

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

Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas contendo melatonina,
obtidas através da técnica de secagem por aspersão e com o emprego de
adjuvantes hidrossolúveis para aplicação tópica

CRISTIANE RODRIGUES DRAGO HOFFMEISTER

PORTO ALEGRE, 2009.

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

Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas contendo melatonina, obtidas através da técnica de secagem por aspersão e com o emprego de adjuvantes hidrossolúveis para aplicação tópica

Dissertação apresentada por **Cristiane Rodrigues Drago Hoffmeister** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 16.10.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Adriana Raffin Pohlmann
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck
Universidade Federal de Santa Maria

H711d Hoffmeister, Cristiane Rodrigues Drago
Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas contendo melatonina, obtidas através da técnica de secagem por aspersão e com o emprego de adjuvantes hidrossolúveis para aplicação tópica / Cristiane Rodrigues Drago Hoffmeister. – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xviii, 73 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Nanocápsulas. 2. Melatonina. 3. Secagem por aspersão. 4. Adjuvantes. 5. Redispersibilidade. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. II. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 do Departamento de Produção e controle de medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com financiamento da Rede de nanocosméticos MCT/CNPq.

Agradecimentos

A Prof. Dra Sílvia Guterres pela oportunidade, a paciência e dedicação durante a realização dessa etapa. Por me orientar e ajudar em todos os momentos que eu precisei.

Ao PPGCF e seus professores pelo auxílio e ensino de qualidade. Ao Prof. Dr. Helder Teixeira e ao Prof. Dr. Ruy Beck pela participação na banca e pelas dicas para a elaboração da minha dissertação. A Prof. Dra. Adriana Pohlmann pela participação na banca e pelos ensinamentos durante todo o mestrado.

Agradeço a todos os colegas do laboratório 405, entre eles, Ângelo, Ludmila, Karina, Nataly, Renata Contri, Luana, Fernanda, Evelise, Letícia Cruz, Irene, Moacir, Clarissa, Flávia, Francine, Samuel, Alessandro, Manoel, Manuela e especialmente a Taís Durli, Renata Raffin, Letícia Colomé, Denise e Ana Luiza, sem vocês não seria possível a realização desse trabalho. A Dra. Scheila Schaffazick pelo auxílio na elaboração do artigo.

Gostaria de agradecer ao frigorífico Porto de Ijuí pela doação das peles de suíno.

Ao Serviço Social da Indústria, onde trabalhei como farmacêutica durante a realização do mestrado, e aos seus colaboradores, Andriago, Viane e Sérgio, pelo apoio e liberação sempre que precisei estar no laboratório. Em especial ao Henrique e a Eliane que trabalharam dobrado quando eu não podia estar presente.

Ao meu companheiro André, pelo amor, amizade, apoio, paciência e por todas as nossas longas conversas sobre tudo, te amo muito.

A minha mãe e a Giulia por todo amor e carinho que sempre me deram, e ao meu pai, que mesmo longe, sempre me deu forças para continuar.

Resumo

Objetivos: O objetivo do trabalho foi preparar suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo melatonina e secá-las utilizando adjuvantes hidrossolúveis, bem como realizar a caracterização físico-química e avaliação da permeação cutânea das formulações obtidas. **Métodos:** As suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo melatonina foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. As suspensões de nanocápsulas foram caracterizadas em termos de determinação do diâmetro de partículas, índice de polidispersão, pH e potencial zeta. Considerando-se que as suspensões poliméricas podem ser formulações instáveis, sujeitas ao crescimento microbiano e degradação química dos componentes, empregou-se a técnica de secagem por aspersão, como uma alternativa para aumentar a estabilidade desse tipo de sistema mediante a sua conversão em produtos pulverulentos. Para que os pós resultantes fossem ressuspensíveis em água optou-se pela utilização de adjuvantes de secagem hidrossolúveis, como a lactose e a maltodextrina, na proporção de 10 % (m/v). As formulações obtidas foram incorporadas em hidrogéis e caracterizadas quanto as suas propriedades organolépticas, doseamento, morfologia e potencial zeta. Além disso, as formulações foram avaliadas através de diálise da melatonina em função do tempo em meio aquoso contendo 5 % de Tween 80[®] e quanto à permeação *in vitro* do fármaco através da pele de suíno em função do tempo. **Resultados e conclusões:** As suspensões e pós de nanocápsulas foram obtidos com sucesso. As formulações apresentaram um perfil de liberação descrito por uma equação biexponencial, exceto a solução de melatonina livre em 10 % de etanol que correspondeu ao modelo monoexponencial. Nos testes de permeação, os pós de nanocápsulas apresentaram permeação significativamente menor da melatonina na pele ($p < 0,05$) em comparação com o hidrogel contendo fármaco livre, porém não foram significativamente distintos entre si. Em geral, as nanocápsulas em pó secas utilizando lactose, forneceram um pó com melhor redispersibilidade e menor tamanho médio de partícula, adequado para a aplicação tópica.

Palavras-chaves: nanocápsulas, melatonina, *spray drying*, redispersibilidade, permeação.

Abstract

Aims: The objective was to prepare polymeric melatonin-loaded nanocapsule suspensions and dry them by using hydrophilic excipients and spray-drying technique. Perform physical-chemical characterization and evaluation of skin permeation of the formulations obtained. **Methods:** The polymeric melatonin-loaded nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of preformed polymer. The nanocapsule suspensions were characterized in terms of size, polydispersity index and zeta potential. Considering the instability of suspensions which are vulnerable to microorganism growing and the chemical degradation of components, we propose to convert them in powders by spray-drying for increasing the stability. The presence of water soluble excipients, lactose or maltodextrin, 10 % (w/v), as drying adjuvants furnished redispersible dried powders. These powders were incorporated in gels and characterized in terms of organoleptic parameters, melatonin content, morphology and zeta potentials. Furthermore, dialysis in cellulose membrane and permeation studies in pig's skin were carried out. **Results and Discussion:** The suspensions and powders of nanocapsules were successful obtained. The in vitro release profiles of nanostructured formulations were better described by the biexponential model while the ethanol 10 % solution containing free melatonin fits better the monoexponential equation. In permeation tests, the powders (NCL and NCM) demonstrated significant reductions of melatonin permeation ($p < 0,05$) compared to melatonin free gel, but no significant differences among the different powders. In general, the spray dried nanocapsules using lactose provide a powder with better redispersibility and smaller particle size, suitable for topical application.

Keywords: nanocapsules, melatonin, spray drying, redispersibility, permeation.

Lista de Abreviaturas

dAP: densidade aparente

dCP: densidade de compactação

F: melatonina em solução contendo 10 % de etanol

GF: gel contendo melatonina livre

GNL: gel contendo nanocápsulas secas por aspensão utilizando lactose como adjuvante de secagem

GNM: gel contendo nanocápsulas secas por aspensão utilizando maltodextrina como adjuvante de secagem

GS: gel contendo suspensão de nanocápsulas contendo melatonina

ICarr: Índice de Carr

IHausner: Índice de Hausner

NCL: nanocápsulas contendo melatonina, secas por aspensão utilizando lactose como adjuvante de secagem

NCM: nanocápsulas contendo melatonina, secas por aspensão utilizando maltodextrina como adjuvante de secagem

SN: suspensão de nanocápsulas contendo melatonina

Lista de Figuras

Figura 1. Fórmula estrutural da melatonina	11
Figura 2. Rota bioquímica de síntese de melatonina na pele	12
Figura 3 Gráfico de número de partículas por tamanho de partícula da formulação NCL	40
Figura 4 Gráfico de número de partículas por tamanho de partícula da formulação NCM	41
Figura 5. Fotomicrografias obtidas num aumento de 3000 vezes de lactose, NCL, maltodextrina e NCM	42
Figura 6. Fotomicrografias obtidas num aumento de 40000 vezes de NCL e NCM	43
Figura 7. Ilustração esquemática do princípio de funcionamento do Turbiscan Lab	45
Figura 8. Resultados do Turbiscan Lab	46
Figura 9. Perfis de liberação <i>in vitro</i> da melatonina presente nas diferentes formulações	48
Figura 10. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da formulação contendo melatonina solubilizada em solução de 10 % de etanol e modelagem matemática monoexponencial	49
Figura 11. Gráficos da liberação da melatonina a partir das formulações GF, SN e GS e as modelagens matemáticas	52
Figura 12. Gráficos da liberação a partir das formulações NCL e GNL e modelagens matemáticas	53
Figura 13. Gráficos da liberação a partir das formulações NCM e GNM e modelagens matemáticas	53
Figura 14. Gráfico da percentagem de melatonina permeada para o meio receptor por tempo	56

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição do diâmetro das partículas utilizando Mastersizer 2000® <i>via seca</i>	38
Tabela 2. Densidades aparente e de compactação dos sólidos e índices de Hausner e de Carr	46
Tabela 3. Parâmetros obtidos da modelagem matemática utilizando a equação monoexponencial	50
Tabela 4. Parâmetros obtidos da modelagem matemática utilizando a equação biexponencial	51
Tabela 5. Valores de $t_{1/2}$ obtidos da equação monoexponencial para todas as formulações	56

Sumário

Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de abreviaturas	xi
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xv
1. Introdução	1
2. Objetivos	5
3. Revisão de literatura	9
3.1 A melatonina e sua atividade antioxidante	11
3.2 Sistemas nanoestruturados para a aplicação cutânea de fármacos e operações de secagem	15
3.3 A lactose e a maltodextrina	18
3.4 A pele e a permeação cutânea	19
4. Materiais e métodos	23
4.1 Materiais	25
4.1.1 Matérias-primas	25
4.1.2 Solventes	25
4.1.3 Aparelhos e equipamentos	26
4.1.4 Outros materiais	27
4.1.5 Material biológico	27
4.2 Métodos	27
4.2.1 Preparação das nanocápsulas contendo melatonina	27
4.2.2 Secagem por aspersão	28
4.2.3 Caracterização das suspensões de nanocápsulas	28
4.2.4 Doseamento e eficiência de encapsulação	28
4.2.5 Caracterização dos pós de nanocápsulas	29
4.2.5.1 Teor de umidade dos pós	29
4.2.5.2 Microscopia eletrônica de varredura	29
4.2.5.3 Doseamento da melatonina nos pós de nanocápsulas	30

4.2.5.4 Densidades bruta e de compactação dos pós de nanocápsulas	30
4.2.6 Preparação dos hidrogéis contendo melatonina	30
4.2.7 Caracterização dos hidrogéis contendo melatonina	31
4.2.8 Análise da estabilidade	31
4.2.9 Liberação <i>in vitro</i> através do método do saco de diálise	31
4.2.10 Modelagem matemática	32
4.2.11 Avaliação da permeação cutânea <i>in vitro</i>	32
4.2.12 Análise estatística	33
5. Resultados e discussão	35
5.1 Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo melatonina	37
5.2 Caracterização dos pós de nanocápsulas contendo melatonina	37
5.3 Caracterização dos hidrogéis	44
5.4 Análise da estabilidade das formulações	45
5.5 Liberação <i>in vitro</i> através do método do saco de diálise	47
5.6 Avaliação da permeação cutânea	56
6. Conclusões	59
7. Referências	65

1. Introdução

Introdução

A melatonina (*N*-acetil-5-metotriptamina) é uma substância amplamente estudada devido as suas propriedades antioxidantes (BEYER *et al.*, 1998; LÓPEZ *et al.*, 1998; REITER, 1998; SAIJA *et al.*, 2002, TAN *et al.*, 2007). Entretanto, a fotolabilidade desse hormônio é a maior desvantagem para seu uso no tratamento tópico dos efeitos nocivos dos raios solares (TURSILLI *et al.*, 2006). Para tornar a melatonina mais estável, vários sistemas têm sido propostos, como liposferas (TURSILLI *et al.*, 2006), lipossomas elásticas (DUBEY *et al.*, 2006), etossomas (DUBEY *et al.*, 2007), quitossomas (GONÇALVES, 2008) e nanocápsulas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005; SCHAFFAZICK *et al.*, 2006, SCHAFFAZICK *et al.*, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2008).

As nanopartículas vêm sendo estudadas para a aplicação tópica de fármacos. Elas são usadas para proteger a molécula contra degradação tanto *in vitro* quanto *in vivo*, controlar a sua liberação e vetorizá-la. Nanocápsulas são produzidas normalmente em suspensão, porém essa forma farmacêutica apresenta algumas desvantagens, como possibilidade de contaminação e crescimento microbiano, degradação polimérica e instabilidade físico-química (MAGENHEIM e BENITA, 1991). A secagem por aspersão é uma técnica de baixo custo, fácil reprodutibilidade e adequada para a secagem de suspensões de nanopartículas poliméricas. Nosso grupo de pesquisa foi pioneiro na proposição desta técnica de secagem para nanopartículas poliméricas (MÜLLER *et al.*, 2000). Até o momento, a maioria dos trabalhos do grupo foi realizado utilizando Aerosil[®] (dióxido de silício coloidal), como adjuvante de secagem (MÜLLER *et al.*, 2000, SCHAFFAZICK *et al.*, 2006, BECK *et al.*, 2007). Entretanto, as nanocápsulas secas produzidas com este adjuvante não propiciam características sensoriais aceitáveis (dados obtidos em testes anteriores, que não são apresentados nessa dissertação), quando o produto é incorporado em formas semissólidas, pois é um agente gelificante, aumentando muito a viscosidade do gel.

Adicionalmente, nosso grupo de pesquisa estudou a incorporação de nanocápsulas (em suspensões aquosas) em bases semissólidas, com vantagens no controle de permeação de algumas substâncias, como benzofenona (PAESE, 2008; SIQUEIRA, 2008), nimesulida (ALVES, 2006) e metoxicinamato de octila (ANGELI, 2007). Todos estes trabalhos propuseram a incorporação direta da suspensão de nanopartículas nos veículos semissólidos. Desta forma, o passo inovador do presente trabalho é a preparação de nanocápsulas secas com adjuvantes hidrossolúveis, propondo-os como insumos intermediários e estudar o seu comportamento mediante a incorporação em veículos semissólidos.

A pele é o tecido mais frequentemente exposto ao estresse oxidativo (KOHEN *et al.*, 2004). Devido as propriedades imunomoduladoras e antirradicais livres da melatonina e, considerando, as potencialidades da nanotecnologia para veiculação de substâncias, o presente trabalho propõe o uso tópico deste hormônio para proteger a pele contra os danos oxidativos induzidos pela exposição a radiações solares. De forma inédita, a proposta envolve a secagem das nanocápsulas através de aspersão, visando obtê-las na forma de pós, que podem, por sua vez, serem considerados insumos intermediários para a incorporação em veículos semissólidos. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho é a preparação e caracterização físico-química e a realização de estudos de liberação e de permeação cutânea de pós de nanocápsulas de melatonina secos por aspersão, utilizando adjuvantes de secagem hidrossolúveis, incorporados em semissólidos de uso tópico destinados à proteção e prevenção do envelhecimento cutâneo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanocápsulas secas contendo melatonina, obtidas através da técnica de secagem por aspersão e com o emprego de adjuvantes de secagem hidrossolúveis, avaliando a sua influência na preparação de hidrogéis com características adequadas para aplicação tópica.

2.2. Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar as suspensões de nanocápsulas de melatonina;
- Secar as suspensões de nanocápsulas de melatonina mediante o emprego de adjuvantes de secagem hidrossolúveis, lactose e maltodextrina, e caracterizar os pós resultantes;
- Incorporar a suspensão de nanocápsulas e os pós secos por aspersão em hidrogéis e caracterizá-los;
- Avaliar através do método de diálise a liberação da melatonina a partir das nanocápsulas nas diferentes formulações;
- Avaliar a permeação cutânea de melatonina nanoencapsulada nas diferentes formulações.

3. Revisão de literatura

3. Revisão de literatura

3.1. A melatonina e sua atividade antioxidante

A melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina), conhecida por ser o produto principal de secreção da glândula pineal, foi primeiramente isolada de pineal bovina por Lerner em 1960 (REITER, 2003). Essa substância foi chamada de melatonina devido a sua habilidade de afetar as melanosferas da pele de sapos e é relacionada quimicamente com a serotonina (5-hidroxitriptamina) (MACCHI e BRUCE, 2004).

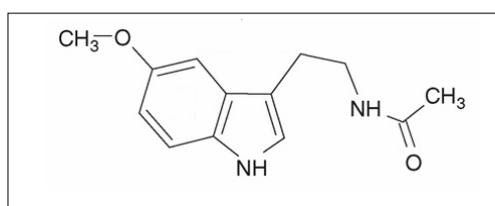


Figura 1: Fórmula estrutural da melatonina

A síntese de melatonina na glândula pineal ocorre na seguinte sequência: os pinealócitos captam o triptofano do sangue e o convertem em serotonina por hidroxilação e decarboxilação; a serotonina é então convertida a *N*-acetil-serotonina pela enzima *N*-acetil-transferase; a *N*-acetil-serotonina, por sua vez é metilada convertendo-se em melatonina pela enzima hidroxindole-*O*-metil transferase (MACCHI e BRUCE, 2004). Sua produção e secreção máximas ocorrem durante a noite (ritmo circadiano), sendo a escuridão um requisito fundamental para a sua síntese e secreção na glândula pineal. Depois de sua liberação no sangue, a melatonina, por ser uma molécula pequena e ter natureza anfifílica, rapidamente alcança outros fluidos. O ritmo da produção da melatonina em jovens é intenso, e vai decrescendo com o envelhecimento (LÓPEZ *et al.*, 1998; VIJAYALAXMI *et al.*, 2004; SLOMINSKI *et al.*, 2007).

Processos de síntese de melatonina extrapineal foram identificados no cérebro, retina, glândula de Harderian, corpo ciliar, córneas, timo, epitélio das vias aéreas, medula óssea, células do sistema imunológico, gônadas, placenta, trato gastrintestinal e pele. Destes locais mencionados, somente a retina parece exibir um

ritmo circadiano de produção da melatonina (SLOMINSKI *et al.*, 2007). Em geral, enquanto a melatonina produzida na pineal parece agir como um hormônio típico, chegando às células através da corrente sanguínea, a melatonina extrapineal parece atuar como substância intra-, auto- ou parácrina nos tecidos em que é sintetizada (CARRILLO-VICO *et al.*, 2004).

A pele de mamíferos contém todo maquinário molecular e bioquímico para transformar L-triptofano em melatonina (Figura 2). A produção de melatonina foi demonstrada em células da pele e culturas de órgãos, enquanto a imunocitoquímica verificou que essa expressão se dá nas camadas superiores da epiderme, estruturas da derme, veias e células mamárias. Similarmente à glândula pineal, a produção na pele parece ser regulada positivamente pela estimulação do receptor adrenérgico com subsequente ativação da adenilato ciclase (SLOMINSKI *et al.*, 2007).

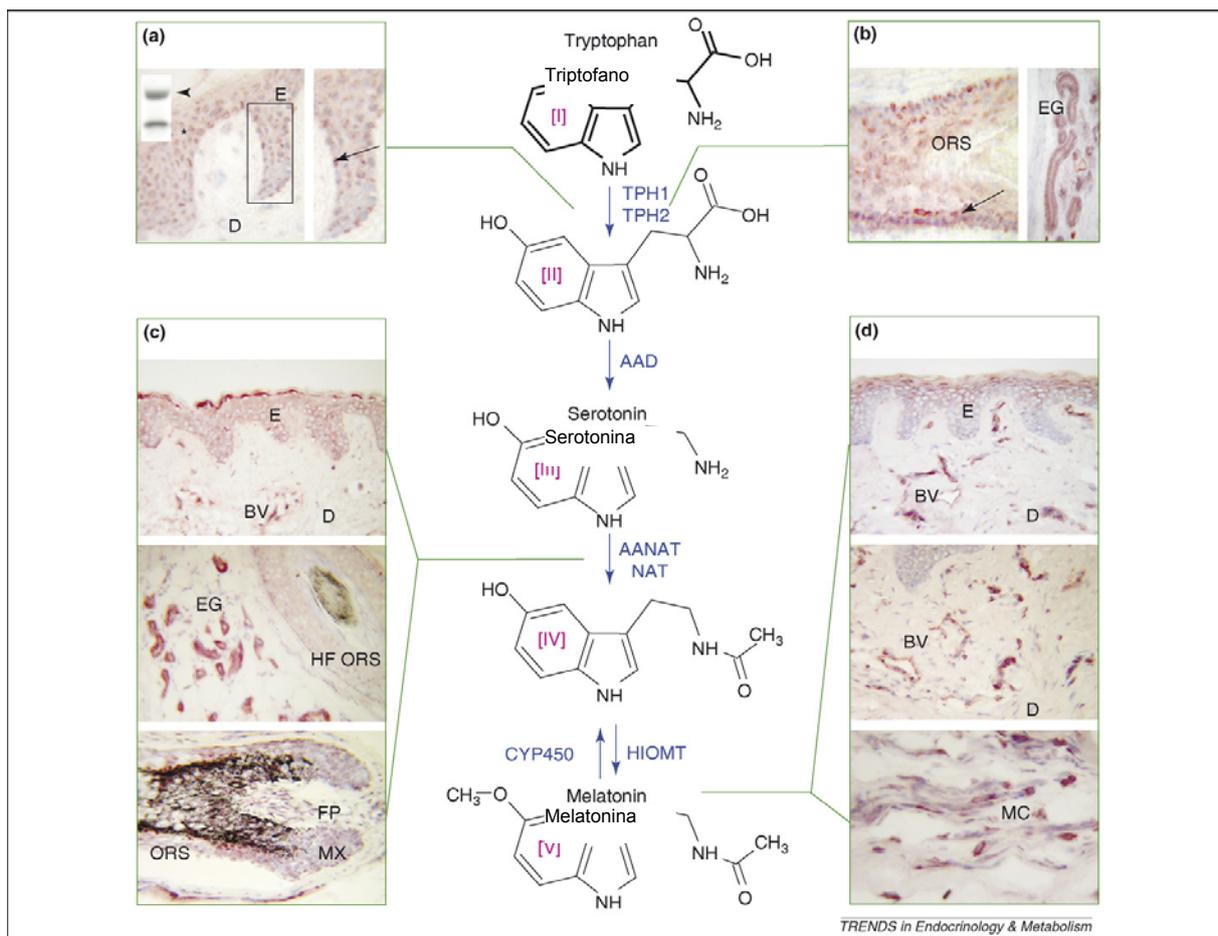


Figura 2: Rota bioquímica de síntese de melatonina na pele (Adaptado de SLOMINSKI *et al.*, 2007).

Funcionalmente, a melatonina está ligada a vários processos fisiológicos. Ela é conhecida como modulador biológico de humor, sono, fisiologia retinal, comportamento sexual, ciclo circadiano e neuroimunomodulação (BEYER *et al.*, 1998; SCHAFFAZICK *et al.*, 2005). Adicionalmente, a melatonina pode afetar as funções cerebrais, imunes, gastrintestinais, cardiovasculares, renais, da medula e endócrinas além de possuir efeitos antienvhecimento e oncostáticos (SLOMINSKI *et al.*, 2007; SANCHEZ-HIDALGO *et al.*, 2009). A melatonina vem sendo bastante estudada nos últimos anos devido a sua atividade antioxidante (BEYER *et al.*, 1998; LÓPEZ *et al.* 1998; REITER, 1998; SAIJA *et al.*, 2002, TAN *et al.*, 2007).

Radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos de moléculas, capazes de existência independente, contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais externos. Eles tendem a reagir facilmente com diversos tipos de biomoléculas, para adquirir outro elétron e estabilizar o orbital (LÓPEZ *et al.*, 1998; ANDREASSI e ANDREASSI, 2004).

A melatonina tem a habilidade de neutralizar diretamente radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, oxigênio singlete, radical peroxil, óxido nítrico e peróxido nítrico (REITER, 1998; VIJAYALAXMI *et al.*, 2004). A capacidade antirradicais livres da melatonina se estende por metabólitos secundários, terciários e quaternários; a interação com as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio é um processo prolongado que envolve muitos de seus derivados. Essa cascata de reações é altamente efetiva o que difere a melatonina dos antioxidantes convencionais (TAN *et al.*, 2007). Além disso, a melatonina estimula muitas enzimas antioxidantes, incluindo a dismutase, a glutatona peroxidase e a glutatona redutase (BAUMANN, 2002; WANG *et al.*, 2005). Assim como a vitamina E, a melatonina é capaz de proteger contra as reduções da fluidez da membrana associadas ao processo de lipoperoxidação (REITER, 1998). Experimentos de permeação com membranas biológicas mostraram que a melatonina é capaz de atravessar as biomembranas, podendo assim proteger os componentes intracelulares contra a peroxidação (SAIJA *et al.*, 2002).

Um dos principais inconvenientes do metabolismo aeróbico é o estresse oxidativo, que se origina como consequência da produção de radicais livres. A utilização de O₂ pelos organismos vivos causa lesões celulares, cujos efeitos vão se acumulando com a idade (LÓPEZ *et al.*, 1998). Estresse oxidativo ocorre quando há uma excessiva produção de radicais livres e/ou pequena defesa antioxidante, que levam a alterações químicas de biomoléculas causando modificações estruturais e funcionais (WANG *et al.*, 2005). Clinicamente, o estresse oxidativo é proposto como causa de dano tecidual em muitas desordens patofisiológicas como hipóxia, inflamação, isquemia tecidual e reperfusão. Outras teorias alegam que o estresse oxidativo é o responsável por disfunções neurológicas associadas com doenças neurodegenerativas incluindo mal de Parkinson, Alzheimer, entre outros. Além disso, os radicais livres e o estresse oxidativo estão implicados no processo normal de envelhecimento (BEYER *et al.*, 1998).

As concentrações de melatonina e seus metabólitos mostram-se alteradas no plasma e urina, respectivamente, em diversas condições, como Alzheimer, dor crônica, câncer colorretal, doença coronária, demência, enxaqueca, hipotensão ortostática, esquizofrenia e desordem afetiva sazonal (VIJAYALAXMI *et al.*, 2004). Estudos sugerem que o declínio da concentração de melatonina idade-dependente resulta em uma perda da habilidade antioxidante no indivíduo contra danos produzidos por radicais livres (REITER *et al.*, 2002).

A pele é o tecido mais frequentemente exposto ao estresse oxidativo, por fontes endógenas e exógenas. Fontes exógenas incluem poluentes do ar, toxinas e radiações, ionizantes e não-ionizantes, além de bactérias e vírus. Fontes endógenas incluem a produção de espécies reativas por neutrófilos, fagócitos e enzimas, que podem produzir metabólitos ativos de oxigênio diretamente ou indiretamente. Eventos isquêmicos e pós-isquêmicos são os maiores contribuintes para o estresse oxidativo na pele (KOHEN *et al.*, 2004).

Devido às suas propriedades imunomoduladoras e antirradicais livres, o uso tópico da melatonina para proteger a pele contra os danos oxidativos induzidos pela exposição a radiações solares foi proposto (TURSILLI *et al.*, 2006). Esses danos

incluem eritema, edema, dor seguida de esfoliação, bronzeamento e espessamento epidermal, além de envelhecimento precoce da pele e carcinogênese devido à exposição crônica (DREHER *et al.*, 1998). Antioxidantes tópicos são usados correntemente para a prevenção do envelhecimento e danos induzidos pela radiação ultravioleta, assim como para o tratamento de rugas e eritemas (BAUMANN, 2002). Duas condições são requeridas para um agente protetor tópico contra danos foto-oxidativos: ele deve permear pelo estrato córneo chegando às camadas profundas da pele, e não extravasar significativamente para a corrente sanguínea (MARTI-MESTRES *et al.*, 2007).

Considerando a sua absorção oral variável, o pequeno tempo de meia vida biológico (aproximadamente 45 min), o extenso metabolismo de primeira passagem e um favorável coeficiente de partição octanol-água de 1,2, a melatonina é uma boa candidata para formas de liberação transdermal e tópica (BABU *et al.*, 2003). A fotolabilidade desse hormônio é a maior desvantagem para o tratamento tópico dos efeitos nocivos dos raios solares (TURSILLI *et al.*, 2006). Para tornar a melatonina mais estável, vários sistemas têm sido propostos, como liposferas (TURSILLI *et al.*, 2006), lipossomas elásticas (DUBEY *et al.*, 2006), etossomas (DUBEY *et al.*, 2007), quitossomas (GONÇALVES, 2008) e nanocápsulas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005; SCHAFFAZICK *et al.*, 2006, SCHAFFAZICK *et al.*, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2008).

3.2. Sistemas nanoestruturados para a aplicação cutânea de fármacos e operações de secagem

Sistemas nanoparticulados são usados para liberação controlada de fármacos, em administração parenteral, oral ou tópica. Nanopartículas são definidas como partículas poliméricas de 1 a 1000 nm de diâmetro, incluindo nanoesferas e nanocápsulas. Nanoesferas consistem de uma matriz polimérica, onde o fármaco pode encontrar-se adsorvido à superfície ou retido na partícula. Nanocápsulas são sistemas vesiculares constituídos de um núcleo oleoso e uma parede polimérica; neste caso o fármaco pode estar dissolvido no núcleo ou adsorvido a parede polimérica (COUVREUR *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2006).

Sistemas micro- e nanoestruturados estão sendo desenvolvidos, não somente para intensificar a absorção percutânea, mas também para carrear o fármaco para a pele ou suas subestruturas (SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007). Nanopartículas são utilizadas como veículos tópicos, para prolongar o tempo de residência dos agentes no estrato córneo e carrear, por exemplo, a vitamina A para as camadas mais interiores da pele (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004). A aplicação tópica de fármacos tem vantagens, como efeitos sistêmicos mínimos e direcionamento somente para as áreas da doença (GUTERRES *et al.*, 2007). A incorporação de fármacos em sistemas carreadores pode ser utilizada para protegê-los contra degradação tanto *in vitro* quanto *in vivo*, controlar sua liberação, e vetorizá-los (KOGAN e GARTI, 2006). Alves e colaboradores (2007) demonstraram que nanocápsulas foram mais eficazes na penetração de nimesulida na pele humana, comparando-se a outras nanoestruturas como nanoesferas e nanoemulsão e ao fármaco livre.

Geralmente os sistemas nanoestruturados são obtidos na forma de suspensões aquosas. No entanto, as suspensões apresentam algumas desvantagens durante a sua estocagem, como contaminação e crescimento microbianos, hidrólise não-enzimática do polímero e instabilidade físico-química devido à aglomeração e à sedimentação de partículas (MAGENHEIM e BENITA, 1991). A secagem dessas suspensões é uma maneira de aumentar a estabilidade das mesmas, porém, devido ao tamanho e a eventual sensibilidade térmica dessas partículas, aditivos são necessários para a proteção contra o estresse da secagem e conferir tamanho suficiente para preparar partículas secas (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007).

A liofilização é uma técnica bastante utilizada para secagem de nanocápsulas poliméricas, porém é uma técnica com custo elevado, dificuldades tecnológicas para a seleção de crioprotetores, além de haver a possibilidade de ruptura desses nanossistemas em baixas temperaturas (MÜLLER *et al.*, 2000).

A secagem por aspensão é uma alternativa eficiente, e apresenta diversas vantagens, tais como tempo extremamente curto de contato do líquido disperso a secar com a fonte calor, o que diminui a possibilidade de degradação dos

constituintes da amostra, a facilidade de transposição para escala industrial, e a obtenção de produtos com baixa higroscopicidade (MÜLLER, 2003). Adicionalmente, possibilita a produção de pós com melhores características físico-químicas e estabilidade que os produzidos por liofilização (MÜLLER *et al.*, 2000).

Spray drying é uma técnica que vem sendo utilizada em muitas áreas, como alimentos, farmacêutica, cerâmicas, polímeros e indústria química. Na indústria farmacêutica é usada para produzir partículas que formam a base para formas de uso parenteral, nasal, pulmonar e que são administradas em forma de suspensão, pó ou aerossol (VEHRING *et al.*, 2007).

Nosso grupo de pesquisa foi pioneiro ao demonstrar pela primeira vez em 2000, o uso da técnica de *spray-drying* para a secagem de nanopartículas poliméricas. Müller e colaboradores secaram nanocápsulas de diclofenaco utilizando 3 % (m/v) de dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem. Esse trabalho rendeu uma patente do processo: PI9906081-7 (MÜLLER *et al.*, 2000).

Mais recentemente, Beck e colaboradores utilizaram a técnica de *spray-drying* para produzir novas micropartículas nanorrevestidas compostas de um núcleo de dióxido de silício e fármaco e revestidas por nanopartículas de Eudragit S100[®]. Os autores demonstraram através de estudos de absorção utilizando células Caco-2, que essas micropartículas controlaram a permeação do fármaco através das monocamadas celulares, comparado com o fármaco livre (BECK *et al.*, 2007).

Tewa-Tagne e colaboradores (2007) testaram a secagem de nanocápsulas sem fármaco com diferentes adjuvantes de secagem hidrossolúveis, lactose, maltose, maltodextrina, polivinilpirrolidina, hidroximetilcelulose e hidroxipropilcelulose. Eles concluíram que as nanocápsulas secas por *spray-drying*, utilizando lactose como adjuvante de secagem, apresentaram os melhores resultados considerando-se a morfologia das partículas obtidas e a favorável reconstituição em água.

Considerando a melatonina, nosso grupo de pesquisa demonstrou que nanocápsulas em suspensão aquosa contendo este hormônio demonstraram maior atividade antioxidante em relação à solução do fármaco livre, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em modelos de peroxidação lipídica de lipossomas de fosfatidilcolina e de microssomas hepáticos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005). Em trabalho subsequente, Schaffazick e colaboradores (2008) demonstraram que 10 mg/kg de suspensão de melatonina nanoencapsulada mostrou uma atividade antioxidante contra lipoperoxidação em cérebro e fígado de rato, enquanto a solução do fármaco livre em mesma concentração não foi efetiva.

Schaffazick e colaboradores (2006) secaram as nanocápsulas contendo melatonina utilizando 3 % (m/v) dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem. Os autores observaram que esses pós contendo nanocápsulas são mais estáveis que as formulações de nanocápsulas em suspensão e utilizando um equipamento dotado de célula de fluxo observaram que esses pós controlaram mais eficazmente a liberação da melatonina (o modelo monoexponencial foi o que melhor descreveu esse perfil de liberação).

3.3. A lactose e a maltodextrina

A lactose é um carboidrato primário, comumente conhecido como um açúcar do leite. É um dissacarídeo formado por uma glicose e uma galactose. As indústrias oferecem vários tipos de lactose, que diferem uns dos outros conforme a forma física, pureza, tamanho de partícula e Span (PATEL e CHEN, 2008).

A lactose seca por aspersão é um ingrediente usualmente utilizado em muitas preparações de alimentos e de fármacos. É amplamente utilizada na indústria farmacêutica como excipiente quimicamente inerte, aumentando a compressão direta e protegendo disponibilidade biológica dos fármacos (PATEL e CHEN, 2008).

Tomoda e colaboradores (2008) produziram nanocompósitos de PLGA e lactose ou trealose, secos por aspersão, para utilização via pulmonar, e estudaram a decomposição destes sistemas após redispersão em água. Eles observaram que

após a redispersão em água as nanopartículas apresentavam o mesmo tamanho inicial, com ambos os açúcares.

Sham e colaboradores (2004) produziram nanopartículas de gelatina e de polibutilcianocrilato secas por aspensão utilizando lactose com adjuvante de secagem, para a administração pulmonar. O trabalho demonstrou que as nanopartículas podem ser levadas ao pulmão por partículas carreadoras, que dissolvem após o contato com o ambiente aquoso do epitélio pulmonar devido a presença da lactose.

A maltodextrina é um amido parcialmente hidrolisado, sendo composta por uma mistura de amilose e amilopectina, as quais podem influenciar diferentemente a higroscopicidade e as propriedades de comprimidos, tais como a resistência a tração, friabilidade e tempo de desintegração (GONISSEN *et al.*, 2008). Maltodextrina é um oligossacarídeo e o seu uso como adjuvante de secagem apresentou bons resultados em termos de minimizar a deposição de materiais nas paredes do equipamento *spray dryer* (LANGRISH *et al.*, 2007).

Dollo e colaboradores (2003) prepararam uma emulsão óleo em água seca por aspensão utilizando maltodextrina como adjuvante de secagem, capaz de retomar a emulsão original após a adição de água.

3.4. A pele e a penetração cutânea

A pele é composta por três camadas primárias: epiderme, derme e tecido subcutâneo. Cada camada possui características e funções específicas (BAUMANN, 2002). É uma membrana muito heterogênea e tem uma variedade de tipos de células. A camada que controla a penetração de substâncias é chamada de estrato córneo, que apesar de sua espessura de apenas 15 – 20 µm promove uma barreira efetiva (HARDGRAFT, 2001; KOGAN e GARTI, 2006). Desta forma, o estrato córneo devido a sua estrutura compacta é o principal obstáculo para a penetração de substâncias topicamente administradas na pele (BAUMANN, 2002; SHIM *et al.*, 2004; GUTERRES *et al.*, 2007). Ele é composto por feixes de queratina cercados

por um envelope celular estabilizado por proteínas e lipídios. Estes lipídios são principalmente ceramidas, colesterol, derivados do colesterol e ácidos graxos, que formam bicamadas cobrindo os corneócitos (SHIM *et al.*, 2004).

A permeação de substâncias através da pele ocorre por várias rotas: transcelular, intercelular, e pelos apêndices (folículos pilosos ou glândulas écrinas). Em condições normais a rota *via* apêndices não é muito significativa. A permeabilidade transdérmica de fármacos é influenciada principalmente por três fatores: mobilidade do fármaco no veículo, liberação do fármaco pelo veículo e permeação do mesmo pela pele. Vários mecanismos são utilizados para aumentar a penetração das substâncias pela pele, incluindo os que afetam diretamente a pele e os que alteram a formulação, como alteração de partição, difusão ou solubilidade (HARDGRAFT, 2001; KOGAN e GARTI, 2006).

Os métodos para determinação da absorção percutânea e liberação dérmica podem ser divididos em duas categorias: *in vivo* e *in vitro*. Os métodos *in vivo* em animais experimentais são tradicionalmente usados, e possuem algumas vantagens em relação aos métodos *in vitro*, como geração de sistema cinético e informações metabólicas. As desvantagens são a utilização de animais vivos, a necessidade de utilização de material radiomarcado para obtenção de resultados confiáveis, a dificuldade em determinar a fase inicial de absorção e as diferenças de permeabilidade da pele de animais e humanos. A pele animal é geralmente mais permeável. As vantagens da utilização de metodologias *in vitro* são: a possibilidade de utilização de pele tanto humana quanto de outros animais; o fato de que muitas replicatas podem ser feitas usando o mesmo ou diferentes sujeitos; não utilizar animais vivos; propiciar que uma gama de formas físicas pode ser estudada (inclusive sólidos e granulados) e a possibilidade de verificação de diferenças de absorção em peles lesadas que pode ser observada sem infringir questões éticas. A limitação associada com a metodologia *in vitro* é que a condição *sink* do fluxo sanguíneo periférico não consegue ser completamente reproduzida (OECD, 2004).

Uma técnica *in vitro* frequentemente usada para o estudo da liberação de fármacos em formulações tópicas é a de células de difusão de Franz.

Concentrações do composto de interesse são encontradas no fluido acceptor, que é separado do veículo doador por uma membrana. O fármaco é aplicado na face superior da membrana. Usa-se pele humana ou animal (rato e porco principalmente) (SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007).

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Matérias-primas

- Carbopol 940[®] (BFGoodrich);
- Diazolidil uréia (Sarfam);
- Eudragit S 100[®] (Almapal);
- Lactose (Henrifarma);
- Lauril sulfato de sódio (Via Farma);
- Maltodextrina – Glucidex 6[®] (Roquette);
- Melatonina (Acros);
- Monooleato de sorbitano – Span 80[®] (Delaware);
- Polissorbato 80 - Tween 80[®] (Delaware);
- Trietanolamina (Delaware);
- Triglicerídeos de cadeia média caprílico/cáprico (Brasquim).

4.1.2. Solventes

- Acetona p.a. (Nuclear);
- Acetonitrila grau CLAE (Merck);
- Água MilliQ[®] (Millipore);
- Etanol p.a. (Synth);

- Éter etílico (Nuclear);
- Metanol grau CLAE (Merck).

4.1.3. Aparelhos e equipamentos

- Balança analítica (APX-200, Denver Instruments);
- Células de Franz (fabricação local);
- Centrífuga Eppendorff (Centrifuge 5417R);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência: coluna (Licrospher[®] RP-18 Merck), bomba e auto-injetor (S200 Perkin-Elmer), detector (SPD-10A, Shimadzu; programa LC 10);
- Evaporador rotatório R-114 (Büchi);
- Medidor de espessura (Dial Thickness Cage, Mitutoyo);
- Karl Fisher (Titro Matric 1S);
- Mastersizer 2000[®] (Malvern Instrument);
- Microscópio Eletrônico de Varredura (JSM-5800, ExII);
- Potenciômetro (Micronal B474);
- Spray-Dryer MSD[®] 1.0 (Labmaq do Brasil LTDA);
- Turbiscan LAb[®] (Formulaction);
- Volúmetro de compactação (J. Engelsmann);
- Zetasizer[®] Nano ZEN3600 (Malvern Instruments Limited).

4.1.4. Outros Materiais

- Filtros Microcon 10000 Å (Millipore);
- Membranas de polivideno HVLP 0,45 µm (Millipore);
- Sacos de celulose 25 mm poro 12000-14000 Da (Sigma Aldrich).

4.1.5. Material biológico

A pele utilizada nos experimentos foi proveniente de recortes abdominais de suínos fêmeas, doados pelo Frigorífico Porto de Ijuí, da cidade de São Luiz Gonzaga, RS. Na limpeza da pele primeiramente os pelos e a gordura subcutânea foram retirados, depois limpou-se a parte interna com éter etílico para retirar o excesso de gordura e a parte externa com lauril sulfato de sódio. Recortaram-se pedaços de 16 cm² aproximadamente, que foram embalados em papel alumínio e estocados a – 4 °C por no máximo 1 mês.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação das nanocápsulas contendo melatonina

As nanocápsulas foram preparadas de acordo com o método clássico de deposição interfacial de polímeros pré-formados descrito por Fessi e colaboradores (1989). A fase orgânica contendo melatonina (0,0125 g), triglicerídeos caprílico/cáprico (0,8 mL), Eudragit S 100[®] (0,25 g) e Span 80[®] (0,1915 g) dissolvidos em 67 mL de acetona foi vertida na fase aquosa (133 mL) contendo Tween 80[®] (0,1915 g). O solvente orgânico foi removido e a água foi evaporada até obtenção de um volume final de 25 mL (0,5 mg/mL de melatonina) em um evaporador rotatório (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005).

4.2.2. Secagem por aspersão

As suspensões de nanocápsulas foram seca no *Spray-Dryer* MSD[®] 1.0 (Labmaq do Brasil LTDA), após adição de 10 % (m/v) de lactose (NCL) ou de maltodextrina (NCM) à amostra, como adjuvantes de secagem, e mantidos por agitação magnética por 10 min (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007). Os parâmetros empregados foram: temperatura de entrada de 150 °C ± 4 °C e fluxo de amostra 0,3 L/h. Os pós foram retirados do frasco coletor e estocados a temperatura ambiente.

4.2.3. Caracterização das suspensões de nanocápsulas

O tamanho médio das partículas e o potencial zeta das suspensões foram determinados a 25 °C utilizando o Zetasizer[®] Nano ZEN3600. O diâmetro de partículas e o índice de polidispersão foram determinados em amostras diluídas (1:500) com água MilliQ[®], enquanto o potencial zeta foi determinado utilizando amostras diluídas (1:500) em solução aquosa de NaCl (10 mM).

A determinação do pH foi realizada utilizando potenciômetro (Micronal B474), previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0. A medida foi realizada diretamente na suspensão e o resultado corresponde à média de três repetições.

4.2.4. Doseamento e eficiência de encapsulação

O doseamento da melatonina foi realizado por CLAE, através de método previamente validado por Schaffazick e colaboradores (2005). A fase móvel foi composta de acetonitrila/água (55: 45) (v/v), sob fluxo de 0,7 mL/min, a 229 nm e tempo de análise de 7 min. A melatonina livre foi separada do sistema através de ultrafiltração-centrifugação e a melatonina total determinada após diluição das nanocápsulas em acetonitrila. A determinação da eficiência de encapsulação se deu através da diferença entre as concentrações de melatonina total e livre (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005).

4.2.5. Caracterização dos pós de nanocápsulas

Rendimento: O rendimento da etapa de secagem foi calculado somando-se as massas dos produtos utilizados na preparação das nanocápsulas (descontando a água) e do adjuvante de secagem, comparando-se que com a quantidade de pó obtido após a operação de secagem. O resultado é expresso em porcentagem (%).

Tamanho das partículas: Os diâmetros dos pós secos por aspersão foram mensurados utilizando-se Mastersizer 2000[®]. Foram empregadas a *via seca* (Scirocco 2000 dry powder feeder, Malvern) para medir o diâmetro das amostras de lactose, maltodextrina, NCL e NCM. A *via úmida* (Hydro SM small volume sample dispersion unit, Malvern) com água foi empregada para verificar a alteração do tamanho das partículas presentes em cada amostra (NCL e NCM) em função do tempo de análise. Cada formulação foi colocada no amostrador e em tempos determinados o diâmetro foi medido (0, 5, 15, 30, 45 e 60 min). O tempo zero foi adotado para a leitura feita na amostra quando ela era colocada no amostrador.

4.2.5.1. Teor de umidade dos pós

O teor de umidade das amostras secas por aspersão foi calculado utilizando a técnica de Karl Fischer (Titro Matric 1S), titulometria em meio não aquoso. As amostras foram analisadas em triplicata.

4.2.5.2. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras sólidas foram visualizadas utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (JSM-5800, ExII) analisadas a 10 kV. Para isso, as amostras foram previamente metalizadas com ouro. Esse experimento foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

4.2.5.3. Doseamento da melatonina nos pós de nanocápsulas

As formulações NCL e NCM foram individualmente pesadas e dissolvidas com metanol. Após agitação de 10 min seguida de centrifugação, o sobrenadante foi filtrado e doseado por CLAE (conforme técnica descrita no item 4.2.4).

4.2.5.4. Densidades bruta e de compactação dos pós de nanocápsulas

Os sólidos foram analisados quanto ao seu volume de compactação utilizando um volúmetro de compactação (J. Engelsmann). Os pós foram pesados em uma proveta calibrada e obteve-se assim a densidade aparente (dAP). Após, essa proveta com amostra foi colocada no volúmetro e aplicaram-se 1250 quedas para a compactação da amostra e mais 1250 quedas até volume constante, obtendo-se no final a densidade de compactação (dCP). Calculou-se então o Índice de Hausner e Índice de Carr para cada amostra (Equações 1 e 2, respectivamente).

$$I_{HAUSNER} = \frac{dCP}{dAP}$$

Equação 1

$$I_{CARR}(\%) = \frac{(dCP - dAP)}{dCP} \times 100$$

Equação 2

4.2.6. Preparação dos hidrogéis contendo melatonina

Os géis foram preparados com 0,5 % (m/v) de Carbopol 940[®], 0,2 % (m/v) de diazolidinil uréia e trietanolamina. Para a formulação do gel contendo a suspensão de nanocápsulas de melatonina (GS) utilizou-se a própria suspensão como fase aquosa da formulação, obtendo-se então um gel com a mesma concentração de fármaco que na suspensão (0,5 mg/g). Para os géis contendo os pós de

nanocápsulas de melatonina secas utilizando lactose com adjuvante de secagem (GNL) e maltodextrina (GNM), utilizou-se a mesma proporção de fármaco, pesando-se em torno de 1,57 g de pó de nanocápsulas para cada 10 g de gel de Carbopol 940[®] e incorporando-se o sólido em semissólido previamente preparado. No gel contendo o fármaco livre (GF), incorporou-se 0,5 mg de melatonina por g de gel previamente preparado.

4.2.7. Caracterização dos hidrogéis contendo melatonina

Os hidrogéis foram caracterizados quanto as suas propriedades organolépticas (aspecto, cor e odor) e pH. O pH dos géis foi analisado utilizando potenciômetro (Micronal B474) e as análises foram realizadas em triplicata diretamente nos semissólidos.

4.2.8. Análise da estabilidade

A análise da estabilidade da suspensão e dos géis foi realizada utilizando o analisador óptico Turbiscan Lab (Formulation), empregando a metodologia retroespalhamento de luz dinâmico. As leituras foram realizadas a cada 6 min por 20 h.

4.2.9. Liberação *in vitro* através do método do saco de diálise

A diálise foi realizada utilizando-se sacos de celulose. O meio receptor utilizado foi uma solução de 5 % em água (v/v) de Tween 80[®]. O meio foi selecionado após a realização do teste de solubilidade da melatonina, para que o total de fármaco da diálise não ultrapassasse 10 % da concentração de saturação, garantindo-se assim que o experimento ocorresse em condição *sink*. Retiraram-se alíquotas do meio receptor em tempos pré-determinados (5,15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 720 e 1560 min). As amostras foram analisadas por CLAE (conforme descrito no item 4.2.4). Os experimentos foram realizados em triplicata de lotes de cada formulação.

4.2.10. Modelagem matemática

Os resultados das diálises foram analisados utilizando-se modelagem matemática com o software Micromath Scientist[®]. Para escolha do modelo matemático que melhor se ajusta aos pontos experimentais foram observados o melhor ajuste gráfico, os valores de seleção do modelo (MSC) e os coeficientes de variação obtidos.

As equações utilizadas foram equação monoexponencial, equação biexponencial estão descritas a seguir:

$$Conc = 100e^{(-kt)}$$

Equação 3

$$Conc = 100(1 - A^{(-\alpha t)} + B^{(-\beta t)})$$

Equação 4

Onde, k , α e β são as constantes de velocidade e A é o percentual dialisado na etapa rápida e B o percentual dialisado na etapa lenta.

4.2.11. Avaliação da permeação cutânea *in vitro*

A avaliação da permeação cutânea foi realizada utilizando-se o método descrito por Franz (1975). A célula utilizada possui área de 16 cm² e comporta em torno de 50 mL de meio no seu compartimento receptor. Os cortes de pele de suíno foram interfaces dos meios doador e receptor da célula de Franz. O meio receptor utilizado foi solução de 5 % (v/v) de Tween 80[®]. A dose de amostra utilizada foi de 50 mg/cm², ou seja, em torno de 800 mg em cada célula.

Os hidrogéis de melatonina foram pesados e colocados na face superior da pele. O sistema foi fechado e mantido sob agitação a 37 °C. O fluxo da melatonina a partir das nanocápsulas através da pele foi calculado pela determinação da concentração do fármaco no líquido acceptor, em tempos previamente determinados (2, 4, 6, 8, 12 e 26 h), utilizando-se CLAE (conforme descrito no item 4.2.4). Cada experimento foi repetido em seis células.

4.2.12. Análise estatística

Os resultados da modelagem matemática da diálise (k , A , α , B e β) e os resultados da permeação da melatonina foram analisados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) com o auxílio do software Statgraphics Plus 5.1. Considerou-se o nível de significância de 0,05.

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo melatonina

A seleção das matérias-primas empregadas para a preparação das nanocápsulas baseou-se no trabalho de Schaffazick *et al.* (2005). As suspensões de nanocápsulas contendo melatonina apresentaram diâmetro médio de 220 ± 2 nm, índice de polidispersão de $0,29 \pm 0,04$, potencial zeta de $- 11,25 \pm 5,12$ mV e pH $3,95 \pm 0,22$. A eficiência de encapsulação foi de $63,18 \pm 1,87$ % e o teor de fármaco de $95,33 \pm 0,6$ %. Todos estes valores são condizentes com o método, fármaco e matérias-primas empregados na preparação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005). Estas suspensões foram submetidas à secagem por aspensão, visando à obtenção de um produto pulverulento, potencialmente mais estável frente ao armazenamento do que as formulações líquidas.

5.2. Caracterização dos pós de nanocápsulas contendo melatonina

Os rendimentos das operações de secagem foram de $54,7 \pm 4,3$ % e $49,2 \pm 6,4$ %, para as formulações utilizando como adjuvantes de secagem a lactose (NCL) ou a maltodextrina (NCM), respectivamente. As nanocápsulas foram secas eficientemente, uma vez que os pós obtidos apresentaram teores de umidade inferiores a 2 %: $1,11 \pm 0,15$ % para NCL e $1,74 \pm 0,29$ % para NCM. Os doseamentos de melatonina nas formulações NCL e NCM demonstraram não haver perdas de fármaco durante o processo de retirada de água das formulações. Obteve-se teor de 98,9 % de melatonina no produto NCL e de 104,9 % na formulação NCM. Os diâmetros das partículas obtidas por *via seca* no equipamento Mastersizer 2000[®] estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição do diâmetro das partículas utilizando Mastersizer 2000[®] via seca (em μm):

Formulação	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)	d (4,3)	Span
Lactose	2,58	6,36	46,75	26,23	6,84
NCL	5,20	11,74	51,75	28,95	3,97
Maltodextrina	3,13	5,95	9,76	6,13	1,11
NCM	34,20	131,54	529,50	233,57	3,76

As nanocápsulas secas com lactose (NCL) apresentaram diâmetro médio de 28,95 μm com um valor de Span (índice que expressa a dispersão do tamanho das partículas) de 3,97. Comparando-se estes valores com a lactose pura nebulizada, submetida ao mesmo procedimento de secagem, verifica-se similaridade dos diâmetros de partículas (26,23 μm) e uma redução do valor de Span (6,84), o que significa que as nanocápsulas secas apresentaram menor distribuição de partículas, sendo, portanto, um produto pulverulento mais homogêneo.

Por outro lado, as nanocápsulas secas com maltodextrina (NCM) apresentaram diâmetro médio de 223,57 μm , valor muito superior ao da maltodextrina seca por aspersão, que possui um diâmetro médio 6,13 μm . Porém, o valor de Span foi menor para o adjuvante puro (1,11), quando comparado ao Span da formulação NCM foi de 3,76, significando que essas nanocápsulas secas com maltodextrina formam aglomerados apresentando uma distribuição mais ampla de populações de partículas, comparado com o adjuvante de secagem nebulizado.

Teoricamente, quando essas partículas são redispersas em água o adjuvante se dissolve e as partículas (nanocápsulas) tendem a retomar ao seu diâmetro inicial,

na medida em que no presente trabalho foram empregados excipientes hidrossolúveis, lactose e maltodextrina. Para a confirmação desse fenômeno, as amostras de NCL e NCM analisadas no equipamento Mastersizer 2000[®] (*via úmida*) e o diâmetro foi medido em tempos determinados. Na Figura 3 estão os gráficos de diâmetro obtidos para o produto NCL e na Figura 4 os resultados para a formulação NCM.

A Figura 3 apresenta o comportamento da formulação NCL frente à desaglomeração em água no tempo zero e após 5, 15 e 60 min de análise. Pode-se verificar que o pó redispersa rapidamente em água. No tempo zero são observadas três populações, duas micrométricas e uma nanométrica. Com o passar do tempo a formulação retoma o tamanho original das nanocápsulas, em torno de 200 nm (média), após 60 min de análise. O emprego deste adjuvante de secagem hidrossolúvel, a lactose, é interessante, pois além de permitir a secagem eficiente das nanocápsulas, possibilitou a fácil redispersão dos pós, mediante a sua solubilização, com retomada das nanocápsulas em suspensão. Estas nanocápsulas em pó podem ser consideradas como insumos ou intermediários para a obtenção de formas semissólidas finais e diversas aplicações podem ser vislumbradas.

O comportamento frente à redispersão em água da amostra NCM pode ser observado na Figura 4. Empregando-se este adjuvante de secagem um perfil de ressuspensão diferenciado é verificado, pois se observa uma desintegração muito mais lenta dos agregados micrométricos. Durante todo o estudo pode-se observar que as duas populações presentes, uma nano- e outra micrométrica, permaneceram durante os 60 min, com leve diminuição no volume de partículas micrométricas e conseqüente aumento no volume de partículas nanométricas. Além disso, as partículas nanométricas ficaram com tamanho em torno de 950 nm, tendo assim um aumento no tamanho da partícula após etapa de secagem.

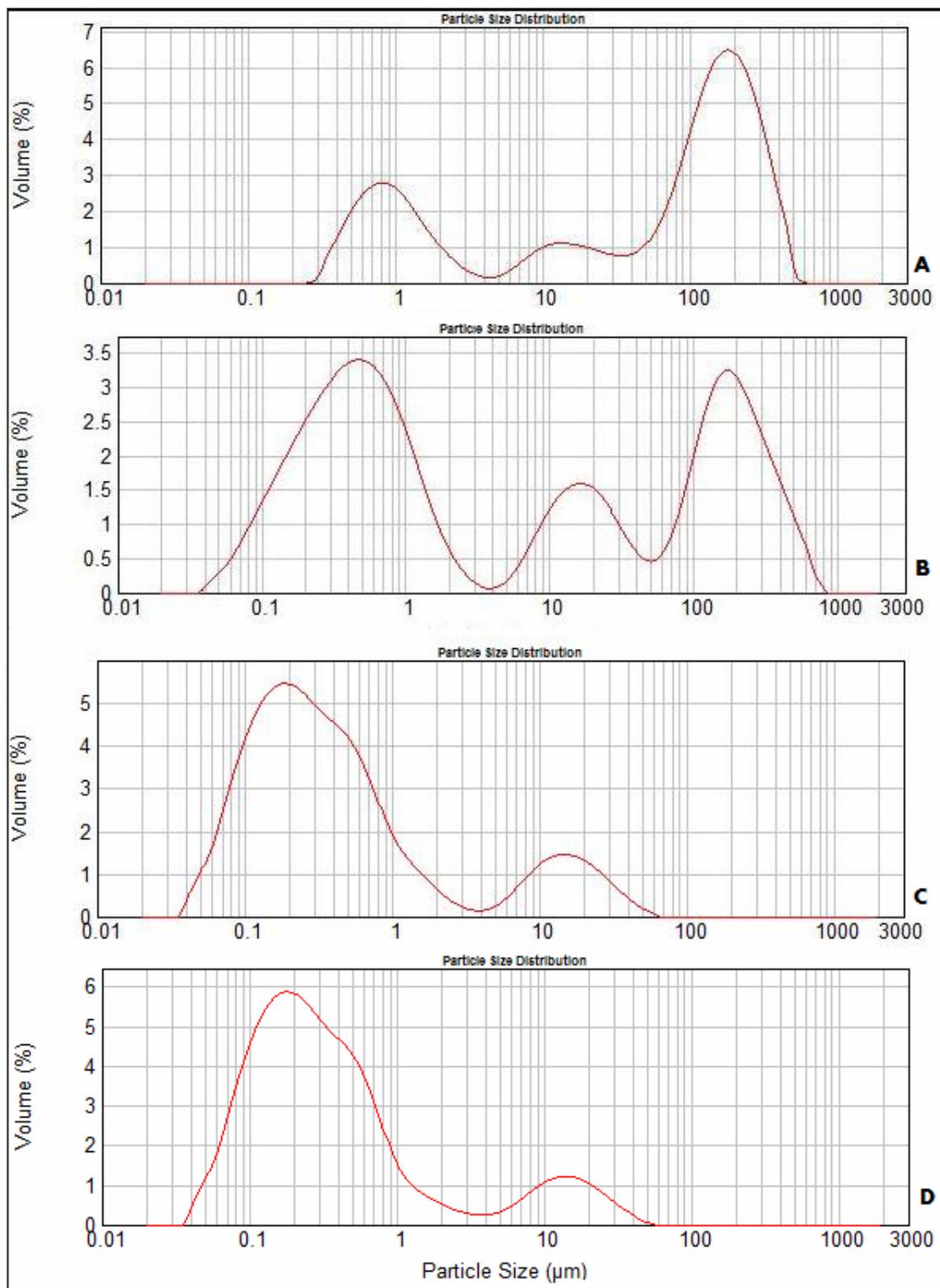


Figura 3. Tamanho de partículas (μm) por volume (%) da formulação NCL onde A é o tempo 0, B = 5 min, C = 15 min e D = 60 min.

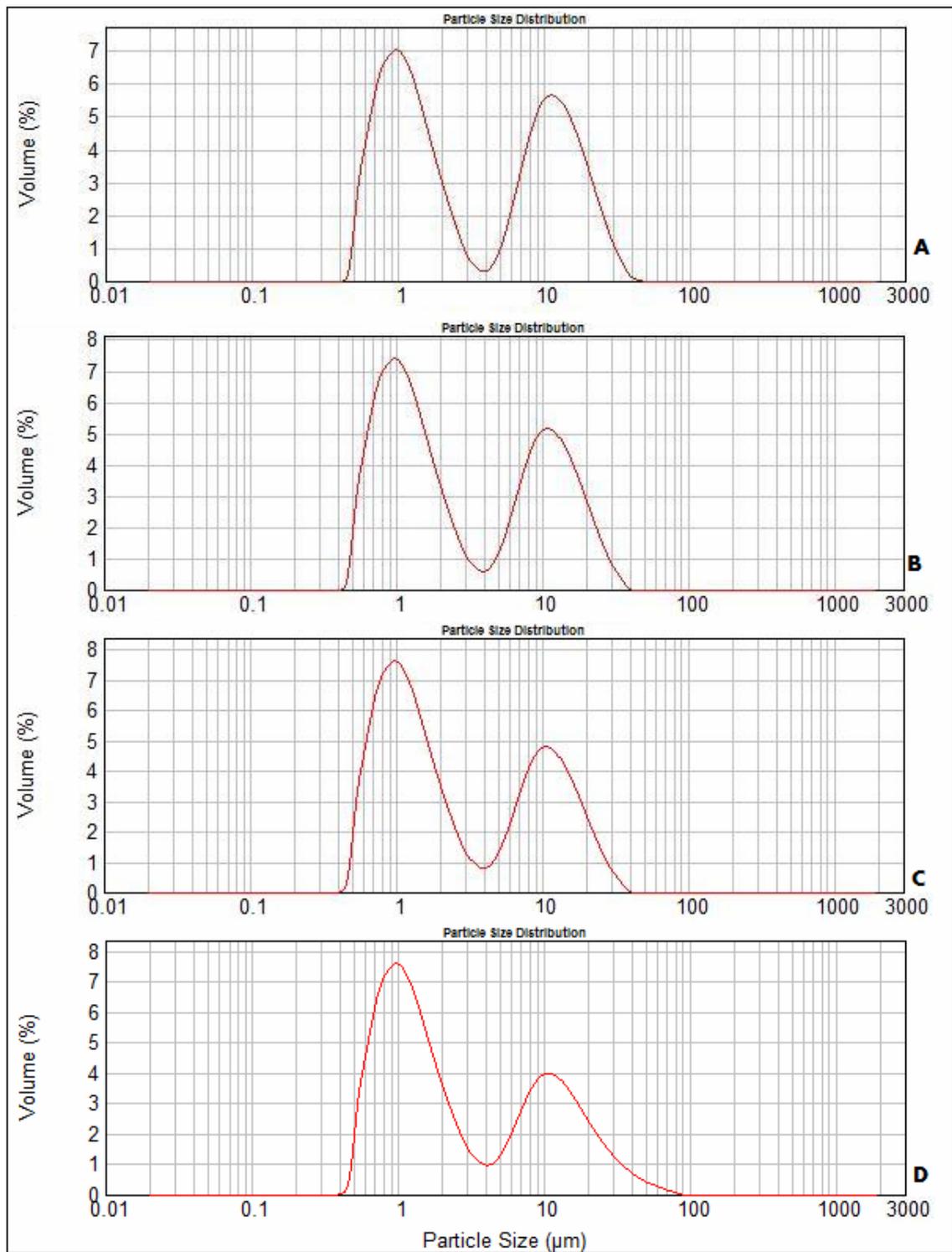


Figura 4. Tamanho de partículas (μm) por volume (%) da formulação NCM onde A é o tempo 0, B = 5 min, C = 15 min e D = 60 min.

A análise macroscópica das partículas obtidas por secagem por aspersão (NCM e NCL) mostrou tratar-se de pós brancos, com aspecto pulveréreo fino e com formação de pequenas aglomerações de partículas.

Ambos os pós de nanocápsulas (NCL e NCM) foram observados através de microscopia eletrônica de varredura (Figura 5). As fotomicrografias revelaram as diferenças morfológicas entre as nanocápsulas secas com os adjuvantes hidrossolúveis e os adjuvantes secos por aspersão. As fotomicrografias obtidas das NCL apresentam partículas homogêneas, esféricas e com um aspecto pouco diferenciado em relação à lactose seca por aspersão. As fotomicrografias obtidas das NCM apresentaram partículas esféricas e com ampla distribuição de tamanho e aspecto morfológico muito distinto da maltodextrina seca por aspersão, desaparecendo o aspecto colabado do adjuvante.

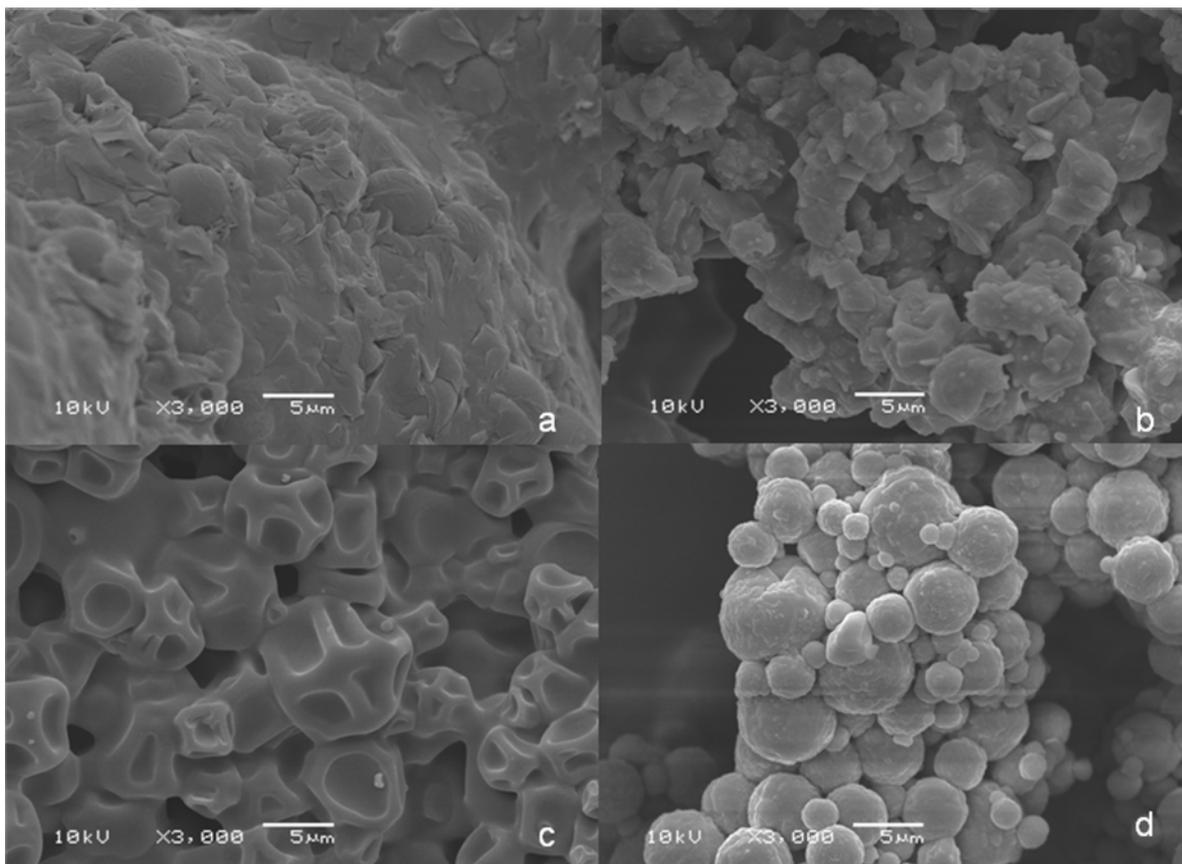


Figura 5. Fotomicrografias (aumento de 3000 x) de a: lactose seca por aspersão; b: NCL; c: maltodextrina seca por aspersão e d: NCM.

Na Figura 6 estão relacionadas fotomicrografias observadas com um aumento de 40000 x das formulações NCL e NCM. Nestas imagens pode-se observar que a superfície das partículas é irregular e mostra a presença de nanopartículas envolvidas pelos adjuvantes de secagem. Destaca-se que no trabalho de Tewa-Tagne e colaboradores (2007) não foram visualizados nanocápsulas nas micrografias da formulação obtida por *spray drying* utilizando-se lactose como adjuvante de secagem.

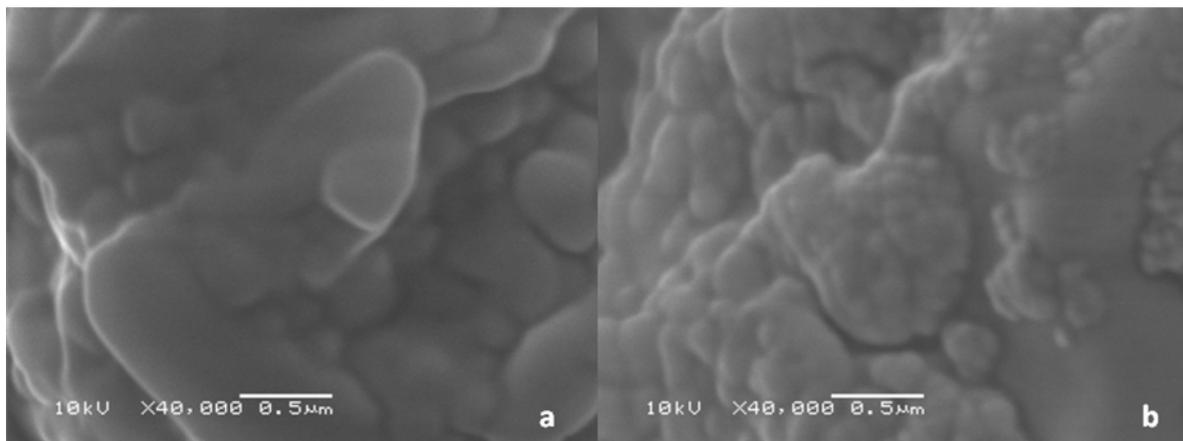


Figura 6. Fotomicrografias (aumento de 40000 x) de a: NCL e b: NCM.

A Tabela 2 relaciona os resultados de densidades [aparente (dAP) e de compactação (dCP)] e os índices de Hausner e de Carr dos pós de nanocápsulas (NCL e NCM) e os respectivos adjuvantes de secagem.

O Índice de Carr exprime em forma percentual a capacidade de compactação e compressibilidade de um pó ou granulado. O Índice de Hausner informa que valores menores que 1,25 indicam bom fluxo, valores maiores que 1,5 indicam fluxo ruim, valores entre 1,25 e 1,5 exigem a adição de lubrificantes para melhor o escoamento.

Os resultados para a lactose foram dAP = $0,23 \pm 0,02$ g/mL, dCP = 0,44 g/mL, I_{Hausner} de $1,97 \pm 0,19$ e I_{Carr} de 49 ± 5 %. Por outro lado, os resultados obtidos para NCL foram menores: dAP = 0,15 g/mL, dCP = $0,28 \pm 0,01$ g/mL, I_{Hausner} de $1,81 \pm 0,05$ e I_{Carr} de 45 ± 2 %. A maltodextrina seca por aspersão apresentou dAP

de $0,19 \pm 0,02$ g/mL, dCP de $0,37 \pm 0,05$ g/mL, IHausner de $1,91 \pm 0,36$ e ICarr de 46 ± 11 %, e as NCM apresentou dAP de $0,22 \pm 0,01$ g/mL, dCP de $0,34 \pm 0,01$ g/mL, IHausner de $1,52 \pm 0,14$ e ICarr de 34 ± 6 %. Os resultados obtidos indicam que os pós de NCL e NCM apresentam fluxo ruim, porém, o fluxo é melhor que dos adjuvantes secos por aspersão e estão adequados às matérias-primas e processo de secagem utilizado.

Tabela 2. Densidades aparente e de compactação dos sólidos e índices de Hausner e de Carr.

Excipiente/Formulação	dAP (g/mL)	dCP (g/mL)	IHausner	ICarr
Lactose	$0,23 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,00$	$1,97 \pm 0,19$	49 ± 5 %
NCL	$0,15 \pm 0,00$	$0,28 \pm 0,01$	$1,81 \pm 0,05$	45 ± 2 %
Maltodextrina	$0,19 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,05$	$1,91 \pm 0,36$	46 ± 11 %
NCM	$0,22 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,01$	$1,52 \pm 0,14$	34 ± 6 %

5.3. Caracterização dos hidrogéis

Os produtos pulverulentos foram empregados para a obtenção de formulações semissólidas na forma de hidrogéis contendo as nanocápsulas de melatonina. Para fins comparativos também foram preparados géis contendo as suspensões de nanocápsulas de melatonina. Foram obtidos géis brancos e brilhantes com odor e textura adequados. Quanto ao pH, os géis contendo a suspensão de nanocápsulas de melatonina apresentaram um pH ácido de $5,8 \pm 0,04$, enquanto que os géis contendo os pós de nanocápsulas de melatonina apresentaram valores próximos da neutralidade: $7,11 \pm 0,02$ e $7,10 \pm 0,01$, para NCL e NCM, respectivamente.

5.4. Análise da estabilidade das formulações

As análises por retroespalhamento de luz do Turbiscan Lab[®] possibilitam a identificação de fenômenos físico-químicos de instabilidade das formulações, antes mesmo da visualização por métodos convencionais de estabilidade. Todas as amostras apresentaram transmissão nula (dados não mostrados) e, desta forma, os perfis de *backscattering* foram analisados.

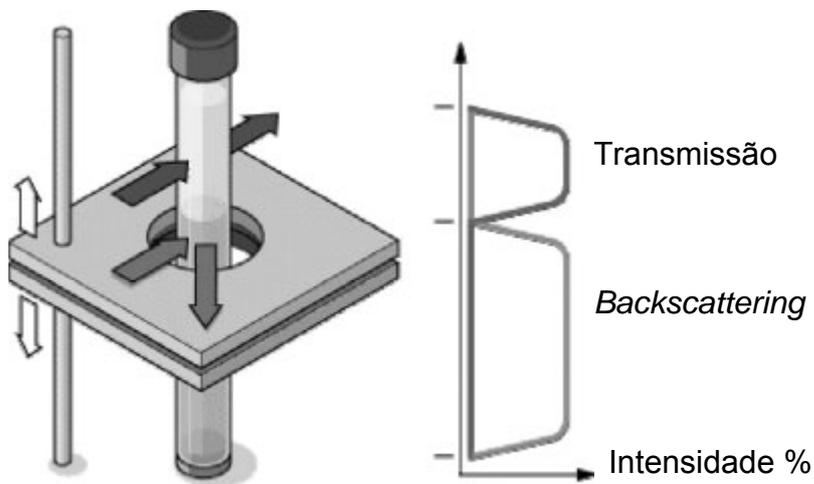


Figura 7. Ilustração esquemática do princípio de funcionamento do Turbiscan Lab[®] (adaptado de BURON *et al.*, 2004).

Na Figura 8 estão representados os gráficos da variação do *backscattering* por tempo. No gráfico a parte esquerda corresponde à base da cubeta e a direita corresponde ao topo.

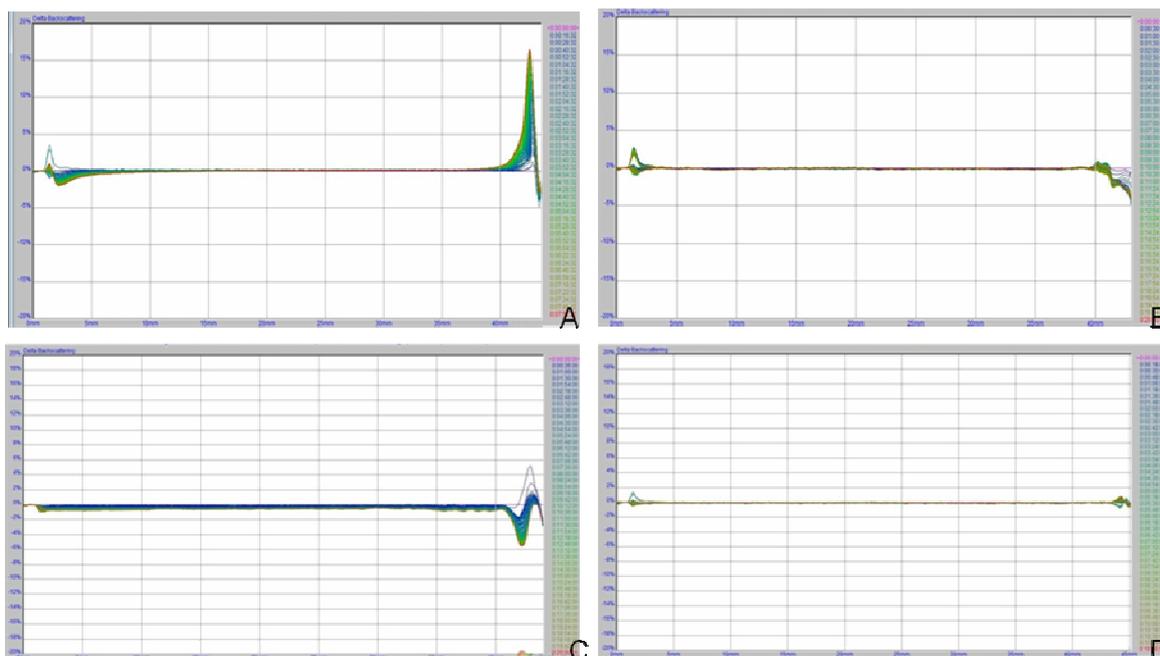


Figura 8. Resultados do Turbiscan Lab. A: SN; B: GS; C: GNM e D: GNL.

Observando-se o gráfico A, pode-se ver um aumento no *backscattering* no topo da cubeta, representando a ocorrência de cremagem na formulação, fenômeno reversível comum em suspensões. Por outro lado, no gráfico B esse fenômeno não está presente, devido à menor mobilidade e conseqüente menor aglomeração das partículas no hidrogel, em decorrência da maior viscosidade da formulação.

No gráfico referente ao gel de NCM (C) observa-se uma diminuição no *backscattering* em função do tempo de análise no centro da cubeta, isso significa que está havendo uma diminuição no diâmetro de partículas. Por outro lado, no gráfico do gel de NCL nenhuma modificação aparece com o tempo, o que indica uma maior estabilidade físico-química desse sistema em comparação as outras formulações.

Analisando-se em conjunto todos os gráficos de Turbiscan Lab[®], pode-se interpretar que todas as formulações são estáveis, pois todas as variações de *backscattering* observadas foram pouco intensas e pertinentes ao tipo de formulações analisadas, suspensões e géis.

5.5. Liberação *in vitro* através de diálise e modelagem matemática

Para os experimentos de liberação *in vitro* foi realizado um estudo preliminar para a escolha do meio; avaliando-o mediante a adição de quantidades crescentes de Tween 80[®]. Igualmente, foram realizados testes de saturação do meio, nos quais uma quantidade em excesso de melatonina foi adicionada. Selecionou-se, então, o meio com 5 % de tensoativo para a garantia de condição *sink*.

A Figura 9 apresenta os perfis de liberação de todas as formulações estudadas. Nitidamente, pode-se destacar visualmente um comportamento diferenciado para a solução de melatonina livre em solução hidroalcolica 10 % (F), a qual permitiu uma rápida e completa difusão da substância através da membrana de diálise, sendo que após 240 min de experimento o perfil alcança um platô, a partir do qual a totalidade de fármaco é quantificada. Na sequência, pode-se identificar a suspensão de nanocápsulas (SN), como sendo a formulação que apresenta um comportamento intermediário, para a qual após 480 min de experimento, mais de 90 % da totalidade da melatonina encontra-se dissolvida.

A análise frente ao comportamento de liberação de melatonina a partir dos géis contendo o fármaco livre (GF) e contendo a suspensão de nanocápsulas de melatonina (GS) demonstrou resultados similares, e em ambos os casos verificou-se uma liberação mais lenta e controlada do que a observada para a solução de melatonina (F) e para a suspensão de nanocápsulas (SN); sendo, provavelmente, este resultado uma consequência da forma de arranjo das moléculas de polímero do gel, fator que contribuiu para o controle da liberação da melatonina. Comparando-se os perfis de liberação da melatonina a partir das duas formulações de pós de nanocápsulas secas com lactose (NCL) e com maltodextrina (NCM), verificou-se perfis similares entre si e também com aqueles apresentados pelas formulações (GS e GF). Evidencia-se claramente a contribuição dos adjuvantes de secagem (lactose e maltodextrina) no controle da liberação da melatonina, ao compararem-se estas duas formulações de pós de nanocápsulas (NCL e NCM) com a suspensão de nanocápsulas de melatonina (SN); provavelmente a presença destes dois adjuvantes, propiciou microambientes saturados, os quais contribuiriam para o

retardamento da dissolução do fármaco, obtendo-se, desta forma, o efeito de liberação controlada.

Avaliando-se os perfis de liberação da melatonina a partir das formulações de géis contendo as nanocápsulas secas preparadas com lactose ou maltodextrina como adjuvantes de secagem (GNL e GNM) observa-se claramente que estas duas formulações foram as que permitiram um maior controle da liberação do fármaco. Identifica-se, igualmente, que estas duas formulações apresentaram-se mais eficientes no controle da liberação da substância por agregarem efeitos sinérgicos, quais sejam: a nanoencapsulação da melatonina, sua secagem mediante o uso de adjuvantes hidrofílicos e, finalmente, sua incorporação em hidrogéis.

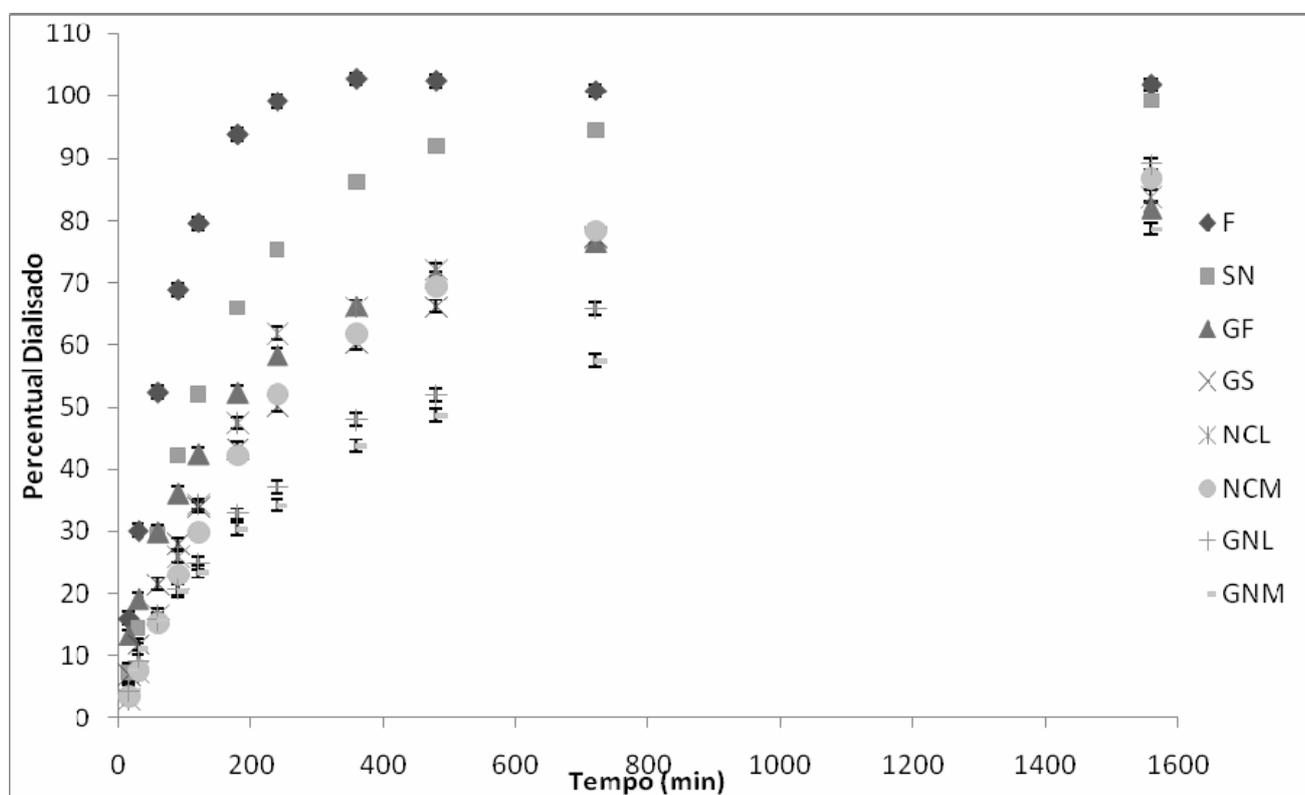


Figura 9. Gráfico dos perfis de liberação *in vitro* da melatonina nas diferentes formulações.

A partir dos resultados obtidos no experimento de diálise foi feito um estudo comparando as diversas formulações baseado na modelagem matemática dos perfis de liberação. A descrição matemática foi realizada pelo ajuste dos pontos

experimentais aos modelos monoexponencial (Equação 3) e biexponencial (Equação 4).

Para o fármaco livre solubilizado em solução de 10 % de etanol (F), a modelagem matemática indicou que o modelo monoexponencial descreveu o perfil de difusão da formulação, ou seja, o fármaco dialisa através do saco de celulose numa velocidade constante. O modelo biexponencial não descreveu corretamente o perfil de difusão do fármaco, pois o valor de B calculado foi negativo. Os resultados obtidos foram a constante de velocidade ($k = 0,013 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$), coeficiente de correlação ($r = 0,998 \pm 0,001$) e critério de seleção do modelo (MSC) = $4,17 \pm 0,71$. Na Figura 10 está apresentado o perfil *in vitro* para a formulação contendo melatonina solubilizada em solução de 10 % de etanol (F), e a modelagem matemática monoexponencial, correspondendo à taxa de difusão do fármaco através da membrana de diálise. Após 240 min de experimento, as concentrações de melatonina alcançaram um platô, apresentando-se constantes.

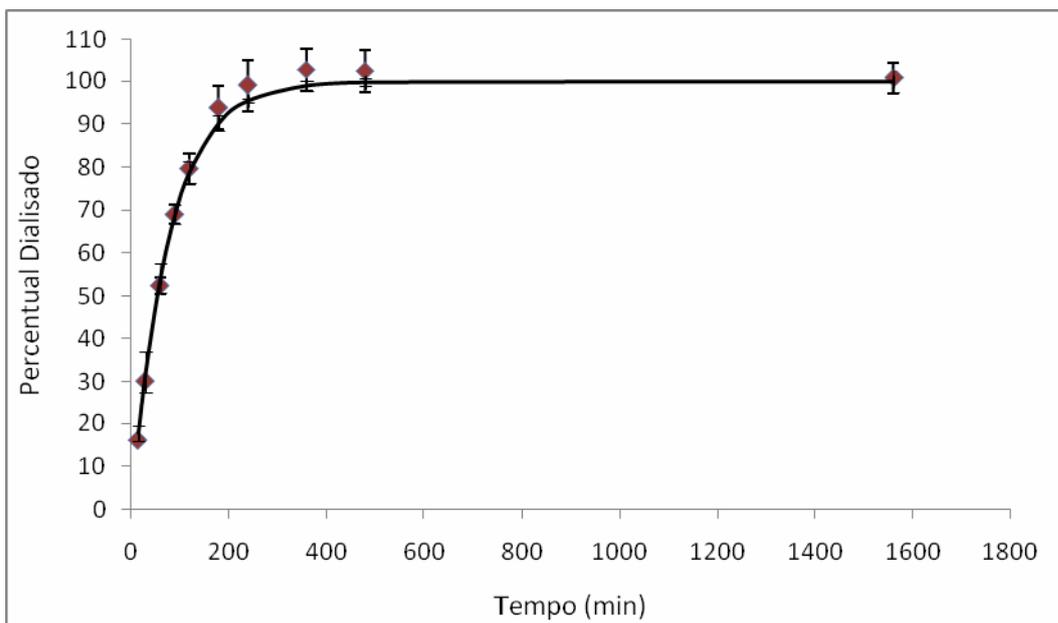


Figura 10. Perfil de difusão *in vitro* para a formulação contendo melatonina solubilizada em solução de 10 % de etanol (F) – pontos indicam os valores experimentais e a linha corresponde a modelagem matemática monoexponencial.

Os perfis de liberação da melatonina a partir das diversas formulações foram modelados utilizando ambas as equações mono- e biexponencial. Na Figuras 11, 12 e 13 estão representados estes gráficos. Os valores obtidos na equação monoexponencial e biexponencial para as outras formulações estão descritos na tabela 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Valores obtidos na equação monoexponencial:

	k	MSC	r
F	0,013 ± 0,0001	4,17 ± 0,71	0,998 ± 0,001
GF	0,004 ± 0	1,41 ± 0,14	0,966 ± 0,040
SN	0,006 ± 0,001	5,59 ± 0,14	0,999 ± 0,001
GS	0,003 ± 0	3,09 ± 0,23	0,990 ± 0,002
NCL	0,003 ± 0	2,54 ± 0,28	0,984 ± 0,003
GNL	0,002 ± 0	3,10 ± 0,13	0,986 ± 0,015
NCM	0,003 ± 0	3,34 ± 0,11	0,991 ± 0,001
GNM	0,002 ± 0	2,03 ± 0,25	0,969 ± 0,005

Tabela 4. Resultados obtidos da equação biexponencial:

	A	α	B	β	MSC	r
GF	0,559 ± 0,063	0,007 ± 0,001	0,364 ± 0,074	0,001 ± 0	6,22 ± 0,71	0,999 ± 0
SN	0,883 ± 0,097	0,007 ± 0,001	0,146 ± 0,106	0,002 ± 0,001	6,84 ± 0,58	0,999 ± 0
GS	0,271 ± 0,044	0,012 ± 0,001	0,724 ± 0,044	0,002 ± 0	6,29 ± 1,08	0,999 ± 0
NCL	0,800 ± 0,023	0,006 ± 0	0,283 ± 0	0,001 ± 0	5,41 ± 0,18	0,999 ± 0
GNL	0,165 ± 0,059	0,016 ± 0	0,841 ± 0,003	0,001 ± 0	5,74 ± 0,33	0,999 ± 0
NCM	0,777 ± 0,014	0,004 ± 0	0,244 ± 0,016	0,001 ± 0	6,30 ± 1,27	0,999 ± 0
GNM	0,216 ± 0,010	0,007 ± 0	0,739 ± 0,015	0,001 ± 0	6,17 ± 0,91	0,999 ± 0

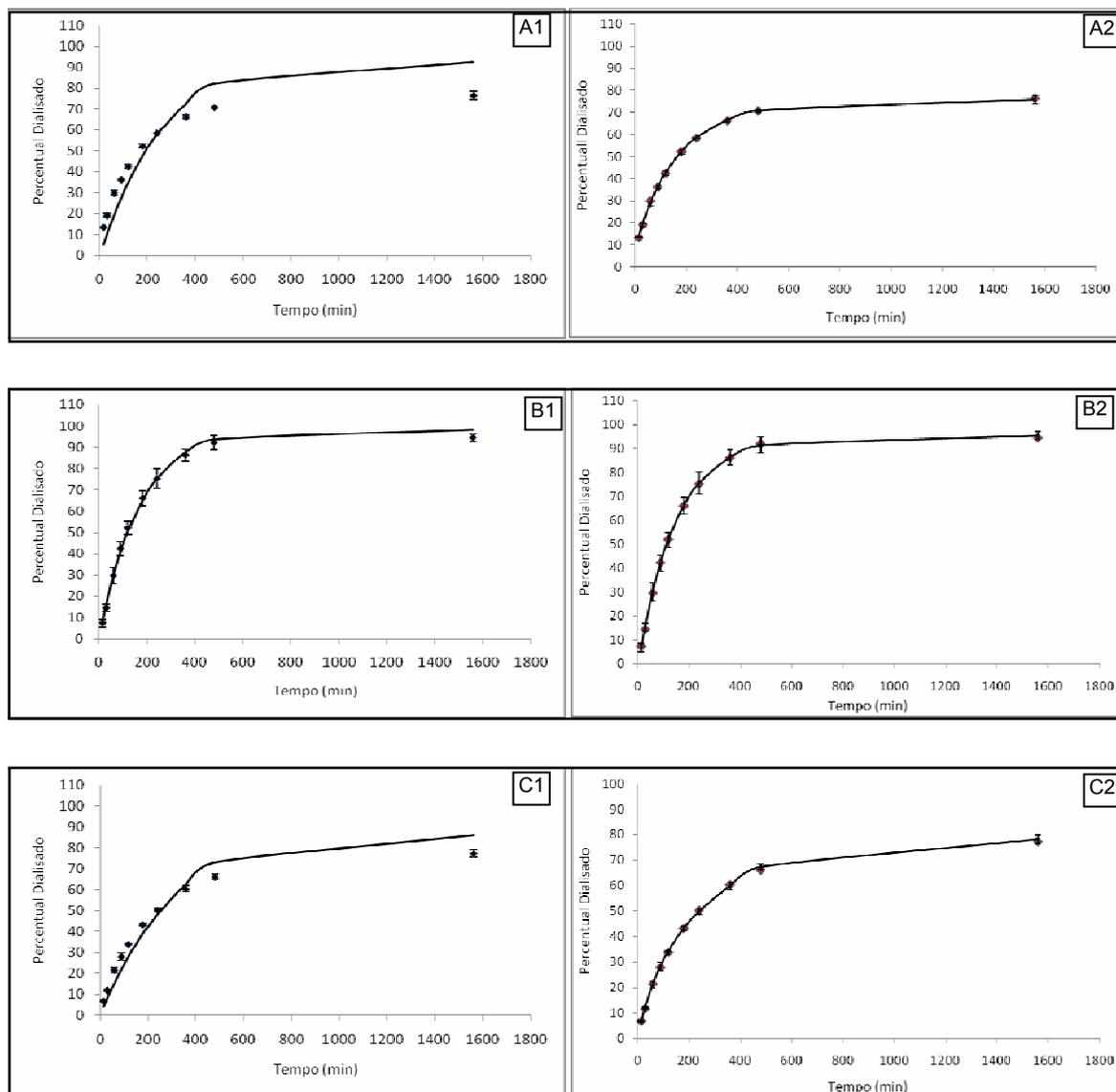


Figura 11. Perfis de liberação das formulações A = GF, B = SN, C = GS, onde 1 é a equação monoexponencial e 2 a equação biexponencial.

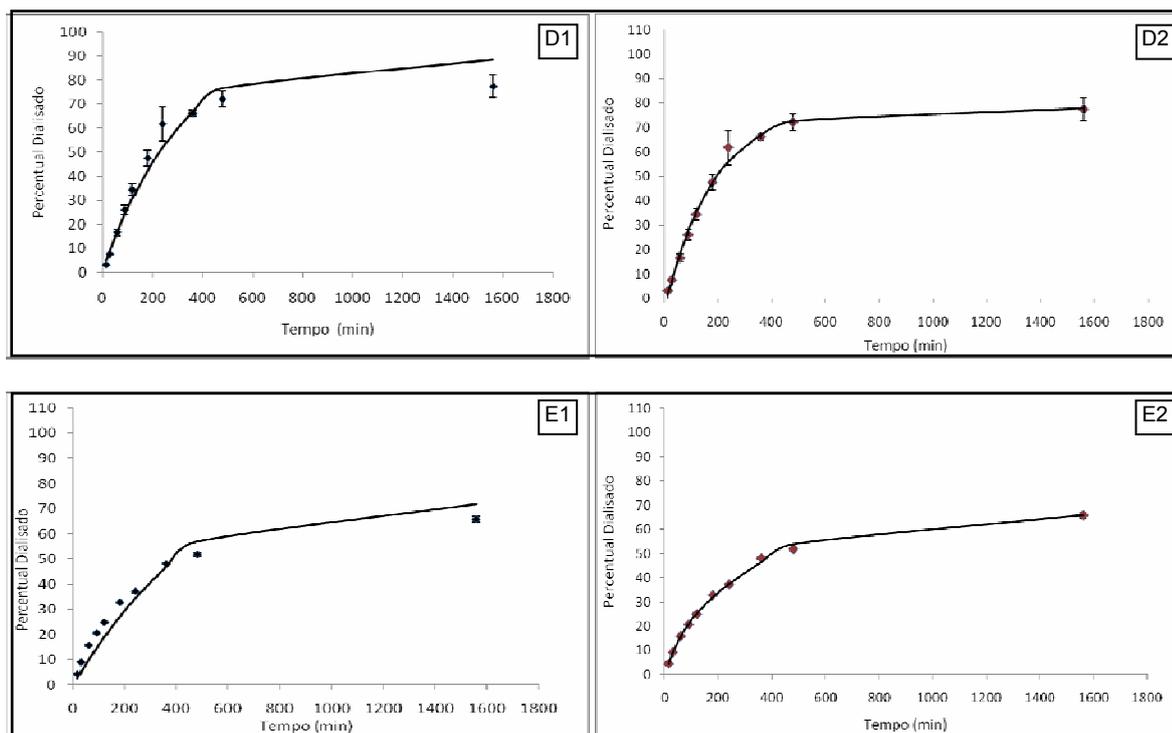


Figura 12. Perfis de liberação das formulações D = NCL e E = GNL, onde 1 é a equação monoexponencial e 2 a equação biexponencial.

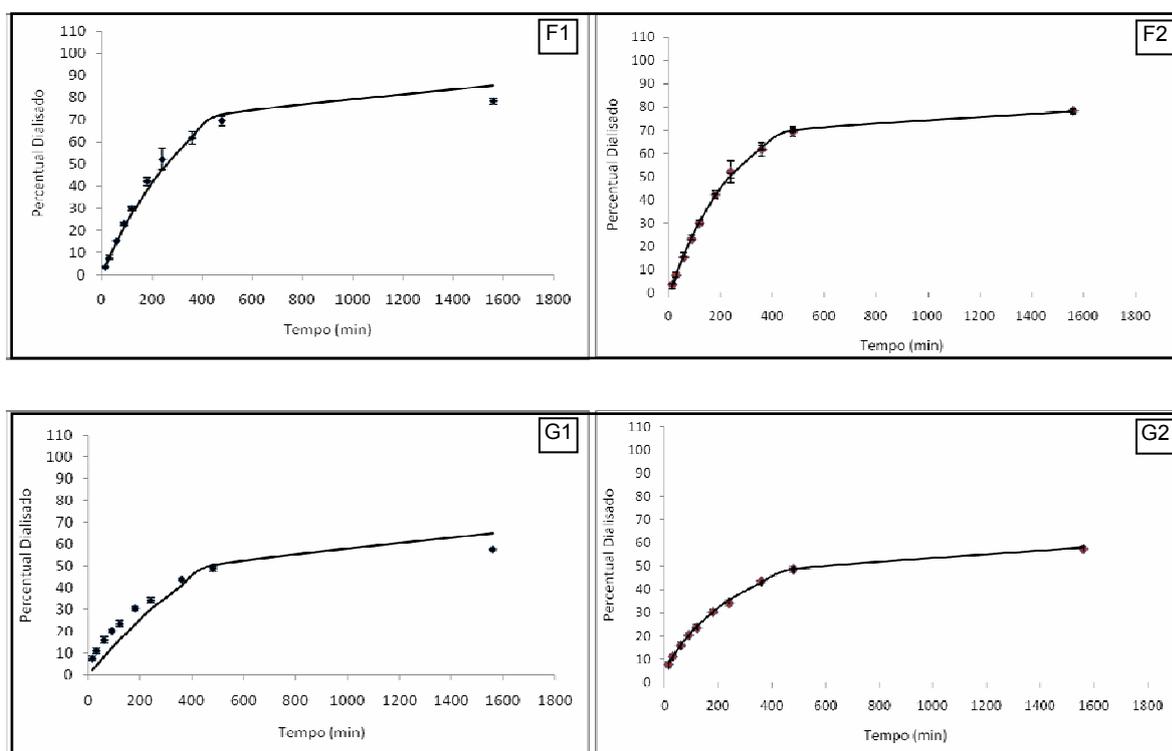


Figura 13. Perfis de liberação das formulações F = NCM e G = GNM, onde 1 é a equação monoexponencial e 2 a equação biexponencial.

Comparando-se os valores de MSC, coeficiente de correlação e melhor ajuste gráfico, conclui-se que, exceto a formulação de melatonina solubilizada em solução de 10 % de etanol, todas as formulações foram melhor descritas pela equação biexponencial, ou seja, apresentaram um perfil de liberação composto de duas fases. Uma fase rápida inicial (*burst*), na qual dialisam através do saco de celulose a quantidade de fármaco que se apresentava mais externamente nas nanocápsulas, provavelmente adsorvidas nas paredes poliméricas, seguida de uma fase sustentada mais lenta, na qual dialisam as moléculas de fármaco que estão mais internas nas nanopartículas.

Comparando-se os resultados obtidos na equação biexponencial para as diferentes formulações, observa-se que, quanto mais complexo o sistema, mais curto e rápido é o *burst* inicial e, conseqüentemente, maior é a fase lenta. Por exemplo, comparando as formulações de suspensões de nanocápsulas (SN) e o gel contendo suspensão de nanocápsulas (GS), tem-se uma diminuição no valor de A, de 0,883 para 0,271, e um aumento do valor de B de 0,146 para 0,724, ou seja, enquanto a melatonina presente na suspensão de nanocápsulas dialisava aproximadamente 88 % na fase rápida e 15 % na fase lenta, com a incorporação dessa suspensão em um hidrogel, a fase rápida passou a corresponder a 27 % da diálise e a fase lenta a 72 %. Esse fenômeno pode ser observado comparando-se os gráficos de ambas as formulações na figura 11. O gráfico B no qual está representada a liberação da melatonina a partir de SN, mostra um rápido *burst* inicial, em 360 min de análise aproximadamente 90 % da melatonina presente no sistema já havia passado através da membrana de celulose, enquanto o gráfico C onde podemos observar o perfil da liberação a partir de GSN, mais lento e controlado. Comparando-se todas as formulações que estão na forma de géis, observa-se esse fenômeno de diminuição da fase rápida e conseqüente aumento da fase lenta, havendo um controle melhor da liberação do fármaco quando em hidrogel.

Com a formação dos pós de nanocápsulas conseguiu-se ainda, além de uma diminuição de A e aumento de B, uma diminuição pela metade na constante de velocidade β , ou seja, a melatonina presente nas formulações NCL, NCM e nos seus

respectivos géis permeou mais lentamente durante a fase lenta. Então esses sistemas contendo os pós de nanocápsulas secas por aspersão foram mais eficientes no controle da liberação do fármaco comparando-se com o fármaco presente na suspensão de nanocápsulas antes de ser nebulizada.

Utilizando-se os valores de k obtido das equações monoexponencial, obteve-se os valores de meia vida das formulações. Esses valores estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de $t_{1/2}$ obtidos da equação monoexponencial para todas as formulações:

Formulações	$t_{1/2 k}(h)$
F	0,89
GF	3,20
SN	1,96
GS	4,28
NCL	3,85
GNL	6,79
NCM	4,28
GNM	7,70

Comparando-se os tempos de meia vida de todas as formulações utilizando a equação monoexponencial, observa-se que as formulações de géis contendo as nanocápsulas secas por aspersão foram as que apresentaram os maiores $t_{1/2}$, 6,79 e 7,70, para as formulações secas com lactose e maltodextrina, respectivamente.

5.6. Avaliação da permeação cutânea

Na avaliação da permeação cutânea da melatonina através de pele de suíno, mediu-se o total de fármaco extravasado para o meio receptor. Neste estudo não foi possível avaliar a quantidade de fármaco em cada camada da pele, pois a pele produz melatonina endogenamente (SLOMINSKI *et al.*, 2007), não sendo possível realizar um estudo de especificidade. Além disso, observamos que cada amostra de pele apresentava uma quantidade de melatonina diferente, não podendo ser feito um controle (branco) para eliminar esta interferência para cada caso.

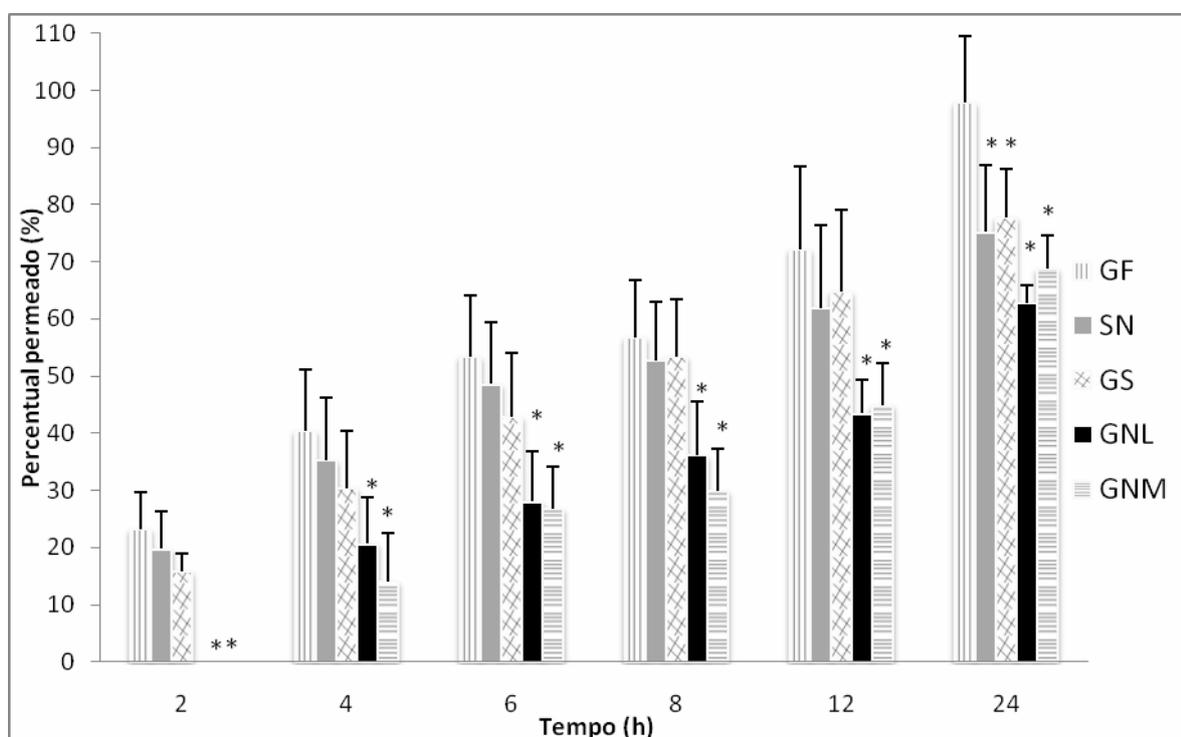


Figura 14. Melatonina permeada para o meio receptor por tempo. * Amostras significativamente distintas ($p < 0,05$) da amostra de gel contendo melatonina livre, segundo o teste de Tukey.

Na Figura 14 encontra-se o gráfico da concentração de melatonina permeada (em percentual) a partir das diferentes formulações, através da pele de suíno, por tempo, utilizando célula de Franz. A formulação GF obteve um perfil de permeação mais rápido em comparação com as outras formulações, em 2 h de experimento já havia permeado aproximadamente 25 % do total de fármaco presente no compartimento doador. Esse percentual foi se mantendo durante todo o experimento

e em 24 h todo o fármaco presente no sistema havia permeado pela pele de suíno chegando ao compartimento receptor.

A melatonina presente na suspensão de nanocápsulas (SN) e GS permeou mais lentamente pela pele de suíno, porém nas primeiras 12 h de experimento não foi significativamente diferente da formulação GF. Houve uma diferença significativa somente no último ponto de coleta, onde a permeação da melatonina foi menor do que a partir do gel livre.

As formulações de GNL e GNM apresentaram perfis mais lento de permeação através da pele de suíno, sendo que nas primeiras 2 h nenhuma quantidade de melatonina foi observada no compartimento receptor para ambas as formulações. Essas formulações apresentaram um perfil significativamente menor que o das outras formulações testadas, porém não se mostraram distintas entre si.

Os géis contendo os pós de nanocápsulas secos por aspersão (GNL e GNM), apesar das diferenças de tamanho de partícula, redispersão em água e morfológicas, não mostraram diferença significativa na permeação pela pele de suíno.

Além da aplicação tópica proposta inicialmente por esse trabalho, após a observação desses resultados de permeação, podemos vislumbrar uma aplicação transdérmica para esses sistemas obtidos. Obtendo-se sistemas que controlam e sustentam a liberação da melatonina pela pele.

- Nanocápsulas em suspensão contendo melatonina foram obtidas através de deposição interfacial de polímero pré-formado e apresentaram os parâmetros de acordo com o método e matérias-primas utilizadas.
- Foram obtidos, com sucesso, pós de nanocápsulas (NCL e NCM) através do método de *spray-drying* utilizando-se os adjuvantes hidrossolúveis, lactose e maltodextrina. A operação de secagem com lactose apresentou um rendimento de $54,7 \pm 4,3$ % e teor de umidade de $1,11 \pm 0,15$ %. Por sua vez, empregando a maltodextrina, o rendimento foi de $49,2 \pm 6,4$ % e teor de umidade de $1,74 \pm 0,29$ %. Os rendimentos estão de acordo com o método de secagem por aspersão e a umidade abaixo de 2 % significando que a secagem foi eficiente.
- A formulação NCL apresentou um diâmetro médio de 28,95 μm , valor levemente superior ao do excipiente seco por aspersão (26,23 μm), porém apresentou um Span menor (3,97 e 6,87, para NCL e lactose, respectivamente). Essas micropartículas apresentaram um perfil de ressolubilização rápida em água, obtendo-se em 15 minutos, aproximadamente, partículas com diâmetro médio similar ao das nanocápsulas em suspensão antes da secagem (em torno de 260 nm).
- As nanopartículas secas utilizando maltodextrina como adjuvante de secagem (NCM) formaram grandes aglomerados de 233,57 μm , e Span superior (3,76) ao da maltodextrina seca por aspersão (diâmetro de 6,13 μm e Span de 1,11). Essas partículas quando são ressuspensas em água apresentam um comportamento diferente das NCL, pois formam dois grupos de populações de partículas, um nano- e outro micrométrico, que se mantém durante todo o tempo do experimento no Mastersizer 2000[®] (1 h).
- As fotomicrografias mostraram diferenças morfológica das micropartículas e seus adjuvantes secos por aspersão. Nas fotomicrografias das NCL observa-

se um grupo homogêneo de micropartículas já nas fotomicrografias de NCM, pode-se observar uma variada população de partículas (corroborando com o valor de Span mais alto calculado pelo Mastersizer 2000[®] para as partículas NCM).

- Nas fotomicrografias obtidas a 40000 X foi possível a observação de nanocápsulas presentes nas paredes das partículas formadas com ambos adjuvantes.
- Foram obtidos satisfatoriamente hidrogéis contendo nanocápsulas partindo das nanocápsulas de melatonina em suspensão e dos pós de nanocápsulas. O pH desses géis foi levemente ácido para o gel fabricado com a suspensão de nanocápsulas ($5,80 \pm 0,04$), e próximo da neutralidade para o gel contendo NCL ($7,11 \pm 0,02$) e para o gel contendo NCM ($7,10 \pm 0,01$).
- As análises obtidas por retroespalhamento de luz dinâmico no Turbiscan Lab[®] demonstraram que as suspensões de nanocápsulas contendo melatonina sofrem cremagem com o tempo, ou seja, as nanopartículas tendem a se aglomerar no topo da cubeta. Contudo, esse fenômeno é comum nessa forma farmacêutica e é reversível mediante agitação. Esse fenômeno não foi observado no gel contendo a suspensão de nanocápsulas, devido à estrutura mais rígida do hidrogel.
- Os resultados do Turbiscan Lab[®] para as amostras de hidrogel contendo os pós redispersos de NCM mostraram que há tendência de diminuição do tamanho de partícula com o tempo no centro da cubeta. Esse fenômeno provavelmente se dá pela lenta ressolubilização desses pós no hidrogel.
- Os resultados obtidos para o gel contendo NCL mostrou que esse sistema é o mais estável fisicamente em relação aos demais. Após 20 h de experimento não houve mudança no *backscattering*.

- Analisando-se em conjunto todos os gráficos de Turbiscan Lab[®], pode-se interpretar que todas as formulações são estáveis, pois todas as variações de *backscattering* observadas foram pouco intensas e pertinentes ao tipo de formulações analisadas, suspensões e géis.
- Nos estudos de liberação *in vitro* obteve-se um perfil de liberação da melatonina em solução com 10 % de etanol descrito através de uma equação monoexponencial. As outras amostras apresentaram um perfil que foi melhor descrito pela equação biexponencial.
- Comparando-se as formulações em hidrogel com as demais formulações observa-se que o hidrogel diminui a velocidade de difusão do fármaco pelo saco de diálise.
- As formulações de NCL e NCM apresentaram um perfil de liberação mais lento que as demais formulações, demonstrando serem capazes de controlar a liberação da melatonina.
- Nos experimentos de permeação cutânea utilizando células de Franz toda a melatonina presente do gel contendo fármaco livre (GF) atravessou a pele nas 24 h de experimento.
- As formulações suspensão de melatonina (SN) e gel contendo a suspensão de melatonina (GS) apresentaram um perfil de permeação que não foi significativamente diferente do perfil do gel do fármaco livre (GF) nas primeiras 12 h de experimento.
- Os pós NCL e NCM dispersos em hidrogel apresentaram um perfil de permeação significativamente diferentes das outras formulações, porém não foram distintos entre si, durante todo o experimento de permeação.
- Considerando-se todos os resultados conjuntamente, pode-se concluir que a secagem das suspensões aquosas da nanocápsulas de melatonina mediante

o uso de adjuvantes hidrossolúveis (lactose e maltodextrina) empregando-se a técnica de *spray-drying* é viável. As nanocápsulas em pó, mostram que o uso de lactose fornece um produto com melhor redispersibilidade e menor tamanho médio de partículas, adequado para a aplicação cutânea. Os pós NCL e NCM apresentaram capacidade de controlar a liberação da melatonina e de controlar sua permeação cutânea.

- Pode-se vislumbrar uma aplicação transdérmica para esses sistemas de nanocápsulas secos por aspersão utilizando lactose ou maltodextrina e posteriormente dispersos em hidrogéis, observando-se o perfil de liberação controlado e sustentado obtido nos estudos de permeação, além da grande quantidade de melatonina permeada durante o experimento.

7. Referências

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

ALVES, M.P. Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. UFRGS, 2006.

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**. 341, p. 215-220, 2007.

ANDREASSI, M., ANDREASSI, L. Antioxidants in dermocosmetology: from the laboratory to clinical application. **Journal of Cosmetic Dermatology**. 2, p. 153-160, 2004.

ANGELI, V. W. Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. UFRGS 2007.

BABU, R. J., KANIKKANNAN, N., KIKWAI, L., ORTEGA, S., ANDEGA, S., BALL, K., YIM, S., SINGH, M. The influence of various methods of cold storage of skin on the permeation of melatonin and nimesulide. **Journal of Controlled Release**. 86, p. 49-57, 2003.

BAUMANN, L. S. **Cosmetic Dermatology: Principles e Practice**. McGraw-Hill, 2002, 246 p.

BECK, R. C. R., POHLMANN, A. R., HOFFMEISTER, C., GALLAS, M. R., COLLNOT, E., SCHAEFER, U. F., GUTERRES, S. S., LEHR, C. M. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: Correlation between *in vitro* drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 67, p. 18-30, 2007.

BEYER, C. E., STEKETEE, J. D., SAPHIER, D. Antioxidant properties of melatonin – an emerging mystery. **Biochemical Pharmacology**. 56, p. 1265-1272, 1998.

BURON, H., MENGUAL, O., MEUNIER, G., CAYRÉ, I., SNABRE, P. Optical characterization of concentrated dispersions: applications to laboratory analyses and on-line process monitoring and control. **Polymer International**. 53, p.1205-1209, 2004.

CARRILLO-VICO, A., CALVO, J. R., ABREU, P., LARDONE, P. J., GARCIA-MAURINO, S., REITER, R. J., GUERREIRO, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **The FASEB Journal**. 18, p.537-539, 2004.

COUVREUR, P., BARRAT, G., FATTAL, E., LEGRAND, P., VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Criticals Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. 19, p. 99-134, 2002.

DOLLO, G., CORRE, P. L., GUÉRIN, A., CHEVANNE, F., BURGOTB, J. L., LEVERGE, R. Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 19, p. 273-280, 2003.

DREHER, F., GABARD, B., SCHWINDT, D. A., MAIBACH, H. I. Topical melatonin in combination with vitamins E and C protects skin from ultraviolet-induced erythema: A human study *in vivo*. **British Journal of Dermatology**. 139, p. 332-339, 1998.

DUBEY, V., MISHRA, D., ASTHANA, A., JAIN, N. J. Transdermal delivery of a pineal hormone: Melatonin via elastic liposomes. **Biomaterials**. 27, p. 3491-3496, 2006.

DUBEY, V., MISHRA, D., JAIN, N. J. Melatonin loaded ethanolic liposomes: Physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 607, p. 398-405, 2007,

FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.-PH., AMMOURY, N., BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**. 55, p. r1-r4, 1989.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data. **The Journal of Investigative Dermatology**. 64, p. 190-195, 1975.

GONÇALVES, M. C. F. Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação biológica de quitossomas para liberação cutânea da melatonina. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS 2008.

GONISSEN, Y., REMON, J. P.,VERVAET, C. Effect of maltodextrin and superdisintegrant in directly compressible powder mixtures prepared via co-spray drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 86, p. 277-282, 2008.

GUTERRES, S. S., ALVES, M. P., POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**. 2, p. 147-157, 2007.

HARDGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**. 224, p. 1-18, 2001.

KOGAN, A., GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science**. 123-126, p. 369-385, 2006.

KOHEN, R., ORON, M., ZELKOWICZ, A., KANEVSKY, E., FARFOUR, S., WORMSER, U. Low molecular weight antioxidants released from the skin's epidermal layers: an age dependent phenomenon in the rat. **Experimental Gerontology**. 39, p. 67-72, 2004.

LANGRISCH, T. G. A., CHAN, W. C., KOTA, K. Comparison of maltodextrin and skim milk wall deposition rates in a pilot-scale spray dryer. **Powder Technology**. 179, p. 84-89, 2007.

LÓPEZ, B. D., URQUIJO, M. D. C., FERNÁNDEZ, B. M. Capacidad antioxidante de la melatonina: su papel defensivo contra afecciones relacionadas com la edad. **Medicina Clínica**. 110, p. 668-676, 1998.

MACCHI, M. M., BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in neuroendocrinology**. 25, p. 177-195, 2004.

MAGENHEIM, B., BENITA, S.. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Science**. 1, p. 221–241, 1991.

MARTI-MESTRES, G., MESTRES, J. P., BRES, J., MARTIN, S., RAMOS, J., VIAN, L. The “in vitro” percutaneous penetration of three antioxidant compounds. **International Journal of Pharmaceutics**. 331, p. 139–144, 2007.

MÜLLER, C. R., BASSANI, V. L., POHLMANN, A. R., MICHALOWSKI, C. B., PETROVICK, P. R., GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocápsulas. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. 26, p. 343–347, 2000.

MÜLLER, C. R. Produtos secos por aspersão a partir de suspensões de nanocápsulas contendo diclofenaco: caracterização físico-química e avaliação da viabilidade tecnológica de preparação de formas sólidas derivadas. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS 2003.

OECD, Guidance document for the conduct of skin absorption studies, OECD environmental health and safety publications series on testing and assessment no. 28, 2004.

PAESE, K. Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semissólidos. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS 2008.

PATEL, K.C., CHEN, X. D. Drying of aqueous lactose solutions in a single stream dryer. **Food and Bioproducts Processing**. 86, p. 185-197, 2008.

REIS, C. P., NEUFELD, R. J., RIBEIRO, A. J., VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. 2, p. 8-21, 2006.

REITER, R. J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Progress in Neurobiology**, 56, p. 359-384, 1998.

REITER, R., J, TAN, D., BURKHARDT, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. **Mechanisms of Ageing and Development**. 123, p. 1007-1019, 2002.

REITER, R. J. Melatonin: clinical relevance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**. 17, p. 273-285, 2003.

SAIJA, A., TOMAINO, A., TROMBETTA, D., PELLEGRINO, M. A., TITÃ, B., CARUSO, S., CASTELLI, F. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 53, p. 209-215, 2002.

SANCHEZ-HIDALGO, M.,LASTRA, C. A., CARRASCOSA-SALMORAL, M. P., NARANJO, M. C.,GOMEZ-CORVERA, A., CABALLERO, B., GUERREIRO, J. M. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. **Experimental Gerontology**. 44, p. 328-344, 2009.

SCHÄFER-KORTING, M., MEHNERT, W., KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2007 59, p. 427-443, 2007.

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**. 289, p. 209-213, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., MEZZALIRA, G., GUTERRES, S. S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders

containing melatonin. **Journal of Brazilian Chemical Society**. 7, No. 3, p. 562-569, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. Nanocapsules, nanoemulsion e nanodispersion containing melatonin: Preparation, characterization and stability evaluation. **Pharmazie**. 62, p.354-360, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R., SIQUEIRA, I. R., BADEJO, A. S., JORNADA, D. S., POHLMANN, A. R., NETTO, C. A., GUTERRES, S. S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 69, p.64-71, 2008.

SHAM, J. O. H., ZHANG, Y., FINLAY, W. H., ROA, W. H., LÖBENBERG, R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. **International Journal of Pharmaceutics**. 269, p. 457-467, 2004.

SHIM, J., KANG, H. S., PARK, W., HAN, S., KIM, J., CHANG, I. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. 97, p. 477-484, 2004.

SIQUEIRA, N. M. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2008.

SLOMINSKI, A., TOBIN, D. J., ZMIJEWSKI, M. A., WORTSMAN, J. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**. 19, p. 17-24, 2007.

TAN, D., MANCHESTER, L. C., TERRON, M. P., FLORES, L. J., REITER, R. J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal of Pineal Research**. 42, p. 28-42, 2007.

TEWA-TAGNE, P., BRIAÇON, S., FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 30, p. 124-135, 2007.

TOMODA, K., OHKOSHI, T., KAWAI, Y., NISHIWAKI, M., NAKAJIMA, T., MAKINO, K. Preparation and properties of inhalable nanocomposite particles: Effects of the temperature at a spray-dryer inlet upon the properties of particles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 61, p. 138-144, 2008.

TURSILLI, R., CASOLARI, A., IANNUCELLI, V., SCALIA, S. Enhancement of melatonin photostability by encapsulation in lipospheres. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 40, p. 910-914, 2006.

VEHRING, R., FOSS, W.R., LECHUGA-BALLESTEROS, D. Particle formation in spray drying. **Aerosol Science**. 38, p. 728-746, 2007.

VIJAYALAXMI, REITER, R. J., TAN, D., HERMAN, T. S., THOMAS, C. R. Melatonin as radioprotective agent: a review. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**. 59, n 3, p. 639-653, 2004.

WANG, H., WEI, W., ZHANG, S., SHEN, Y., YUE, L., WANG, N., XU, S. Metalonin-selenium nanoparticles inhibit oxidative stress and protect against hepatic injury induced by Bacillus Calmette-Guérin/ lipopolysaccharide in mice. **Journal of Pineal Research**. 39, p. 156-163, 2005.