citosol), Manganês-SOD (mitocôndria) e SOD extracelular (URSO e CLARKSON, 2003).

Neste estudo, a atividade da SOD foi avaliada em peles da região dorsal de camundongos submetidos à radiação UVA e a diferentes tratamentos. Os resultados são mostrados na Figura 18.

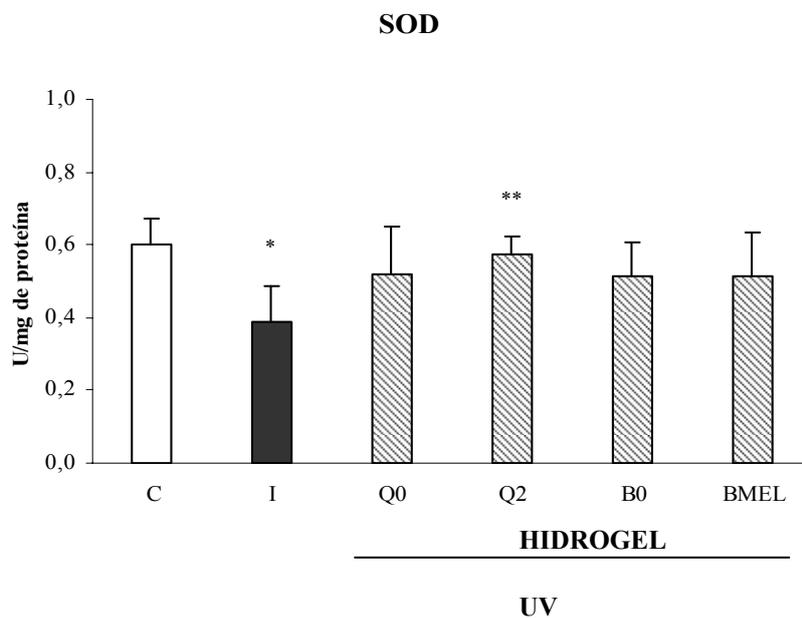


Figura 18. Atividade da SOD na pele controle (C), pele exposta à radiação UV (I) e pele exposta à radiação UV e tratada com hidrogéis (Q0, Q2, B0 e BMEL). * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo I em relação ao grupo C, ** indica diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo Q2 em relação ao grupo I.

A atividade da SOD mostrou-se significativamente reduzida no grupo I em relação à atividade expressa pelo grupo C. Conforme esperado, a radiação UVA causou efeitos deletérios sobre o sistema de defesa antioxidante celular. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre as atividades enzimáticas em relação ao grupo C, o que leva a crer que o tratamento tópico com os géis, contendo (Q2 e BMEL) ou não (B0 e BMEL) MEL, serviram como uma barreira física à radiação UVA protegendo a pele contra seus efeitos danosos. O grupo Q2, por sua vez, apresentou diferença significativa na atividade da SOD em relação à atividade expressa pelo grupo I, apresentando uma atividade muito próxima daquela exibida pelo grupo C. Este resultado demonstra uma maior proteção da pele que foi submetida ao tratamento tópico com gel contendo MEL associada aos quitossomas (Q2) diante dos demais tratamentos avaliados frente aos danos ocasionados pela radiação UVA.

O gel contendo a formulação Q2, provavelmente devido à presença dos quitossomas, permitiu uma maior penetração cutânea da MEL conferindo, portanto, uma maior proteção à pele. Biruss e Valenta (2006) avaliaram a permeação cutânea e a estabilidade química de hormônios incorporados em lipossomas revestidos por diferentes polímeros (quitosana conjugada com EDTA, carragena, emulsificante polimérico - Pemulen[®], policarbofil). Os resultados apontaram que o revestimento polimérico dos lipossomas, contendo os hormônios testados, aumentou a penetração cutânea e melhoraram a estabilidade química e microbiológica destes. O polímero quitosana-EDTA destacou-se dentre os demais polímeros como promissor componente de produtos destinados à via cutânea por apresentar um amplo espectro de ação contra bactérias e por melhorar as propriedades de permeação através do rompimento das *tight junctions* intracelular (SMITH, 2003).

Os ensaios de estresse oxidativo demonstraram que o tratamento com radiação UVA foi adequado para promover alterações nos níveis de radicais livres, de tióis totais e na atividade da superóxido desmutase (SOD). Os resultados observados nestes três ensaios demonstraram que os tratamentos tópicos com hidrogéis contendo MEL conferiram uma maior proteção diante dos demais tratamentos avaliados frente aos efeitos danosos ocasionados pela radiação UVA, evidenciando o efeito antioxidante da MEL. Os resultados obtidos a partir da avaliação da atividade enzimática da SOD demonstram uma maior proteção da pele que foi submetida ao tratamento tópico com hidrogel contendo MEL associada aos quitossomas (Q2).

6. Conclusões

Foi possível preparar suspensões de nanovesículas de L e Q contendo concentrações crescentes de MEL através do método de evaporação em fase reversa. As formulações das séries L e Q contendo concentrações de MEL de 0,5 % e 0,75 % (m/m) mostraram-se visualmente instáveis, apresentando precipitados. As nanovesículas das séries L e Q apresentaram diâmetros médios que variaram entre 150 nm e 254 nm, índices de polidispersão em torno de 0,4, valores de potencial zeta entre -35 mV e -28 mV, pH em torno de 4,0, teor médio de MEL próximo a 100 % e eficiência de encapsulação entre 31,4 % e 60,8 %.

Os resultados obtidos por SAXS revelaram a presença de estruturas esféricas unilamelares, condizentes com o método de preparação. Os perfis dos espectros de SAXS das suspensões de nanovesículas da série Q mostraram-se mais definidos do que aqueles exibidos pelas nanovesículas da série L, indicando que a quitosana promoveu uma maior organização da bicamada e uma maior tendência em formar estruturas multilamelares. As espessuras das bicamadas das nanovesículas da série L foram ligeiramente superiores as da série Q devido, provavelmente, ao confinamento da fosfatidilcolina pela quitosana e as nanovesículas de ambas as séries apresentaram valores de D e V elevados, indicando um grande volume aquoso encapsulado no núcleo destas.

As suspensões de nanovesículas da série L mostraram uma redução nos valores de diâmetros médios de partícula e de PDI durante 90 dias armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz. Os valores de potencial zeta e de teor médio de MEL não sofreram alterações significativas ao longo deste período. As suspensões de nanovesículas da série Q se mantiveram estáveis e não sofreram alterações quanto aos diâmetros médios, índices de polidispersão, potencial zeta e teor médio de MEL durante 90 dias armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz.

As fotomicrografias obtidas por MET revelaram a presença de estruturas esféricas com faixa de diâmetro de partícula semelhante à obtida por espalhamento de luz dinâmico.

Os resultados obtidos por Turbiscan *LAB*[®] para as suspensões de nanovesículas da série L apontam uma tendência à redução do tamanho de partícula, situação também observada no estudo de estabilidade do diâmetro médio de partícula durante período de 90 dias por espalhamento de luz dinâmico. Já as suspensões de nanovesículas da série Q não apresentaram alterações nos gráficos de Turbiscan *LAB*[®], descartando a possibilidade da visualização de fenômenos de instabilidade e evidenciando a influência da quitosana na estabilização das nanovesículas.

A preparação de hidrogéis de Natrosol[®] contendo as suspensões de nanovesículas e a solução hidroalcoólica de MEL livre em total substituição à água não alterou o comportamento pseudoplástico característico deste polímero descrito pelo modelo de Ostwald. Além disso, os hidrogéis apresentaram valores de pH adequados para aplicação cutânea.

As análises dos gráficos de Turbiscan *LAB*[®] revelaram que os hidrogéis não apresentaram tendência à desestabilização.

Diante dos resultados obtidos a partir dos ensaios de estresse oxidativo, pode-se verificar que a MEL apresentou atividade antioxidante frente aos efeitos deletérios ocasionados pela radiação UVA através da análise de parâmetros tais como níveis de radicais livres, níveis de tióis totais e atividade da superóxido desmutase (SOD)

O conjunto de resultados obtidos demonstra a potencialidade dos quitossomas em atuarem como sistemas carreadores da MEL. Este sistema nanoestruturado é promissor para incorporação em formulações para a aplicação cutânea destinadas à proteção contra os efeitos deletérios exercidos pela radiação UVA.

7. Referências

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D, ESCAMES, G, CAROZO, A, LEON, J, KHALDY, H, REITER, R. J. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 2002; 2: 133–52.
- AGNACCI, A., ELLIOT, J. A., YEN, S. S. C. Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. **Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**. 1992; 75(2): 447-52.
- ALLEGRA, M, REITER, R. J, TAN, D. X, GENTILE, C, TESORIERE, L, LIVREA, M. A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. **Journal of Pineal Research**. 2003; 34: 1–10.
- ALVES, M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro***. 2006. 166p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre
- ALVES, M. P., SCARRONE, A. L., SANTOS, M., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**. 2007; 341: 215-220.
- ARENDT, J. **Melatonin and the mammalian pineal gland**. London: Chapman & Hall; 1995, 331 p.
- BANGHAM, A.D., STANDISH, M. M., WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**. 1965; 13: 238-252.
- BARATA, E. A. F. **A Cosmetologia: Princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress, 2002. 19 p.
- BARRENETXE, J., DELAGRANGE, P., MARTÍNEZ, J. A. Physiological and Metabolic Functions of Melatonin. **Journal of Physiology and Biochemistry**. 2004; 60; 61-72.
- BATZRI, S., KORN, E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1973; 298: 1015-19.
- BECHGARD, E., LINDHART, K., MARTISEN, L. Intranasal absorption of melatonin in vivo bioavailability study. **International Journal of Pharmaceutics**. 1999; 182: 1-5.
- BÉNÈS, L., CLAUSTRAT, B., HORRIÈRE, F., GEOFFRIAU, M., KONSIL, J., PARROT, K. A., DEGRANDE, G., MCQUINN, R.L., AYRES, J.W. Transmucosal, oral controlled release and transdermal drug administration in human subjects. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 1997; 86: 1115-19.

- BEYER, C. E., STEKETEE, J. D., SAPHIER, D. Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. **Biochemical Pharmacology**. 1998; 56: 1265-72.
- BIRUSS, B. e VALENTA, C. Skin permeation of different steroid hormones from polymeric coated liposomal formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 2006; 62: 210–19.
- BOIVIN, D. B., JAMES, F. O. Insomnia due to circadian rhythm disturbances. In: SZUBA, M. P., KLOSS, J. D., DINGES, D. F. **Insomnia: principles and management**. Cambridge: Cambridge University Press; 2003. p. 96-114.
- BOUWSTRA, J.A., GOORIS, G.S., BRAS, W., TALSMA, H. Small angle X-ray scattering: possibilities and limitations in characterization of vesicles. **Chemistry and Physics of Lipids**. 1993; 64: 83–98.
- BRADFORD, M. M A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-bye binding. **Analytical Biochemistry**. 1976; 72: 248–54
- BRASIL. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02/06/2003.
- BRAUN, D. B., ROSEN, M. R. **Rheology modifiers handbook: Practical use and application**. New York: William Andrew Publishing, 2000.
- BROMONT, C., MARIE, C., BRALET, J. Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. **Stroke**. 1989; 20 (7): 918-24.
- BRUGNEROTTO, J., LIZARDI, J., GOYCOOLEA, F. M., ARGÜELLES-MONAL, W., DESBRIÈRES, J., RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**. 2001; 42: 3569–80.
- BRUMMER, R., GODERSKY, S. Rheological studies to objectify sensations occurring when cosmetic emulsions are applied to the skin. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. 1999; 152 (1-2): 89-94.
- BUBENIK, G. A. Gastrointestinal melatonin: localization, function and clinical relevance. **Digestive Diseases and Sciences**. 2002; 47:2336–2348.
- BRZEZINSKI, A. Melatonin in Humans. **The New England Journal of Medicine**. 1997: 336; 186-195.
- 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**. 1996; 85 (5): 530-36.

- CAHILL, G. M., BESHARSE, J.C. Light-sensitive melatonin synthesis by *Xenopus* photoreceptors after destruction of the inner retina. **Visual Neuroscience**. 1992; 8: 487–490.
- CARRILLO-VICO, A., CALVO, J. R., ABREU, P. et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **The FASEB Journal**. 2004; 18:537–539.
- DAHLITZ, M., ALVAREZ, B., VIGNAIR, J., ENGLISH, J., ARENDT, J., PARKES, J. D., et al. Delayed sleep syndrome response to melatonin. **Lancet**. 1991; 337: 1121-4.
- DAWSON, D., ROGERS, N. L., VAN DEN HENVEL C. J., KENNAWAY, D. J., LUSHINGTON, K. Effect of sustained nocturnal transbucal melatonin administration on sleep and temperature in elderly insomnics. **Journal of Biological Rhythms**. 1998; 13: 532-8.
- DEMER, D., BANGHAM, A.D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. **Biochimica et Biophysica Acta** . 1976; 443: 629-634.
- DEMURO R. L., NAFZIGER A. N., BLASK D. E., MENHINICK A. M., BERTINO J. S. The bioavailability of oral melatonin. **Journal of Clinical Pharmacology**. 2000; 40: 781-4.
- DERESZ, L. F., LAZZAROTTO, A. R., MANFROI, W.C., GAYA, A., SPRINZ, E., OLIVEIRA, A. R., DALL'AGO, P. O estresse oxidativo e o exercício físico em indivíduos HIV positivo. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. 2007; 13 (4).
- DOLLINS, A. B., ZHDANOVA, I. V., WURTMAN, R. J., LYNCH, A. J., DENG, M. H. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. 1994; 91 (5): 1824-8.
- DREHER, F., GABARD, B., SCHWINDT, D. A., MAIBACH, H. I. Topical melatonin in combination with vitamin E and C protects from ultraviolet induced erythema: a human study *in vivo*. **British Journal of Dermatology**. 1998; 139: 332-9.
- DRIVER, A.S., KODAVANTI, P.R.S., MUNDY, W.R Age-related in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. **Neurotoxicology and Teratology**. 2000; 22: 175–181.
- DUBEY, V., MISHRA, D., ASTHANA, A., JAIN, N. K. Transdermal delivery of pineal hormone: melatonin via elastic liposomes. **Biomaterials**. 2006; 27: 3491-96.
- EPSTEIN, F.H. Mechanisms of disease-melatonin in humans. **New England Journal of Medicine**. 1997; 336: 186-95.

- FANG, N., CHAN, V., MAO, H. Q., LEONG, K. W. Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. **Biomacromolecules** . 2001; 2 (4): 1161-68.
- FU, Y. C., JIN, X. P., WEI, S. M., LIN, H. F., KACEW, S. Ultraviolet radiation and reactive oxygen generation as inducers of keratinocyte apoptosis: protective role of tea polyphenols. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**. 2000; 61(3):177-88.
- GITTO E, TAN DX, REITER RJ, KARBOWNIK M, MANCHESTER LC, CUZZOCREA S, FULIA F, BARBERI I. Individual and synergistic actions of melatonin: Studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2001; 53: 1393–401.
- GUERRERO, J.M., REITER, R. J. Melatonin–immune system relationships. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 2002; 2: 167–180.
- GUTERRES, S.S., ALVES, M.P., POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**. 2007; 2: 147-157.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2^a edição. Oxford, University Press. 1989; 543 p.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**. 1994; 52: 253-265.
- HAYASHI, A., NAKANISHI, T., NAKAGAWA, S., MAYUMI, T. The application of Drug Delivery System to Cancer immunotherapy. **Drug Delivery Systems**. 2000; 15: 49-55.
- HENRIKSEN, I., SMISTAD, G., KARLSEN, J. Interactions between liposomes and chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**. 1994; 101: 227–236.
- 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**. 1998; 53; 462-466.
- HOFLAND, H.E., VAN DER GEEST, R., BODDE, H.E., JUNGINGER, H.E., BOUWSTRA, J.A. Estradiol permeation from nonionic surfactant vesicles through human stratum corneum in vitro. **Pharmaceutical Research**. 1994; 11: 659–664.
- ICH Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. United States of America, 1996. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: outubro, 2006.
- IMURA, T., OTAKE, K., HASHIMOTO, S., GOTOH, T., YUASA, M., YOKOYAMA, S., SAKAI, H., RATHMAN, J. F., ABE, M. Preparation and

- physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method. **Colloids and Surfaces B**. 2003; 27: 133–140.
- INAL, M. E., KAHRAMANT, KÖKENT, T. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. **Clinical and Experimental Dermatology**. 2001; 26: 536-39.
- ITOH, M. T., ISHIZUKA, B., KURIBAYASHI, Y. et al. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**. 1999; 5: 402–408.
- JANERO, D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**. 1998; 9: 515-540.
- JOHNSSON, M., BERGSTRAND, N., EDWARDS, K., STALGREN, J. J. R. Adsorption of a PEO-PPO-PEO triblock copolymer on small unilamellar vesicles: equilibrium and kinetic properties and correlation with membrane permeability. **Langmuir**. 2001; 17: 3902–3911.
- JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9^a ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 18, p. 303-314.
- 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**. 1999a; 51: 783-790.
- 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**. 1999 b; 61: 71-82.
- KANIKKANNAN, N., JACKSON, T., SHAIK, M. S., SINGH, M. Evaluation of skin sensitization potential of melatonin and nimesulide by murine local lymph node assay. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2001; 14: 217-20.
- KHAJURIA, A., JOHRN, R. K., ZUTSHI, U. Piperine mediated alterations in lipid peroxidation and cellular thiol status of rat intestinal mucosa and epithelial cells. **Phytomedicine**. 1999; 6 (5): 351-55.
- KHOR, E., LIM, L. Y. Implantable applications oh chitin and chitosan. **Biomaterials**. 2003; 24: 2339-2349.
- KIRJAVAINEN, M., URTI, A., JÄÄSKELÄINEN, L., SUHONEN, T.M., PARONEN, P., VALJAKKA-KOSKELA, R., KIESVAARA, J., MÖNKKÖNEN, J. Interaction of liposomes with human skin in vitro: the influence of lipid composition and structure. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1996; 1304: 179–189.

- KUMAR, R., SINGH, B., BAKSHI, G., KATARE, O. Development of liposomal systems of Finasteride for topical applications: design, characterization, and in vitro evaluation. **Pharmaceutical Development and Technology**. 2007; 12: 591-601.
- LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology**. 1998; 16: 307-21.
- LAUTENSCHLÄGER, H. Liposomes. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. 2006: 155-163.
- LEBEL, C. P, ALI, S. F, MCKEE, M., BONDY, S. C. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: The potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 1990; 104 (1): 17-24.
- LEE, B.J., PARROT, K.A., AYRES, J.W., SACK, R.L. Preliminary evaluation of transdermal delivery of melatonin in human subjects. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**. 1994; 85: 337-46.
- LEE, B-J, CHOE, J.S.; KIM, C-K. Preparation and characterization of melatonin-loaded stearyl alcohol microspheres. **Journal of Microencapsulation**. 1998; 15; 775-787.
- LEF'EVRE, G., et.al. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. **Annals de Biologie Clinique**. 1998; 56 (3):305-19.
- LEMARCHAND, C., COUVREUR, P., VAUTHIER, C., CONSTANTINI, D., GREF, R. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. **International Journal of Pharmaceutics**. 2003; 254: 77-82.
- LERNER, A.B., CASE, J.B., TAKAHASHI, Y. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**. 1958;80: 2587.
- LIEBERMAN, H.A., RIEGER, M.M., BANKER, G.S. **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems** vol. 1. New York, Mercel Dekker., 1988.
- LISSONI, P., TANCINI, G., PAOLOROSSO, F., MANDALA, M., ARDIZOIA, A., MALGUANI, F., *et al.* Chemoneuroendocrine therapy of metastatic breast cancer with persistent thrombocytopenia with weekly dose of epirubicin plus melatonin. A phase II study. **Journal of Pineal Research**. 1999; 26: 169-73.
- LISSONI, P. Is there a role for melatonin in supportive care? **Supportive Cancer Care**. 2002; 10: 110-116.
- LIU, F., NG, T. B., FUNG, M. C. Pineal indoles stimulate the gene expression of immunomodulating cytokines. **Journal of Neural Transmission**. 2001; 108: 397-405

- LIU, Y-Y.; FAN, X-D. Synthesis, properties and controlled release behaviors of hydrogel networks using cyclodextrins as pendant groups. **Biomaterials**. 2005; 26: 6367-74.
- MAESTRONI, C. J. M. The immunoneuroendocrine role of melatonin. **Journal of Pineal Research**. 1993; 14: 1–10.
- MALLO, C., ZAIDAN, R., GALY, G., WERMEULEN, E., BRUN, J., CHAZOT, G., et al. Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. **European Journal of clinical Pharmacology**. 1990; 38: 297-301.
- MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano series user manual**. 2004.
- MAO, S, CHEN, J., WEI, Z., LIU, H., BI, D. Intranasal administration of melatonin starch microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**. 2004; 272: 37-43.
- MAYO, J. C, SAINZ, R. M, ANTOLIN, I, HERRERA, F, MARTIN, V, RODRIQUEZ, C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2002.; 59: 1706–13.
- MAYO, J. C, TAN, D. X, SAINZ, R. M, LOPEZ-BURILLO, S, REITER, R. J. Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: Functional protection by melatonin and other antioxidants. **Free Radical Research**. 2003; 37: 543–53.
- MENGUAL, M., MEUNIER, G., CAYRE, I., PUECH, K., SNABRE, P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyzer: the Turbiscan MA 1000. **Colloids and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects**. 1999; 152: 111-123.
- MERTINS, O., SEBBEN, M., POHLMANN, A. R., SILVEIRA, N. P. Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. **Chemistry and Physics of Lipids**. 2005; 138: 29-37.
- MERTINS, O., CARDOSO, M.B., POHLMANN, A. R., SILVEIRA, N. P. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. 2006; 138: 29-37.
- MOLINERO, P., SAUTTO, M., BERROT, S. *et al.* Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin and $\alpha 1$ and thymulin concentrations: observations in rats and humans. **Journal of Neuroimmunobiology**. 2000; 103: 108–188.
- IMURA, P., MAESTRELLI, F., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. L., MICHELACCI, I., GHELARDINI, C., RABASCO, A. M. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 2007; 67: 86–95.
- NAKAGAWARA, V. Ultraviolet radiation: protection against exposure. **The Federal Air Surgeon's Medical Bulletin**. 1995: 10-11.

- NISHIKAWA, M., HUANG, L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. **Drug Delivery Systems**. 2000; 15:80-88.
- OGISO, T., YAMAGUCHI, T., IWAKI, M., TANINO, T., MIYAKE, Y. Effect of positively and negatively charged liposomes on skin permeation of drugs. **Journal of Drug Targeting**. 2001; 9 (1): 49-59.
- PAPPOLLA, M. A., SIMOVICH, M. J., BRYANT-THOMAS, T., CHYAN, Y. J., POEGGLER, B., DUBOBOVICH, M., BICK, R., PERRY, G., CRUZ-SANCHES, F., SMITH, M. A. The neuroprotective activities of melatonin against the Alzheimer beta-protein are not mediated by melatonin membrane receptors. **Journal of Pineal Research**. 2002; 32: 135-42.
- PERUGINI, P., GENTA, I., PAVANETTO, F., CONTTI, B., SCALIA, S., BARUFFINI, A. Study on glycolic acid delivery by liposomes and microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**. 2000; 196: 51–61.
- POLOZOVA, A., YAMAZAKI, A., BRASH, J.L., WINNIK, F.M. Effect of polymer architecture on the interactions of hydrophobically modified poly-(N-isopropylamides) and liposomes. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**. 1999; 147: 17–25.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- REITER, R. J, TAN, D. X, OSUNA, C, GITTO, E. Actions of melatonin in the reduction of oxidativestress: a review. **Journal of Biomedical Materials Research**. 2000; 7:444–58.
- REITER, R. J., TAN, D.X. Melatonin: an antioxidant in edible plants. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2002; 957:341–344
- REITER, R J., TAN, D. X., MAYO, J. C., SAINZ, R. M., LEON, J., CZARNOCKI, Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. **Acta Biochimica Polonica**. 2003; 50: 1129-46.
- REITER, R J. Melatonin: clinical relevance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2003; 17: 273-285.
- 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**. 2002; 53: 209-15.
- SAINZ, R. M., MAYO, J. C., REITER, R. J. et al. Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. **FASEB Journal**. 2000; 13: 1547–1556.

- SAUER, L. A., DAUCHY, R. T., BLASK, D. E. Polyunsaturated fatty acids, melatonin and cancer progression. **Biochemical Pharmacology**. 2001; 61: 1455–1462.
- SEABRA, M. L. V., BIGNOTTO, M., PINTO Jr, L. R., TUTIK, S. Randomized, double - blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. **Journal of Pineal Research**. 2000; 29(4): 193-200.
- SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., CORDOVA, C. A. S., CRECZYNSKI-PASA, T. B., GUTERRES, S. S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**. 2005; 289: 209-13.
- 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**. 2006; 17: 562-69.
- SMITH, J. M. Chitosan and transdermal drug delivery. **Retinoids**. 2003; 19: 72–75.
- SRIRAM, K., PAI, K.S., BOYD, M.R., RAVINDRANATH, V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: *in vitro* and *in vivo* studies in mice. **Brain Research**. 1997; 749: 44–52.
- TAN, D. X., CHEN, L. D., POEGGELER, B. et al. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrine Journal**. 1993; 1: 57–63.
- TAN, D. X., MANCHESTER, L. C., REITER, R. J., et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1999; 1472:206–214.
- TAN, D. X., REITER, R. J., MANCHESTER, L. C., YAN, M-t, EL-SAWI, M., SAINZ, R.M., MAYO, J. C., KOHEN, R., ALLEGRA, M. C., HARDELAN, R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current Topics in Medical Chemistry**. 2002; 2: 181-197.
- URATA Y, HONMA S, GOTO S, TODOROKI S, UEDA T, CHO S, HONMA K, KONDO T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**. 1999; 27: 838–47.
- URSO, M. L., CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**. 2003;189: 41-54.
- VIJAYALAXMI, C. R. T., REITER, R. J., HERMAN, T. S. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. **Journal of Clinical Oncology**. 2000; 20: 2575-601.

WALDHAUSER, F., VIERHARPPER, H., OIRICH, K. Abnormal circadian melatonin secretion in night shift workers. **New England Journal of Medicine**. 1989; 7: 441-6.

WLODEK, L. Beneficial and harmful effects of thiols. **Polish Journal of Pharmacology**. 2002; 54: 215-23.

WYATT, E. L., SUTTER, S. H., DRAKE, L. A. Farmacologia dermatológica. Goodman & Gilman **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10^a ed, Rio de Janeiro, Mc Graw Hill, 2003.

ZAIDAN, R., GEOFFRIAU, M., BRUN, J., TAILLARD, J., BUREAU, C., CHAZOT, G. Melatonin is able to influence its secretion in humans: description of a phase-response curve. **Neuroendocrinology**. 1994; 60 (1): 105-12.

ZELLMER, S., PFEIL, W., LASCH, J. Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1995; 1237: 176–182.

8. Anexos

I. Validação de metodologia analítica para quantificação da MEL presente na suspensão de nanovesículas Q2

1. Linearidade

A partir de uma solução de MEL com concentração de 1 mg/mL, foram transferidas alíquotas de 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 125,0; 150,0; 175,0 μ L para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com acetonitrila, obtendo-se soluções com concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 17,5 μ g/mL. Foram feitas três curvas padrão em três dias consecutivos e o estudo da linearidade do método analítico foi realizado através da análise da variância (Tabela 1-A1) verificando-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,01$). Na figura 1-A1 está representada graficamente a curva média obtida para quantificação de MEL, a equação da reta e o coeficiente de correlação obtido.

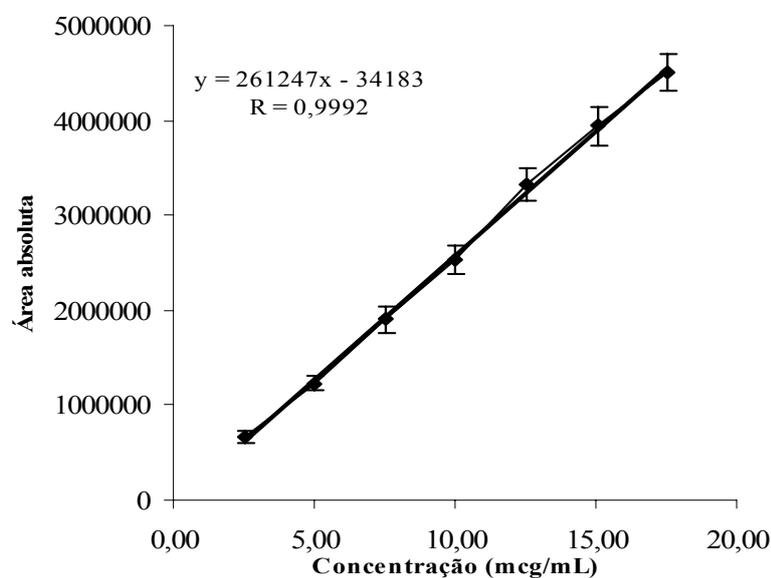


Figura 1-A1. Representação gráfica da curva padrão de MEL obtida por CLAE.

Tabela 1-A1. ANOVA das áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão da MEL por CLAE.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	<i>F</i>
ENTRE	6	1,735x10 ¹⁴	2,891x10 ¹³	35,60*
- regressão linear	1	1,733x10 ¹⁴	1,733x10 ¹⁴	213,45*
- desvio da linearidade	5	1,575x10 ¹¹	3,149x10 ¹⁰	0,038
RESÍDUO	56	4,547x10 ¹³	8,119x10 ¹¹	
TOTAL	62			

*significativo para $p < 0,01$

Após a avaliação da linearidade da curva padrão, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir das equações 3 e 4, respectivamente. Os valores obtidos foram 0,189 µg/mL para LD e 0,569 µg/mL para LQ.

2. Repetibilidade

Os resultados de repetibilidade estão expressos na forma de desvio padrão relativo (DPR) e são apresentados na Tabela 2-A1.

Tabela 2-A1. Valores experimentais obtidos em três dias consecutivos para o estudo da repetibilidade.

Amostra	Teor (%)	Média	DPR (%)
1	100,12		
2	101,62		
3	101,38	100,90	1,63
4	100,84		
5	103,14		
6	98,27		

3. Precisão intermediária

Para a avaliação da precisão intermediária do método analítico, os doseamentos foram realizados em três dias consecutivos. Os resultados foram expressos em DPR e podem ser visualizados na Tabela 3-A1.

Tabela 3-A1. Determinação do teor de MEL contida nas nanovesículas em três dias consecutivos por CLAE.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Média do teor* (%)	100,90	96,75	99,63
DPR (%) intra-dia	1,63	2,67	1,95
Média final (%)	99,09		
DPR (%) inter-dia	2,15		

*cada valor corresponde à média do doseamento de seis amostras.

Uma vez que, em ambas as determinações, os valores de DPR foram inferiores a 5%, pode-se dizer que o método analítico avaliado demonstrou precisão e repetibilidade adequadas.

4. Exatidão

Com o método analítico empregado, recuperou-se 102,90% da concentração final de 5 µg/mL; 99,95% de 10 µg/mL e 100,7% de 15 µg/mL, obtendo-se uma porcentagem média de recuperação de 101,18%. Este resultado indica que o método analítico avaliado é exato e está de acordo com os limites preconizados pela ICH e ANVISA. Os valores de recuperação individuais estão dispostos na Tabela 4-A1.

Tabela 4-A1. Valores experimentais obtidos na quantificação de MEL contida nas nanovesículas por CLAE.

Concentração final (µg/mL)	Recuperação (%)	Média (%)
5,0	102,73	102,90
	104,08	
	101,87	
10,0	97,91	99,95
	99,90	
	102,04	
15,0	100,15	100,70
	101,18	
	100,76	

Recuperação média = 101,18%

5. Especificidade

As Figuras 5-A1a e 5-A1b demonstram os cromatogramas obtidos a partir da suspensão de quitossomas sem fármaco (Q0) e contendo fármaco (Q2), respectivamente.

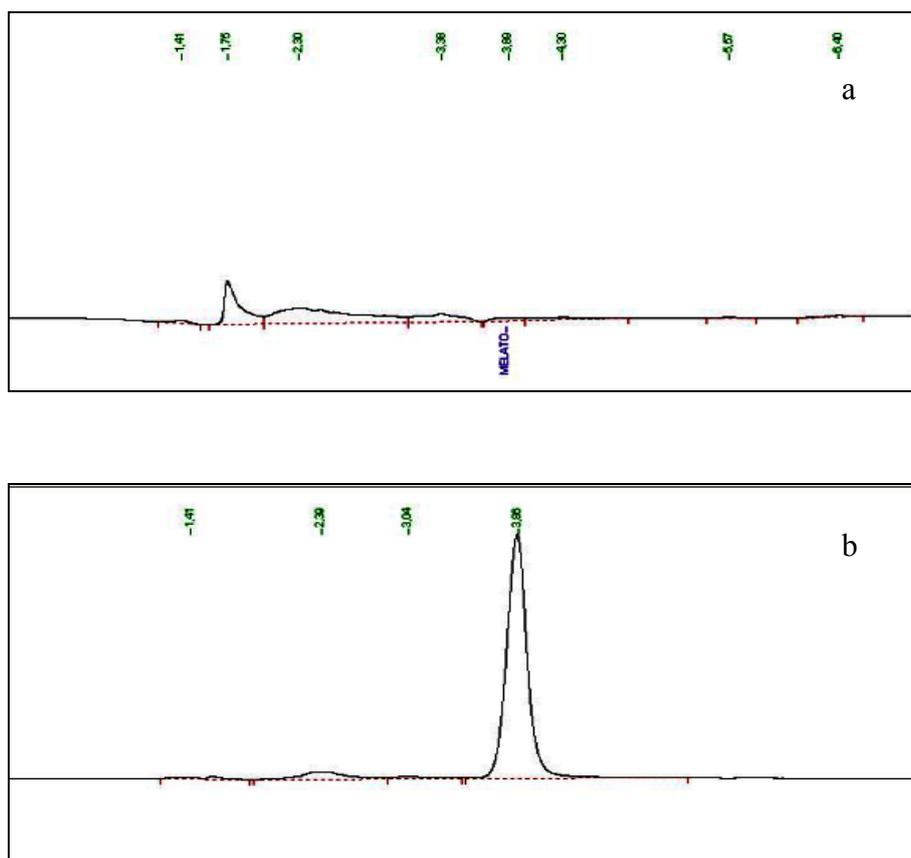


Figura 5-A1. Cromatogramas obtidos a partir da suspensão de quitossomas sem fármaco (Q0) (a) e contendo fármaco (Q2) (b).

II. Validação de metodologia analítica para quantificação da MEL presente no hidrogel contendo a suspensão de nanovesículas Q2

1. Linearidade

A partir de uma solução de MEL com concentração de 1 mg/mL, foram transferidas alíquotas de 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 125,0; 150,0; 175,0 μ L para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com acetonitrila, obtendo-se soluções com concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 17,5 μ g/mL. Foram feitas três curvas padrão em três dias consecutivos e o estudo da linearidade do método analítico foi realizado através da análise da variância (Tabela 1-A2) verificando-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,01$). Na Figura 1-A2 está representada graficamente a curva média obtida para quantificação de MEL, a equação da reta e o coeficiente de correlação obtido.

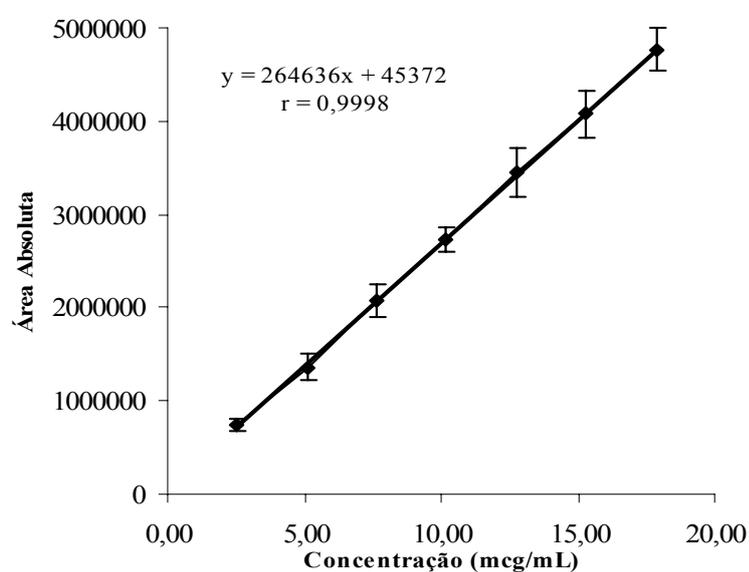


Figura 1-A2. Representação gráfica da curva padrão de MEL obtida por CLAE.

Tabela 1-A2. ANOVA das áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão da MEL por CLAE.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
ENTRE	6	1,148x10 ¹⁴	1,91x10 ¹³	520,06*
- regressão linear	1	1,148x10 ¹⁴	1,15x10 ¹⁴	3119,53*
- desvio da linearidade	5	3,067x10 ⁷	6,14x10 ⁹	0,167
RESÍDUO	56	2,060x10 ¹²	3,68x10 ¹⁰	
TOTAL	62			

*significativo para $p < 0,01$

A partir dos dados do estudo da linearidade da curva padrão os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as equações 3 e 4, respectivamente. Os valores obtidos foram 0,122 µg/mL para LD e 0,366 µg/mL para LQ.

2. Repetibilidade

Os resultados de repetibilidade estão expressos na forma de desvio padrão relativo (DPR) e são apresentados na Tabela 2-A2.

Tabela 2-A2. Valores experimentais obtidos em três dias consecutivos para o estudo da repetibilidade.

Amostra	Teor (%)	Média	DPR (%)
1	100,79		
2	99,86		
3	99,21	100,00	0,51
4	100,02		
5	100,17		
6	99,95		

*cada valor corresponde à média do doseamento de seis amostras.

3. Precisão intermediária

Os doseamentos foram realizados em três dias consecutivos e os resultados foram expressos em DPR podendo ser visualizados na Tabela 3-A2.

Tabela 3-A2. Determinação do teor de MEL contida nas nanovesículas em três dias consecutivos por CLAE.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Média do teor* (%)	100,00	100,06	104,38
DPR (%) intra-dia	0,51	1,75	0,62
Média final (%)	101,48		
DPR (%) inter-dia	2,02		

*cada valor corresponde a média do doseamento de seis amostras.

Uma vez que, em ambas as determinações, os valores de DPR foram inferiores a 5%, pode-se dizer que o método analítico avaliado demonstrou precisão e repetibilidade adequadas.

4. Exatidão

Em relação à avaliação da exatidão, o método analítico em questão permitiu a recuperação de 87,70% para concentração final de 5 µg/mL; 97,21% para 10 µg/mL e de 100,91% para 15 µg/mL, obtendo-se uma porcentagem média de recuperação de 95,27%. Este resultado indica que o método analítico avaliado é exato e está de acordo com os limites preconizados pela ICH e ANVISA. Os valores de recuperação individuais estão dispostos na Tabela 4-A2.

Tabela 4-A2. Valores experimentais obtidos na quantificação de MEL contida nas nanovesículas por CLAE.

Concentração final (µg/mL)	Recuperação (%)	Média (%)
5,0	87,67	87,70
	87,00	
	88,43	
10,0	87,17	97,21
	102,77	
	101,70	
15,0	99,68	100,91
	101,39	
	101,65	

Recuperação média = 95,27%

5. Especificidade

A especificidade da base semi-sólida contendo a suspensão de nanovesículas foi avaliada por CLAE a partir de um gel composto pela suspensão de quitossomas sem fármaco (Q0) e contendo fármaco (Q2). O cromatograma obtido pode ser visualizado nas Figuras 5-A2 a e 5-A2 b.

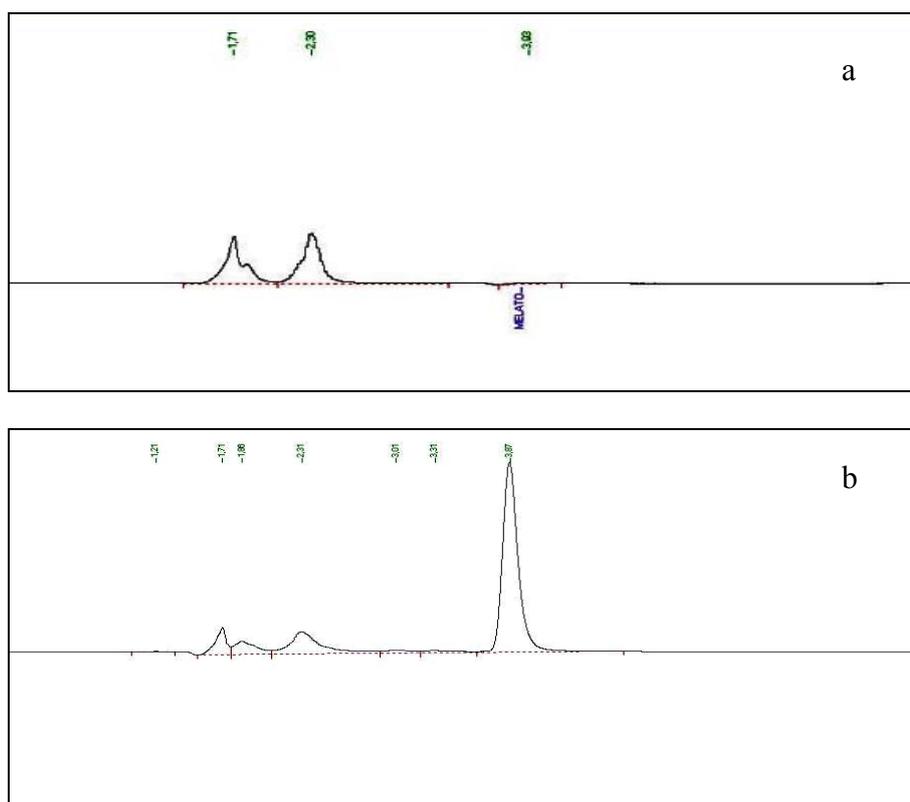


Figura 5-A2. Cromatograma obtido a partir do gel composto pela suspensão de quitossomas sem fármaco (Q0) (a) e contendo fármaco (Q2) (b).



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO

pro.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2006663

Título : "Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação biológica de quitossomas para liberação cutânea da melatonina

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
SILVIA STANISCUASKI GUTERRES	PESQ RESPONSÁVEL	nanoc@farmacia.ufrgs.br	33085218
ADRIANA RAFFIN POHLMANN	PESQUISADOR	pohlmann@iq.ufrgs.br	
MANUELA DE CASTILHOS FRANCA GONCAL	PESQUISADOR	manuelafg@terra.com.br	
NADYA PESCE DA SILVEIRA	PESQUISADOR	nadya@iq.ufrgs.br	33086258

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 5 , ata nº 85 , de 12/4/2007 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, segunda-feira, 23 de abril de 2007


LUIZ CARLOS BOMBASSARO
 Coordenador do CEP-UFRGS