

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO
DOUTORADO ASSOCIADO EM QUÍMICA UEL/UEPG/UNICENTRO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DEQ

REBECA CAPARICA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
ALBUMINA CONTENDO MELATONINA

Guarapuava

2019

REBECA CAPARICA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
ALBUMINA CONTENDO MELATON

Tese apresentada ao Programa de Doutorado
Associado em Química Uel/Uepg/Unicentro,
Departamento de Química para obtenção do
Título de Doutora em Química.

Área de concentração: Química Orgânica
Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Co-Orientadora: Profa. Dra. Rubiana Mara
Mainardes

Guarapuava

2019

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

C236d Caparica, Rebeca
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de albumina contendo melatonina / Rebeca Caparica. -- Guarapuava, 2019.
xiv, 98 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, em ampla associação com UEL e UEPG, Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica, 2019.

Orientador: Najeh Maissar Khalil
Coorientadora: Rubiana Mara Mainardes
Banca examinadora: Maria Lurdes Felsner, Paulo Rogério Pinto Rodrigues, Elisvânia Freitas dos Santos, Luiz Fernando Cótica, Najeh Maissar Khalil

Bibliografia

1. Química. 2. Liberação controlada. 3. Fármaco nanoencapsulado. 4. Antioxidante. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

| CDD 540

REBECA CAPARICA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
ALBUMINA CONTENDO MELATONINA**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 29 de abril de 2019



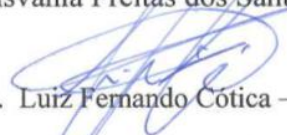
Prof.ª. Dr.ª. Maria Lurdes Felsner – Unicentro



Prof. Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues - Unicentro



Prof.ª. Dr.ª. Elisvânia Freitas dos Santos – UFMS



Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica – UEM



Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil - Orientador

GUARAPUAVA-PR

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Pai e minha Mãe, como também a minha filha Beatriz e meus netos João Lucas e Pedro Henrique, que sempre foram minha ilha segura e a razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof Dr Najeh Maissar Khalil e a Prof^a Dr^a Rubiana Mara Mainardes, pela competência e respeito e paciência com que conduziram este trabalho, bem como a Prof^a Dr^a Soraia Zaioncz pelas valiosas contribuições no decorrer de todo o processo. Aos meus colegas do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica que sempre foram muito prestativos em todos os momentos, especialmente a dois em particular que tiraram seu tempo e sem sua ajuda isto provavelmente não seria possível, meu muito obrigada à Rossana Vásquez Marcano e Eduardo Hösel Miranda.

RESUMO

A nanotecnologia está envolvida com a manipulação de átomos e moléculas, e tem como conceito a criação de novos nanomateriais e ou dispositivos. Dentro da indústria farmacêutica, seu uso para aplicação farmacológica, tem crescido, visando a contornar os problemas farmacodinâmicos e farmacocinéticos, tais como, baixa eficácia ou falta de seletividade, bem como a toxicidade intrínseca de vários compostos. A albumina é uma proteína abundante no sistema orgânico, representando cerca de 50% do total de proteínas circundante. Sua habilidade de carrear moléculas insolúveis dá à ela uma propriedade de, ligar-se a diferentes moléculas e íons. As nanopartículas à base de albumina mostram-se como uma opção, uma vez que um número significativo de fármacos podem ser incorporados em sua matriz. A melatonina (MEL) um hormônio secretado pela glândula pineal dos mamíferos, tem mostrado em pesquisas recentes ser mais eficaz do que outros antioxidantes conhecidos é um excelente captador de radicais livres, o maior impasse de sua utilização e sua rápida metabolização orgânica. O objetivo deste trabalho foi desenvolver NPs de BSA contendo MEL, bem como, determinar suas características morfológicas, físico-químicas e avaliar o perfil sobre células normais.

O diâmetro médio obtidos nas nanopartículas de albumina contendo melatonina foi de 205nm ($\pm 2,2$ nm) e media do índice de polidispersão média de 0,085 ($\pm 0,02$), a eficiência média de encapsulação foi de 70,5% ($\pm 3,5\%$). Todas as nanopartículas mantiveram-se estáveis até um período de 60 dias, tanto, em temperatura ambiente como refrigerada. Possuem forma esférica e superfície lisa e nas suas características físico-químicas temos um perfil amorfo, características desejáveis para um eficiente sistema nanoestruturado, carreador de fármaco. Nos ensaios citotóxicos a MEL não altera o crescimento das células Vero, como também, não provoca a hemólise das hemácias. Considerando a baixa toxicidade deste sistema, este pode ser utilizado como uma plataforma para aplicações orais e escalonadas.

PALAVRAS-CHAVE: Liberação controlada, fármaco nanoencapsulado, antioxidante.

ABSTRACT

Nanotechnology is involved in the manipulation of atoms and molecules, and its concept is the creation of new nanomaterials and devices. Within the pharmaceutical industry, its use for pharmacological application has grown in order to circumvent pharmacodynamic and pharmacokinetic problems such as low efficacy or lack of selectivity as well as the intrinsic toxicity of various compounds. Albumin is a protein abundant in the organic system, accounting for about 50% of the total surrounding protein. Its ability to carry insoluble molecules gives it a property of, binding itself to different molecules and ions. Albumin-based nanoparticles are shown as an option, since a significant number of drugs can be incorporated into their matrix. Melatonin (MEL), a hormone secreted by the mammalian pineal gland, has been shown in recent research to be more effective than other known antioxidants. It is an excellent free radical scavenger, the greatest impasse in its use and its rapid organic metabolism. The objective of this work was to develop BSA NPs containing MEL, as well as to determine their morphological, physical-chemical characteristics and to evaluate the profile on normal cells.

The average diameter of melatonin-containing albumin nanoparticles was 205nm (± 2.2 nm) and mean polydispersity index mean was 0.085 (± 0.02), mean encapsulation efficiency was 70.5% ($\pm 3, 5\%$). All nanoparticles remained stable for up to 60 days, both at room temperature and refrigerated. They have spherical shape and smooth surface and in their physical-chemical characteristics we have an amorphous profile, desirable characteristics for an efficient nanostructured, drug carrier system. In cytotoxic assays MEL does not alter the growth of Vero cells, nor does it cause hemolysis of the red blood cells. Considering the low toxicity of this system, it can be used as a platform for oral and staggered applications.

KEYWORDS: Controlled release, nanoencapsulated drug, antioxidant.

SUMÁRIO

| Cap. | Descrição | Pág. |
|-------------|--|-------------|
| 1 | Introdução | 01 |
| 1.1 | Revisão da Literatura | 03 |
| 1.2 | Nanociência e Nanomateriais | 04 |
| 1.3 | Nanopartículas Poliméricas | 07 |
| 1.4 | Liberção Controlada | 10 |
| 1.5 | Albumina | 12 |
| 1.6 | Melatonina | 17 |
| 2 | Objetivos | 25 |
| 3 | Objetivos Específicos | 26 |
| 4 | Materiais | 28 |
| 4.1 | Substâncias e reagentes | 29 |
| 4.2 | Equipamentos | 30 |
| 5 | Métodos | 31 |
| 5.1 | Preparação das Nanopartículas de Albumina de Soro Bovino | 31 |

| | | |
|---------------------------------|--|-----------|
| (BSA) Contendo Melatonina (MEL) | | |
| 5.1.1 | Preparação das Nanopartículas de BSA Contendo MEL | 35 |
| 5.1.2 | Determinação do Diâmetro Médio e Índice de Polidispersão | 36 |
| 5.1.3 | Potencial Zeta | 36 |
| 5.1.4 | Determinação da Eficiência de Encapsulação | 37 |
| 5.1.5 | Ensaio De Fluorescência | 38 |
| 5.2. | Análise em Microscopia Eletrônica | 38 |
| 5.3 | Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) | 39 |
| 5.4 | Análise de Difração De Raios X | 39 |
| 5.5 | Análise Térmica (TG/DSC) | 40 |
| 5.6 | Ensaio de Liberação Controlada | 41 |
| 5.7 | Ensaio de Citotoxicidade sobre Linhagem de Células Vero | 41 |
| 5.8 | Ensaio sobre Células Vermelhas (Hemácias) | 42 |
| 5.9 | Análise Estatística | 43 |
| 6 | Resultados | 44 |
| 6.1 | Preparação das Nanopartículas de BSA | 45 |
| 6.1.1 | Determinação Eficiência de Encapsulação (%EE) | 47 |
| 6.1.2 | Estabilidade dos Sistemas Nanoestruturados | 48 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 6.1.3 | Índice de Polidispersão (Ip) | 50 |
| 6.1.4 | Potencial Zeta (ξ) | 52 |
| 6.1.5 | Ensaio De Fluorescência | 54 |
| 6.2 | Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV) | 56 |
| 6.3 | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) | 59 |
| 6.4 | Difração de Raios X (DRX) | 63 |
| 6.5 | Análise Térmica (TG/DSC) | 65 |
| 6.6 | Análise Térmica Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) | 68 |
| 6.7 | Ensaio de Liberação | 70 |
| 6.8 | Ensaio Citotóxicos com Células Vero | 73 |
| 6.9 | Ensaio com Células Vermelhas | 77 |
| 7 | Discussão | 79 |
| 8 | Conclusão | 84 |
| 9 | Bibliografia | 86 |

LISTA DE FIGURAS

| Nº | DESCRIÇÃO | PÁG. |
|-----------|--|-------------|
| 01 | Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas: | 7 |
| 02 | Representação esquemática de nanoesferas poliméricas | 8 |
| 03 | Gráfico explicativo sobre a liberação controlada das nanopartículas. | 10 |
| 04 | Estrutura da MEL. | 17 |
| 05 | Fluxograma da preparação das nanopartículas de BSA contendo MEL. | 32 |
| 06 | Representação da preparação das nanopartículas. | 33 |
| 07 | Preparação das nanopartículas. | 34 |
| 08 | Determinação do diâmetro médio (nm) das amostras de BSA contendo MEL em relação aos dias de incubação. | 49 |
| 09 | Determinação da polidispersão em relação aos dias de incubação. | 50 |
| 10 | Determinação dos valores de Zeta. | 53 |
| 11 | Ensaio de fluorescência da MEL. | 55 |
| 12 | Microscopia Eletrônica de Varredura com medidas. | 57 |
| 13 | Microscopia Eletrônica de Varredura com uma visão geral. | 58 |
| 14 | Sobreposição FTIR. | 62 |
| 15 | Sobreposição DRX. | 64 |
| 16 | Curva de TG e DTG da MEL livre. | 65 |
| 17 | Curva de TG e DTG da NP de BSA vazia. | 66 |
| 18 | Curva de TG e DTG da NP contendo MEL. | 67 |
| 19 | Curva de DSC para a NP vazia, NP contendo MEL e MEL livre. | 69 |
| 20 | Ensaio de liberação, (FGS) e (FIS). | 72 |
| 21 | Ensaio com células Vero com 24h de incubação. | 74 |
| 22 | Ensaio com células Vero com 48h de incubação. | 75 |
| 23 | Ensaio com células Vero com 72h de incubação. | 76 |
| 24 | Ensaio com células vermelhas. | 78 |

LISTA DE TABELAS

| Nº | DESCRIÇÃO | PÁG. |
|-----------|--|-------------|
| 01 | Principais publicações sobre a utilização da albumina como polímero para obtenção de nanopartículas | 15 |
| 02 | Levantamento das Principais Publicações sobre a utilização da Melatonina nos últimos anos. | 21 |
| 03 | Fase móvel utilizada para a determinação da MEL. | 35 |
| 04 | Determinação do tamanho e a polidispersão das NPs de BSA sem MEL, por diferentes concentrações de glutaraldeído. | 46 |
| 05 | Espectros de FTIR da MEL livre. | 59 |
| 06 | Espectros de FTIR da NPS de BSA vazias. | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|---|
| MEL | Melatonina |
| BSA | Albumina de Soro Bovino |
| NPs | Nanopartículas |
| HSA | Albumina de Soro Humano |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DA | Doença de Alzheimer |
| NO | Óxido Nítrico |
| HPLC | Cromatografia Líquida e Alta Eficiência |
| GA | Glutaraldeído |
| IP | Índice de Polidispersão |
| ξ | Potencial Zeta |
| GPCRs | Proteína G |
| MT1 e 2 | Receptores de Melatonina |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| FTIR | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier |
| DRX | Difração e Raios X |
| TG/ DTG | Termogravimétrica/ Termogravimétrica Derivada |
| DSC | Calorimetria Exploratória Diferencial |

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A liberação controlada e contínua de fármacos em locais de ação específicos, através do emprego de sistemas biocompatíveis de liberação, que são capazes de controlar a otimização de entrega e a velocidade da liberação das substâncias, tem sido uma das áreas de pesquisa que mais tem avançado nos últimos vinte anos. Entre os sistemas utilizados, compreendem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas) (ZAIIONCZ,2016). As nanopartículas, compostas principalmente por polímeros biodegradáveis, têm sido a principal ferramenta para o carreamento de fármacos, devido à seu potencial terapêutico, a sua estabilidade em relação aos fluídos biológicos e no armazenamento (SOPPIMATH et al., 2001; BENOIT et al., 1986). Existem vários modelos descritos na literatura para o preparo de nanopartículas poliméricas, podendo ser classificadas, de uma forma geral, como: na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (sistemas coloidais) ou na precipitação de polímeros pré-formados (BECK et al., 2011; SANTOS- MARTINEZ et al., 2007).

Devido as características imunomoduladoras e sobre radicais livres da melatonina (MEL), este hormônio tem sido amplamente estudado especialmente por sua propriedade antioxidante (BEYER et al., 1998; TAN, 2007; SAIJA et al., 2002). No entanto, a sua fotoestabilidade é seu maior limitante em relação a seu uso como fármaco eficaz (TURSILLI et al., 2006). Para tornar a melatonina mais estável e com melhores propriedades farmacocinéticas, vários sistemas têm sido propostos, como liposferas (TURSILLI et al., 2006), lipossomas elásticas, etossomas (DUBEY et al., 2008), quitossomas (lipossomas revestidos de quitosana) (GONÇALVES, 2008) e nanocápsulas.

A albumina de soro bovino (BSA) oferece características importantes, como hidrossolubilidade, baixa imunogenicidade e atoxicidade (KRATZ, 2008), como também, por ser uma proteína bastante robusta, podendo ser aquecida até 60°C por 10 horas sem expor lesões em sua estrutura ou função, e ainda, possui uma

constância em uma ampla variação de pH (entre 4-9), faz com que ela seja uma ótima candidata para o carreamento de compostos (ELZOGHBY,2012).

Neste estudo, na veiculação da melatonina em nanopartículas de BSA, tem como objetivo um melhor aproveitamento deste hormônio aumentando seu potencial como fármaco, como também a possibilidade de sua utilização como um coadjuvante com outros fármacos, com isso reduzindo possíveis danos celulares.

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.2 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

Em 1959, em uma palestra no Instituto de Tecnologia da Califórnia, o pesquisador Richard Feynman, aludiu que “*os átomos poderiam ser dispostos, conforme a necessidade, desde que não houvesse violações das leis naturais*”. Com isso, novos materiais com características completamente novas poderiam ser criados. Essa palestra foi considerada como o marco inicial da nanotecnologia (FEYNMAN, 1960).

Ele propôs a fabricação de materiais derivados de rearranjos entre átomos e moléculas, apoiado pela lei da mecânica quântica (FREIRE JR, 2011).

O termo “nanotecnologia” foi cunhado por Norio Taniguchi, em 1957, e compreendia em seu significado “máquinas com tamanho inferiores a 1 micron” (EPA, 2017).

Os materiais em escala macroscópicas e micrométricas possuem determinadas propriedades físicas bem características, mas quando estes mesmos materiais assumem dimensão na escala nanométrica, os princípios da física clássica não são mais capazes de descrever seu comportamento (movimento, energia, etc.). Nestas dimensões, são os princípios da mecânica quântica que são aplicados. Na escala nanométrica podemos ter propriedades (por exemplo, ópticas, mecânicas, elétricas, etc.) que são totalmente diferentes das propriedades que o material tem na escala macro (FILIPPONI e SUTHERLAND, 2010).

A definição mais comum da nanociência é: “a Nanociência é o estudo de fenômenos e a manipulação de materiais em escala atômica, molecular e macromolecular, em que as propriedades diferem significativamente daquelas em maior escala” (BRASIL, 2004).

Está área têm progredido a um ritmo acelerado nos últimos anos, tanto em

laboratórios de pesquisa como na comercialização de numerosos novos produtos, incluindo o conhecimento das ciências dos materiais e da saúde, no desenvolvimento de sistemas nanoparticulados, nanofilmes, nanoemulsões e nanoestruturas, para encapsulação de compostos ativos (FARIA -TISCHER, 2012).

A nanotecnologia está envolvida com a manipulação de átomos e moléculas, e tem como conceito a criação de novos nanomateriais e ou dispositivos. Todos os setores industriais dependem de materiais e dispositivos feitos de átomos e moléculas, assim, em princípio, todos os materiais podem ser melhorados quando em escala nanométrica (CHATTOPADHYAY, 2009).

Esta tecnologia está sendo utilizada nas mais diversas aplicações. Na indústria têxtil com o revestimento de nanofilmes antibacterianos, na eletrônica com o desenvolvimento de nanocomponentes como os estudos realizados pela IBM (International Business Machines) e a Intel (Intel Corporation) no desenvolvimento de nanofios de grafeno, que no futuro poderiam substituir os de silício (DEKKER, 1999), os estudos de materiais fotoluminescentes por não utilizarem substâncias como metais pesados. Estes nanomateriais a base de carbono tais como, óxido de grafeno, fulerenos, nanotubos e nanopartículas de carbono são amplamente utilizados em dispositivos biomédicos (PARK et al., 2014), na cosmetologia como o desenvolvimento para nanocosméticos pela empresa francesa *Lancôme*, divisão de luxo da L'Oréal, há mais ou menos 15 anos, com o lançamento de um creme para rosto que transportava nanocápsulas de vitamina E pura para combater o envelhecimento da pele (MARTINELLO, 2008).

Na área química sua utilização aumenta a cada dia, com pesquisas principalmente dentro de formulações de revestimentos, como, embalagens para alimentos com nanopartículas de prata com propriedades antibacterianas, materiais esportivos reforçados em suas zonas críticas com nanotubos de carbono, tintas com propriedades especiais, como revestimentos antibacterianos para utilização hospitalar, pigmentos que podem mudar de cor de acordo com a temperatura ou luminosidade (TOMA, 2013).

Dentro da indústria farmacêutica o uso de agentes farmacológicos empregando estratégias clássicas de desenvolvimento é frequentemente limitado por problemas

farmacodinâmicos e farmacocinéticos, tais como baixa eficácia ou falta de seletividade, bem como sua toxicidade intrínseca (BENDER et al., 1996). Além disso, a limitação ao uso de diversos fármacos devido as barreiras fisiológicas ou mecanismos celulares, fraca solubilidade, baixa biodisponibilidade e rápida eliminação pelo organismo, demonstra a importância do desenvolvimento de formas farmacêuticas mais eficazes (JAIN, 2005a). A eficácia de diferentes fármacos, tais como agentes quimioterápicos, é frequentemente limitada pelos efeitos secundários dependendo da dose, sendo tóxicos, tanto para as células normais como para as cancerígenas. Uma maneira para evitar que isto ocorra, é a produção de partículas incorporando substâncias ativas, em que o ingrediente ativo está ligado a um invólucro ou em uma matriz polimérica (NISHIYAMA et al., 2005).

Com o uso da nanotecnologia, o direcionamento de drogas para o local específico de ação está se tornando uma realidade, resultando em uma medicina personalizada, que reduz o efeito tóxico da droga, maximizando o efeito terapêutico (JAIN, 2005b). Este objetivo é alcançado principalmente pelo tamanho pequeno destas partículas, que podem penetrar através de diferentes barreiras. Além disso, como as nanopartículas (NPs) são preparadas para encapsular moléculas, estas melhoram a solubilidade, estabilidade, absorção, evitando o sistema autoimune e protegendo assim o fármaco da inativação prematura durante o seu transporte (MEDINA et al., 2007).

1.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Os anos 50 e 60 foram marcados por grandes avanços na área farmacêutica, quando apareceram as primeiras formulações de liberação retardada e controlada. A tática utilizada foi o incremento de sistemas de liberação constituído por partículas de pequeno tamanho.

Os polímeros usados como biomateriais ou para a preparação de sistemas nanoestruturados são comumente chamados de biopolímeros e podem ser de origem natural ou sintética, biodegradáveis ou não. Por apresentarem propriedades específicas compatíveis aos sistemas orgânicos, pois, evitam sequências de reações imunes do corpo, apresentam maior facilidade de transformações químicas e relativamente fácil manipular as propriedades de sua superfície, sem contudo, modificar o polímero como um todo (TIAN, 2011).

As nanopartículas (NPs) poliméricas são as mais utilizadas dentro da área farmacêutica, por apresentarem uma maior estabilidade tanto no organismo, como durante armazenamento por um longo período de tempo (SAIKIA et al., 2015). Estas são utilizadas para inúmeras aplicações terapêuticas, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica. São classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas (Figuras 01 e 02), diferindo entre si, segundo a composição e organização estrutural (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Figura 01. Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas: 1) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; 2) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas.

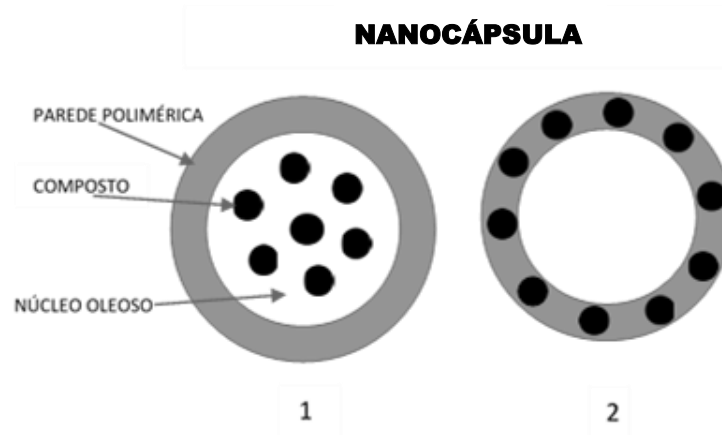
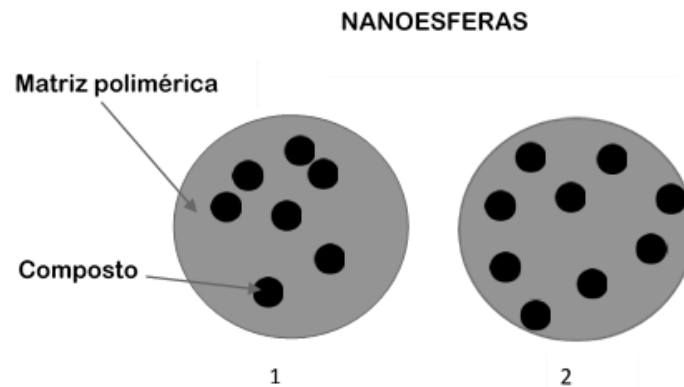


Figura 02. Representação esquemática de nanoesferas poliméricas 1) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; 2) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas).



As NPs poliméricas biodegradáveis são frequentemente utilizadas para melhorar a capacidade terapêutica de diversos fármacos insolúveis em água e moléculas bioativas, melhorando sua biodisponibilidade, solubilidade e tempo de retenção, sendo carreadores de diversas substâncias, as quais incluem as nanocápsulas e nanoesferas (PUISIEUX et al., 1994). As nanocápsulas são formadas por uma camada polimérica disposta ao redor de um núcleo geralmente oleoso, enquanto as nanoesferas são sistemas matriciais constituídos por polímeros (SEBAK et al., 2010).

Por apresentarem características físico-químicas importantes, como diâmetro médio reduzido (<300nm), alta área superficial, biocompatibilidade e biodegradabilidade, proporciona uma maior capacidade de atravessar barreiras biológicas, melhorando a penetração intracelular, tendo assim uma melhor absorção e biodisponibilidade no tecido afetado (ALEXIS et al., 2008; PLAPIED et al., 2011).

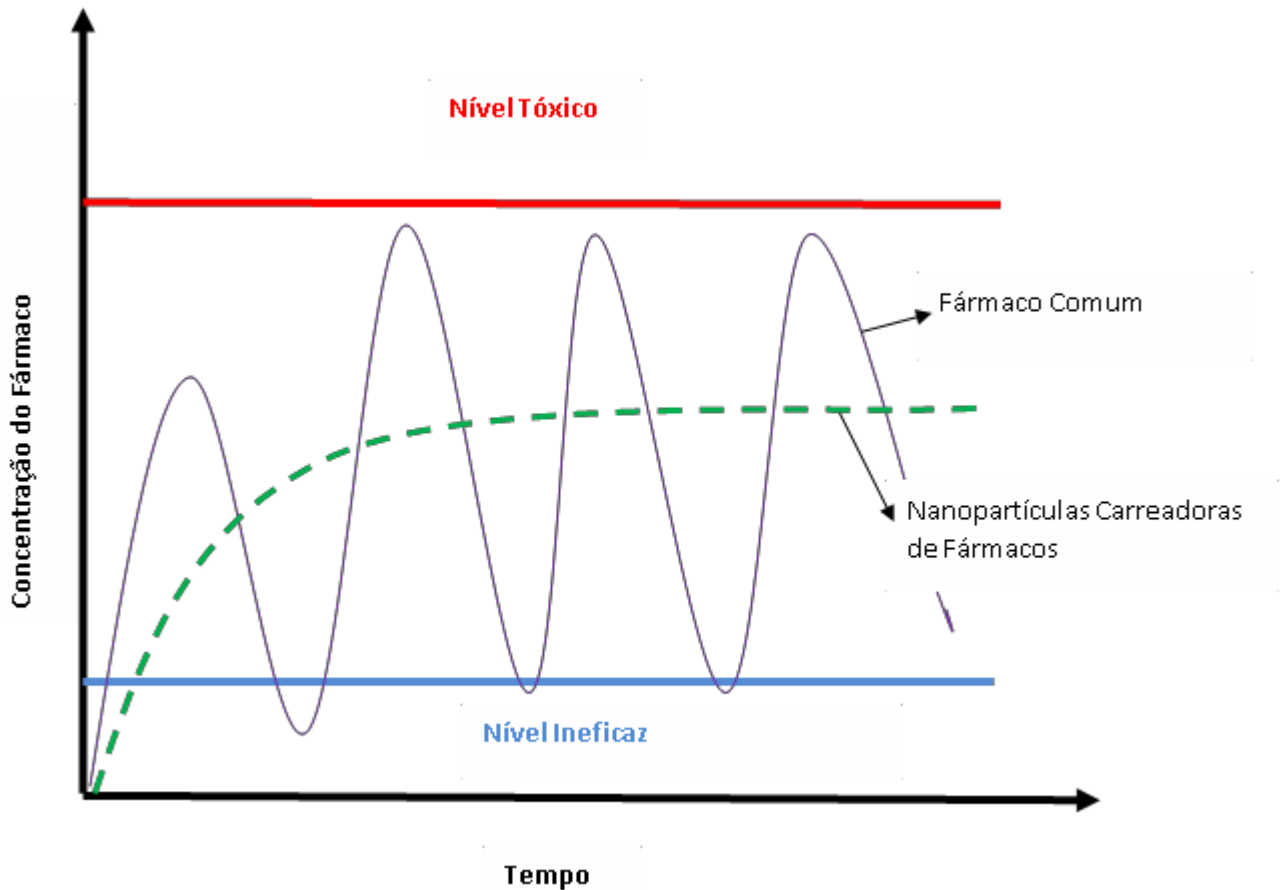
Existem diversos polímeros naturais (albumina, caseína, quitosana, gelatina, colágeno e zeína) e sintéticos (polilactídeos, poliglicolídeos, poliacrilatos e os poliésteres) sendo todos estudados no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas. As proteínas são escolhidas sobre os polímeros sintéticos para

aplicações na área médicas, por serem biocompatíveis, biodegradáveis, atóxicas, abundantes, de custo relativamente baixo. Além disso, por serem materiais que formam a base do crescimento celular, é mais simples manter as funções da matriz extracelular com proteínas do que com polímeros sintéticos (GOMEZ-ESTACA, ALTSKÄ, STANDING, 2012). O primeiro produto comercial nanoparticulado na área farmacêutica foi o *Abraxame*® (albumina sérica humana nanoparticulada contendo *paclitaxel*).

1.4 LIBERAÇÃO CONTROLADA

A liberação controlada de fármacos é o que permite sua maior disponibilidade no corpo em contraste com as formas de liberação imediata, mas, para poder atingir este objetivo, é necessário conhecer os mecanismos que dirigem esta liberação do sistema polimérico (ZHU, 2002) (Figura 03).

Figura 03. Gráfico explicativo sobre a liberação controlada das nanopartículas.



Os sistemas de liberação controlada seguem um mecanismo de difusão, que é o método através do qual a matéria é transportada de um local para outro dentro do próprio sistema e resulta-se de movimentos moleculares aleatórios (COSTA, LOBO, 1999). Normalmente, este processo pode ser descrito da seguinte forma: a água se difunde dentro da membrana ou da matriz polimérica e em seguida, o fármaco é dissolvido e finalmente se difunde para fora do polímero (EL-NABARAWI, 2005).

Na liberação por erosão, o fármaco é ligado à cadeia do polímero por uma ligação covalente e é liberado quando ocorre o rompimento destas ligações por meio da hidrólise que controla a liberação. O tempo de meia-vida e eliminação do fármaco dependerá somente das propriedades do polímero portador de drogas (ZHU, 2002). Estes sistemas são geralmente preparados em polímeros hidrossolúveis. Este mecanismo envolve dois processos seriais, que incluem a difusão do meio para o interior da matriz com sua subsequente dilatação e a formação de um gel e a degradação/erosão desta matriz (MANADAS, PINA, VEIGA, 2002). Isto permite a liberação de altas quantidades de fármaco de forma localizada em um órgão ou tecido durante períodos prolongados (TAN, 2010).

Os sistemas poliméricos de liberação controlada, frequentemente descritos como “drug delivery systems”, tem se desenvolvido visando inúmeras aplicações especialmente o controle da liberação de fármacos ou de forma mais seletiva de suas substâncias ativas, aumentando assim sua eficiência, oferecendo inúmeras vantagens quando comparados a outros fármacos de dosagem convencionais (WISSING, 2004).

1.5 ALBUMINA

Cada uma dos nossos trilhões de células no organismo precisam de um constante suprimento para se manterem vivas. O transporte de moléculas solúveis em água, como açúcares, que circundam pela corrente sanguínea são capturadas pelas nossas células ao longo do caminho através da difusão. Outros nutrientes importantes, no entanto, são insolúveis em água e precisam de carreadores especiais para serem levados para dentro da células, como acontece com a sódio-potássio, que utiliza uma proteína transmembrana que mantém em equilíbrio estes sais dentro das células (ALBERTS, 2002).

Albumina é uma molécula pequena (69.000 Da). Esta é a proteína mais abundante no sistema orgânico, representando cerca de 50 % do total de proteínas circundante (BOLDT, 2010). Ela é sintetizada no fígado, em uma taxa de 150-250 mg/kg do peso corporal. Sua meia-vida varia entre 18 a 21 dias em condições fisiológicas. Em situações normais responde por 80% da pressão osmótica dentro dos capilares sanguíneos, participando assim do equilíbrio ácido-básico, agindo na forma de um “tampão” tanto em ocorrências de acidose como em alcalose metabólica e ainda está envolvida no transporte de substâncias fisiológicas e drogas (GUYTON, HALL, 2006). Por ser uma proteína versátil, tem o papel de transportar os ácidos graxos no sangue. Cada molécula dela consegue carrear até sete moléculas de ácidos graxos, que se ligam em seus sítios, ocultando através das ligações suas caudas de carbono (hidrofóbicas), da água circundante. Sua alta capacidade de transportar moléculas insolúveis dá à ela uma característica de poder se ligar a diversas moléculas e íons. Uma das mais interessantes propriedades é a capacidade de poder ligar-se reversivelmente, isto é ela consegue voltar a sua estrutura terciária original após transportar uma molécula ou íons (WEBER, 2000). Pesquisas sobre as interações entre moléculas biológicas e os fármacos envolvem um dos mais importantes tópicos da ciências (MATOS, 2005).

Sua composição é de um elipsóide de 140 x 40 Å aproximadamente com três domínios homólogos. A BSA caracteriza-se por possuir um número pequeno de resíduos de triptofano e metionina e um alto número de cistina e aminoácidos

carregados (ácidos aspártico e glutâmico, lisina e arginina). Suas estruturas primárias e secundárias, bem como seus sítios de ligações preferenciais com o analito carregado, têm sido amplamente estudadas (XU, 2011). Neste caso, as regiões são classificadas em três grandes domínios estruturalmente similares, denominados de grupos I, II e III, e cada domínio contém dois subdomínios, classificados de A e B. As regiões responsáveis pelo armazenamento dos compostos estão localizadas nos subdomínios IIA e IIIA (FASANO et al., 2005).

Existem comercialmente dois tipos de albumina: a humana (HSA) e a bovina (BSA), sendo a principal diferença entre elas, a quantidade de resíduos de triptofano (Trp); a humana apenas um e a bovina dois (HAZRA, 2017).

Estas propriedades, bem como, a sua pronta disponibilidade, a sua biodegradabilidade, e a ausência de toxicidade e imunogenicidade fazem dela uma candidata interessante para ser utilizada em diversos modelos biológicos (KRATZ, 2008).

Em recentes revisões na literatura (Tabela 01), encontram-se uma vasta abundância de moléculas e substâncias, incluindo fármacos, genes, vacinas e anticorpos que podem ser efetivamente serem ligados à matriz de albumina, podendo esta atuar como uma transportadora (LEE et al., 2014; REN et al., 2013; KARIMI et al., 2013). Nos últimos anos, a albumina atraiu um grande interesse na formação de nanomateriais à base de proteínas, representando um transportador com grande potencial em aplicações de entrega controlada (KRATZ, 2008; KOUCHAKZADEH, 2014; MISAK, 2014). A incorporação de fármacos terapêuticos em transportadores a base de albumina pode ser realizada através de vários métodos químicos ou físicos, incluindo a ligação covalente a grupos funcionais sobre as partículas de albumina (WARTLICK, 2004; LI et al., 2013), ou a adsorção destes na superfície da partícula.

Os sistemas portadores de NPs à base de albumina representam uma estratégia atraente, uma vez que uma quantidade significativa de fármaco pode ser incorporada na matriz das partículas, devido aos seus diferentes locais de ligação presentes na molécula de albumina (PATIL, 2003). A estrutura primária da albumina possui um elevado teor de aminoácidos primários, com isso, ocorre uma ligação por adsorção eletrostática de moléculas carregadas positivamente ou negativamente, sem

a exigência de outros compostos (AHMED, 2012).

Além disso, as NPs de albumina podem ser facilmente preparadas em condições como coacervação, dessolvatação controlada ou por formação de emulsão, com tamanhos entre 50 a 300nm, com propriedades de liberação controlada, algumas vezes superior aos lipossomas. Comercialmente, as albuminas são obtidas com quantidades significativas de ovo-albumina, soro bovino (albumina de soro bovino, BSA) e soro humano (albumina de soro humano, HSA) e também estão disponíveis a partir de soja, leite e grãos (ARSHADY, 1989).

As NPs de BSA são amplamente utilizadas para administração de fármacos devido à sua importância médica, abundância, facilidade de purificação, podendo ser facilmente preparadas sob condições relativamente simples, por meio de coacervação, ou dessolvatação controlada para a formação da emulsão, bem como, por ter uma estrutura espacial muito parecida com a albumina humana não ocorre rejeição pelo organismo (HU et al., 2006). A BSA é formada por uma cadeia polipeptídica simples com 583 resíduos de aminoácidos em três domínios. Pode formar dímeros, principalmente em altas concentrações ou em sua forma cristalizada (CARTER e HO, 1994).

Seu ponto isoelétrico (PI) está em torno de 4,70 – 5,60, dependendo da literatura (EMERSON, 1989; GOLDBERG, 1952). O PI de uma molécula indica o pH no qual ela se encontra com a mesma quantidade de carga positiva e negativa. A BSA é carregada negativamente no pH 7 e sofre mudanças conformacionais no intervalo de pH entre 4 e 8 (CARTER e HO, 1994).

A BSA além de ter uma alta afinidade por ácidos graxos, hematinas, bilirrubina, possui também uma grande afinidade por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados. Forma ligações covalentes com fosfato de piridoxil (*Pyridoxyl phosphate*), cisteína, e vários metais, tais como Cu (II), Ni (II), Hg (II), Ag(II) e Au(I). Como uma proteína de transporte multifuncional, a BSA é um carregador chave ou reservatório de óxido nítrico, o que tem implicado em vários processos fisiológicos importantes, incluindo os de neurotransmissão (GOLDBERG, 1952). Realiza também muitas outras funções como, eliminação de radicais livres de oxigênio e desativação de vários metabólitos lipofílicos tóxicos (EMERSON, 1989).

Tabela 01. Principais publicações sobre a utilização da albumina como polímero para obtenção de nanopartículas.

| Título | Autor | Periódico | Ano |
|---|--|---|------------|
| Fabrication of curcumin-loaded bovine serum albumin (BSA)-dextran nanoparticles and the cellular antioxidant activity | Yuting Fan, Jiang Yi, Yuzhu Zhang, Wallace Yokoyama | Food Chemistry 239, 1210-1218 | 2018 |
| Multispectroscopic and bioimaging approach for the interaction of rhodamine 6G capped gold nanoparticles with bovine serum albumin. | Manjubaashini N et al. | J Photochem Photobiol B. May 7; 183:374-384 | 2018 |
| Gemcitabine-loaded gold nanospheres mediated by albumin for enhanced anti-tumor activity combining with CT imaging. | Wang Z, et al. | Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. Aug 1; 89:106-118 | 2018 |
| Radiosensitizing effects of different size bovine serum albumin-templated gold nanoparticles on H22 hepatoma-bearing mice. | Liu S, et al. | Nanomedicine (Lond). May 11 | 2018 |
| Albumin nanoparticles with synergistic antitumor efficacy against metastatic lung cancers | Bomi Kim et al. | Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 158 - 157-166 | 2017 |
| Development of albumin-based nanoparticles for the delivery of abacavir | Zahra Kayani, Omidreza Firuzi, Abdol-Khalegh Bordbar | International Journal of Biological Macromolecules xxx | 2017 |
| Doxorubicin and paclitaxel co-bound lactosylated albumin nanoparticles having targetability to hepatocellular carcinoma | Quang Thao et al. | Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 152, 183-191 | 2017 |
| Erlotinib-loaded albumin nanoparticles: A novel injectable form of erlotinib and it's in vivo efficacy against pancreatic adenocarcinoma ASPC-1 and PANC-1 cell lines | M. Noorani, N. Azarpirac, K. Karimian, H. Heli | International Journal of Pharmaceutics 531, 299-305 | 2017 |
| Impact of albumin-based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery | Bhushan et al. | Advances in Colloid and Interface Science 246, 13-39 | 2017 |
| In situ preparation of water-soluble ginsenoside rh2-entrapped bovine serum albumin nanoparticles: in vitro cytocompatibility studies | Singh et al. | International Journal of Nanomedicine 12, 4073-4084 | 2017 |
| Impact of surface modification in BSA nanoparticles for uptake in cancer cells | Jin-Seok Choi, Nilesh Meghani | Colloids and Surfaces B: Bionterfaces 145, 653-661 | 2016 |
| A new bioavailability enhancement strategy of curcumin via self-assembly nano-complexation of curcumin and bovine serum albumin | Seunghyun Lee et al. | Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 147 - 281-290 | 2016 |
| A simple improved desolvation method for the rapid preparation of albumin nanoparticles | Ali Jahanban-Esfahlan, Siavoush Dastmalchi, Soodabeh Davaran | International Journal of Biological Macromolecules 91 - 703-709 | 2016 |

| Título | Autor | Periódico | Ano |
|--|--|---|-------------|
| Bufalin-loaded bovine serum albumin nanoparticles demonstrated improved anti-tumor activity against hepatocellular carcinoma: preparation, characterization, pharmacokinetics and tissue distribution | Zhang et al. | Oncotarget, Vol. 8, No. 38 - 63311-63323 | 2015 |
| Albumin nanoparticles for the delivery of gabapentin: Preparation, characterization and pharmacodynamic studies | Barnabas et al. | International Journal of Pharmaceutics 473 - 73-79 | 2014 |
| Multi-spectroscopic analysis and molecular modeling of the interaction of curcumin and its derivatives with human serum albumin: A comparative study | Yu-Shu Ge et al. | Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 124, 265-276 | 2014 |
| Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems | Ahmed O. Elzoghby, Wael M. Samy, Nazik A. Elgindy | Journal of Controlled Release 157 - 168-182 | 2012 |

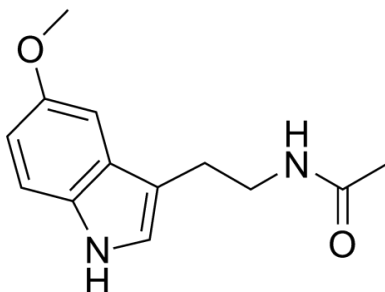
Disponível: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed (05/2018)

1.6 MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, MEL) (Figura 04) é um hormônio secretado pela glândula pineal dos mamíferos, especialmente durante a noite, e que está envolvida na regulação do ciclo sono-vigília, bem como em diversas funções biológicas, incluindo a regulação do humor, o controle da reprodução sazonal, e o ritmo circadiano, em animais e seres humanos (HOFFMEISTER et al., 2012).

A biossíntese da MEL tem início com a captação do aminoácido essencial triptofano pelas células parenquimatosas da glândula pineal. Depois de captado ele é convertido em 5-hidroxitriptofano, através da ação da enzima triptofano hidroxilase e, em seguida, é alterado no neurotransmissor 5-hidroxitriptamina (serotonina) pela enzima descarboxilase do aminoácido aromático (NELSON e COX, 1986). As concentrações de serotonina na glândula pineal são mais elevadas do que em qualquer outro órgão ou estrutura cerebral. Os níveis de serotonina estão elevados durante o dia e diminuem drasticamente no início da noite, quando então esse neurotransmissor é convertido em MEL (COON, 1995). A conversão de serotonina para MEL envolve duas enzimas características da glândula pineal: a serotonina-N-acetil-transferase que converte a serotonina em N-acetilserotonina, e a 5-hidroxi-indol-O-metil-transferase, enzima responsável pela transferência do grupo metil da S-adenosil-metionina para o grupo 5-hidroxil da N-acetilserotonina, dando como resultado a N-acetil-5-metoxitriptamina ou MEL (REPPERT et al., 1988).

Figura 04. Estrutura da MEL



A MEL atravessa com facilidade as membranas celulares e a barreira hematoencefálica, e por ser um excelente captador de radicais livres (BEYER et al., 1998) tem sido utilizada em ensaios modelo pró-oxidativos de peroxidação lipídica, como lipossomas e microssomas (PALUMBO et al., 2002; SAIJA et al., 2002).

Tanto estudos *in vitro*, como *in vivo* mostram que a melatonina é um sequestrante poderoso de radicais livres centrados no radical oxigênio e outras hidroxilas altamente tóxicas, sugerindo que possui ações não mediadas por receptores (VIJAYALAXMI et al., 2004). Em um estudo, a melatonina parece ser muito mais eficaz do que outros antioxidantes conhecidos (por exemplo, o manitol, a glutatona e a vitamina E) como também, na proteção contra os danos oxidativos. Por conseguinte, a melatonina pode proporcionar uma proteção contra doenças que causam alterações degenerativas ou proliferativas, por sua blindagem nas macromoléculas, particularmente o DNA (SANCHEZ-HIDALGO et al., 2009). Além disso, diferentemente de outros antioxidantes, a MEL não participa do ciclo de oxirredução, que consiste na habilidade de uma molécula em sofrer oxidação ou redução. Um ciclo de oxirredução permite que outros antioxidantes interajam como pro-oxidantes, e promovam a formação de novos radicais livres (REITER, 1998). A MEL, uma vez oxidada, não pode ser reduzida à sua forma anterior, já que ela forma produtos altamente estáveis ao reagir com radicais livres (TAN, 2007). No entanto, estes efeitos antioxidantes requerem concentrações de MEL que estão muito além do que as concentrações séricas de picos noturnos. Assim, o efeito antioxidante da MEL nos seres humanos, provavelmente ocorrerá apenas em concentrações farmacológicas (BRZEZINSKI, 1997).

A MEL é metabolizada rapidamente, principalmente no fígado, por hidroxilação (6-hidroximelatonina), sendo excretada pela urina, com concentrações próximas as encontradas no sangue durante a noite em média de 10 a 60 pg/mL em jovens adultos (LYNCH et al., 1975). Sua biodisponibilidade na administração oral possui uma ampla variação. Por exemplo, em indivíduos normais que receberam 80 mg de MEL, suas concentrações no soro variaram entre 350 a 10.000 vezes a concentração do pico noturno de 60 a 150 minutos depois, e estes valores permaneceram estáveis durante em média 90 minutos (IGUCHI, 1982). Doses orais muito mais baixas entre 1 a 5 mg, que estão amplamente disponíveis em farmácias, resultam em concentrações de MEL

no soro entre 10 a 100 vezes maior do que o pico noturno, uma hora após a ingestão, seguindo uma queda em quatro a oito horas (WALDHAUSER et al., 1984).

Com sua função de promover o sono, a MEL, em determinadas concentrações, pode reduzir a proliferação de células cancerígenas, o crescimento tumoral e a incidência de metástases, especialmente em cancer de mama, próstata e cólon, variando de acordo com a dosagem farmacológica. Se, de fato, os níveis fisiológicos da MEL podem conter o crescimento do tumor, a redução associada à idade na produção de MEL, pode colaborar para o aumento da frequência de cancro nos idosos. Há também, alguns estudos iniciais que indicam que a eficácia da MEL é limitada em relação a proliferação de células do tumor, dependendo, do horário da administração a MEL podendo variar sua eficácia como fármaco, quando administrada no início do período noturno, mostra um aumento de seu efeito farmacológico (SAUER, DAUCHY e BLASK et al., 2001).

A utilização da MEL em pacientes oncológicos tem sido amplamente bem estudada, tanto *in vitro* como *in vivo* (BLASK et al., 1986, BARTSCH et al., 1981). Os mecanismos de ação envolvem principalmente, sua capacidade de estimular a resposta imunológica, como também estão relacionados à sua atividade bioquímica e metabólica (COLLINS et al., 2003). O complexo processo da carcinogênese, ocasionalmente envolve um grande estresse oxidativo, com basicamente três etapas: iniciação, promoção e progressão; o estresse oxidativo participa de todas elas. A ação antioxidante da MEL diminui a formação de radicais livres, reduzindo as lesões ao DNA. Ocorre ainda uma interação com os medicamentos utilizados na terapêutica oncológica. Já foi demonstrado que ela aumenta a sensibilidade das células ao tamoxifeno e essa associação pode ser considerada em terapias refratárias a essa substância (LISSONI et al., 1995).

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa associada à idade e caracterizada por perda progressiva da cognição e de manifestações neurocomportamentais. A patologia da DA inclui as placas senil extracelulares, constituídas principalmente por β -amilóide, e os emaranhados neurofibrilares intracelulares e compostos principalmente hiperfosforilados. Apesar de ser amplamente estudada a totalidade de sua etiologia ainda é desconhecida (LARS, 2011). Vários fatores contribuem para a DA em termos de iniciação e progressão e os

ensaios clínicos indicam que uma suplementação de MEL melhora o sono retardando a progressão da disfunção cognitiva em pacientes (CRUZ-AGUILAR et al., 2013).

A MEL protege eficazmente células neuronais de toxicidade β -amilóide mediada via suas propriedades antioxidantes e anti-amilóides, não só inibindo sua produção, mas também impedindo a formação de fibrilas. Embora o mecanismo exato ainda não é totalmente compreendido, uma influência reguladora direta da MEL sobre as atividades de proteínas do tipo quinase e fosfatase já foi proposto (MEMDUH et al., 2005).

O óxido nítrico (NO) é um importante neurotransmissor com uma alta capacidade de aumentar a transmissão entre neuroreceptores, atuando na memória e no aprendizado, podendo também ter ações endócrinas, autócrinas e parácrinas (BOGDAN, 2001). Como também possui uma ação no sistema de imunorregulação presente na inflamação. Assim, o alto nível de NO que deveria ser tóxico para bactérias, parasitas ou células tumorais, pode lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo o responsável pela maioria de processos inflamatórios e autoimunes (SNYDER, 1992). Além disso, a formação de peroxinitrito (iNOS), um produto da reação de difusão do NO com ânion superóxido, leva a um aumento da citotoxicidade (GARCIA-MEDIAVILLA, 2005). Novos estudos com modelos de inflamação tem demonstrado a capacidade da MEL para bloquear a formação do iNOS. O que reduz significativamente sua expressão em inflamações em órgãos como pâncreas, pulmão, coração, bem como choques assépticos (BEYER et al., 1998).

Embora existam na literatura diversos trabalhos que demonstram o potencial clínico benéfico da MEL (Tabela 02), ela exhibe como problemática uma estreita janela terapêutica devido à sua baixa solubilidade, o que reflete sua baixa biodisponibilidade. Visando a melhoria das suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, o aumento da sua biodisponibilidade, potencial de ação e maior eficácia nos perfis farmacocinético e farmacodinâmico, a obtenção de sistemas nanoestruturados à base de MEL se torna uma estratégia interessante (FESSI et al. 1989).

Tabela 02. Levantamento das Principais Publicações sobre a utilização da Melatonina.

| Título | Autor | Periódicos | Ano |
|---|----------------------|---|------------|
| Prophylactic administration of carnosine and melatonin abates the incidence of renal toxicity induced by an over dose of titanium dioxide nanoparticles. | Fadda LM et al. | J Biochem Mol Toxicol. | 2018 |
| Poly(Lactide-Co-Glycolide) - Monomethoxy-Poly- (Polyethylene Glycol) Nanoparticles Loaded with Melatonin Protect Adipose-Derived Stem Cells Transplanted in Infarcted Heart Tissue. | Ma Q et al. | Stem Cells. Apr;36(4):540-550 | 2018 |
| Anti-inflammatory and antioxidant effect of melatonin on recovery from muscular trauma induced in rats. | Ostjen, C.A. et al | Exp Mol Pathol. 2018 Dec 3 | 2018 |
| Impact of physical activity and sleep quality on quality of life of rural residents with and without a history of cancer: findings of the Day and Night Study. | Rafie, C. et al | Cancer Manag Res. 2018 Nov 9;10: 5525-5535. | 2018 |
| Melatonin attenuates myocardial ischemia reperfusion injury via improving mitochondrial fusion/mitophagy and activating the AMPK-OPA1 signaling pathways. | Zhang, Y. et al | J Pineal Res. 2018 Dec 5:e12542. | 2018 |
| Effect of Melatonin on the Expression of VEGF-A and on the Degeneration of Follicle Reserve in Rat Ovary. | Kandemir, Y.B. et al | Eurasian J Med. 2018 Oct;50(3):160-163. | 2018 |
| Melatonin protects against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy by the phosphorylation of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A). | Kandemir, Y.B. et al | Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2018 Nov 30;64(14):47-52. | 2018 |

| Título | Autor | Periódicos | Ano |
|---|----------------------------|--|------------|
| Therapeutic strategies of melatonin in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. | Wang, Y. et al | Onco Targets Ther. 2018 Nov 8;11: 7895-7908. | 2018 |
| Melatonin and Its Metabolites Ameliorate UVR-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Human MNT-1 Melanoma Cells. | Kleszczyński, K. et al | Int J Mol Sci. 2018 Nov 28;19(12). | 2018 |
| Melatonin protects endothelial progenitor cells against AGE-induced apoptosis via autophagy flux stimulation and promotes wound healing in diabetic mice. | Jin, H. et al | Exp Mol Med. 2018 Nov 21;50(11):154. | 2018 |
| Therapeutic effects of melatonin on cerebral ischemia reperfusion injury: Role of Yap-OPA1 signaling pathway and mitochondrial fusion. | Wei, N. et al | Biomed Pharmacother. 2018 Nov 23; 110:203-212. | 2018 |
| Melatonin Effects on EEG Activity During Sleep Onset in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease: A Pilot Study. | Cruz-Aguilar, M.A. et al | J Alzheimers Dis Rep. 2018 Mar 6;2(1):55-65. | 2018 |
| Impact of Melatonin in Solid Organ Transplantation-Is It Time for Clinical Trials? A Comprehensive Review. | Stiegler, P. et al | Int J Mol Sci. 2018 Nov 8;19(11). | 2018 |
| Melatonin and its Metabolites as Chemical Agents Capable of Directly Repairing Oxidized DNA. | Pérez-González, A. et al | J Pineal Res. 2018 Nov 11:e12539. | 2018 |
| The protective effects of melatonin on blood cell counts of rectal cancer patients following radio-chemotherapy: a randomized controlled trial. | Kouhi Habibi, N. | Clin Transl Oncol. 2018 Nov 12. | 2018 |
| Melatonin protects mesenchymal stem cells from autophagy-mediated death under ischaemic ER-stress conditions by increasing prion protein expression. | Lee, J.H. et al | Cell Prolif. 2018 Nov 14:e12545. | 2018 |
| Mitochondrial functions and melatonin: a tour of the reproductive cancers. | Almeida Chuffa, L.G. et al | Cell Mol Life Sci. 2018 Nov 14. | 2018 |

| Título | Autor | Periódicos | Ano |
|---|--|---|------------|
| Melatonin promotes self-renewal and nestin expression in neural stem cells from the retina. | Gao, Y. et al | Histol Histopathol. 2018 Nov 16:18065. | 2018 |
| Poly(Lactide-Co-Glycolide) - Monomethoxy-Poly- (Polyethylene Glycol) Nanoparticles Loaded with Melatonin Protect Adipose-Derived Stem Cells Transplanted in Infarcted Heart Tissue. | Ma, Q. et al | Stem Cells. 2018 Apr;36(4): 540-550 | 2018 |
| Protective roles of nanomelatonin in cerebral ischemia-reperfusion of aged brain: Matrixmetalloproteinases as regulators. | Sarkar S, Mukherjee A, Das N, Swarnakar S. | Exp Gerontol. Jun; 92:13-22 | 2017 |
| Combine protective effect of zinc oxide nanoparticles and melatonin on cyclophosphamide-induced toxicity in testicular histology and sperm parameters in adult Wistar rats. | Torabi F et al. | Int J Reprod Biomed (Yazd). Jul;15(7):403-412 | 2017 |
| Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. | Remião MH et al. | Reprod Toxicol. Aug; 63:70-81 | 2016 |
| Nanoparticle-mediated interplay of chitosan and melatonin for improved wound epithelialisation. | Blažević F et al. | Carbohydr Polym. Aug 1; 146:445-54 | 2016 |
| Melatonin releasing PLGA micro/nanoparticles and their effect on osteosarcoma cells. | Altındağ DÇ, Gümüşderelioğlu M. | J Microencapsul. Feb;33(1):53-63 | 2016 |
| Synthesis and in vitro evaluation of melatonin entrapped PLA nanoparticles: an oxidative stress and T-cell response using golden hamster. | Pandey SK, Halder C, Vishwas DK, Maiti P. | J Biomed Mater Res ASep;103(9):3034-44 | . 2015 |
| Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. | Hafner A et al. | J Microencapsul.28(8):807-15 | 2011 |

| | | | |
|--|------------------------|--|-------------|
| Short- and long-term stability of lyophilised melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles. | Hafner A et al. | Chem Pharm Bull (Tokyo).59(9):1117-23 | 2011 |
|--|------------------------|--|-------------|

Disponível: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed (01/2019)

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Desenvolver NPs de BSA contendo MEL;

Determinar suas características morfológicas;

Determinar suas características Físico-químicas;

Avaliar o perfil das NPs contendo MEL sobre células normais.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Obtenção de nanopartículas de BSA contendo melatonina;
- b) Determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas de BSA contendo melatonina;
- c) Caracterizar das nanopartículas obtidas quanto ao diâmetro médio e sua distribuição e sua morfologia por microscopia eletrônica de varredura;
- d) Caracterização físico química das nanopartículas obtidas pela avaliação da interação composto polímero, pelos métodos de difração de raios X (DRX), espectroscopia no infra vermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria diferencial exploratória (DSC);
- e) Demonstração da estabilidade de armazenamento do sistema nanoparticulados;
- f) Análise do perfil de liberação;
- g) Avaliação da toxicidade sobre células normais, usando um modelo de hemólise e células vero;

MATERIAIS E METODOS

4. MATERIAIS

4.1 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES PARA A PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS BSA COM MEL

- Água Ultrapura (sistema Milli-Q Gradiente Millipore®, resistividade de 18.2 MΩ cm);
- Etanol 95 % (Fmaia);
- Melatonina (Sigma Chemical Co. USA);
- Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker);
- Albumina de soro bovino (Sigma Chemical Co. USA);
- Membranas filtrantes (acetato de celulose 0,22 μm e PTFE 0,45 μm) Millipore®;
- Glutaraldeído 50 %, SP Labor Equipamentos de Laboratório®;
- Seringa 3mL sem agulha, BD Plastipak®;
- Cloreto de sódio
- Pepsina
- Ácido clorídrico
- Fosfato monobásico
- Hidróxido de sódio
- Pancreatinina
- Cloreto de potássio

4.2 EQUIPAMENTOS

- Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência – Waters Alliance®;
- Coluna fase reversa LiCrospher® 100 RP-18 endcapped 125 mm X 4 mm) tamanho de partícula 5µm - Merck®;
- Banho Ultrasônico - Unique®;
- Balança analítica – Tecnal®;
- Ultracentrífuga refrigerada – Hermle Labortechnik® Z36 HK;
- Sistema de ultrapurificação de água – MilliQ Gradiente Millipore®;
- Light Scattering Particle Size Analyser 90 PLUS - Brookhaven®;
- Incubadora com agitação orbital - Quimis®;
- Equipamento para análise do potencial zeta – ZetaSizer ZS, Malvern®;
- pHmetro pH/mV/TDS/Temp.meter 86505 - AZ®;
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV–FEG-TESCAN, model Myra® 3);
- Calorímetro exploratório diferencial SDT Q600 TA Instruments®;
- Aparelho de Infravermelho Nicolet IR200 FT-IR Thermo Scientific, EUA;
- Difratorômetro de Raios X Bruker – Mod. D2 PHASER;
- Agitador magnético

5. MÉTODOS

5.1 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE BSA CONTENDO MEL

NPs de BSA foram preparadas pelo método de dessolvatação (CASA et al., 2015), e de forma escalonada, sendo, portanto, compatível com compostos sensíveis ao calor (Figuras 05, 06 e 07).

No processo de dessolvatação, as nanopartículas são obtidas através de uma adição gota a gota contínua de etanol a uma solução aquosa de BSA, sob agitação contínua até que a solução se torne turva. As partículas de BSA (coacervados) morfologicamente formadas não são suficientemente estáveis, por conseguinte, estas podem redissolver novamente após sua dispersão com água. Para evitar a desestabilização, suas ligações foram endurecidas por uma ligação cruzada com glutaraldeído, em que as porções amino dos resíduos de lisina e de arginina em proporções com guanidina em cadeias laterais da BSA são solidificadas por uma reação de condensação com o aldeído-grupo de glutaraldeído (MERODIO, 2001; MEZIANI, 2003).

Para a obtenção das NPs de BSA contendo MEL com um diâmetro que não ultrapassa-se os 300 nm. Foi realizado alguns ensaios com variações de concentração de GA, para determinar qual a melhor concentração foram utilizadas NPS de BSA sem Mel, foram analisadas 3 concentrações de GA, 5, 8, 10 % v/v, como agente reticulante que possui importante efeito no tamanho e (IP). O GA é um agente de ligações cruzadas, normalmente usado na formação de redes de polipeptídios e proteínas devido à reatividade dos grupos aldeídos, que prontamente formam bases de Schiff com os grupos amino das proteínas.

Figura 05. Fluxograma da preparação das nanopartículas de BSA contendo MEL.

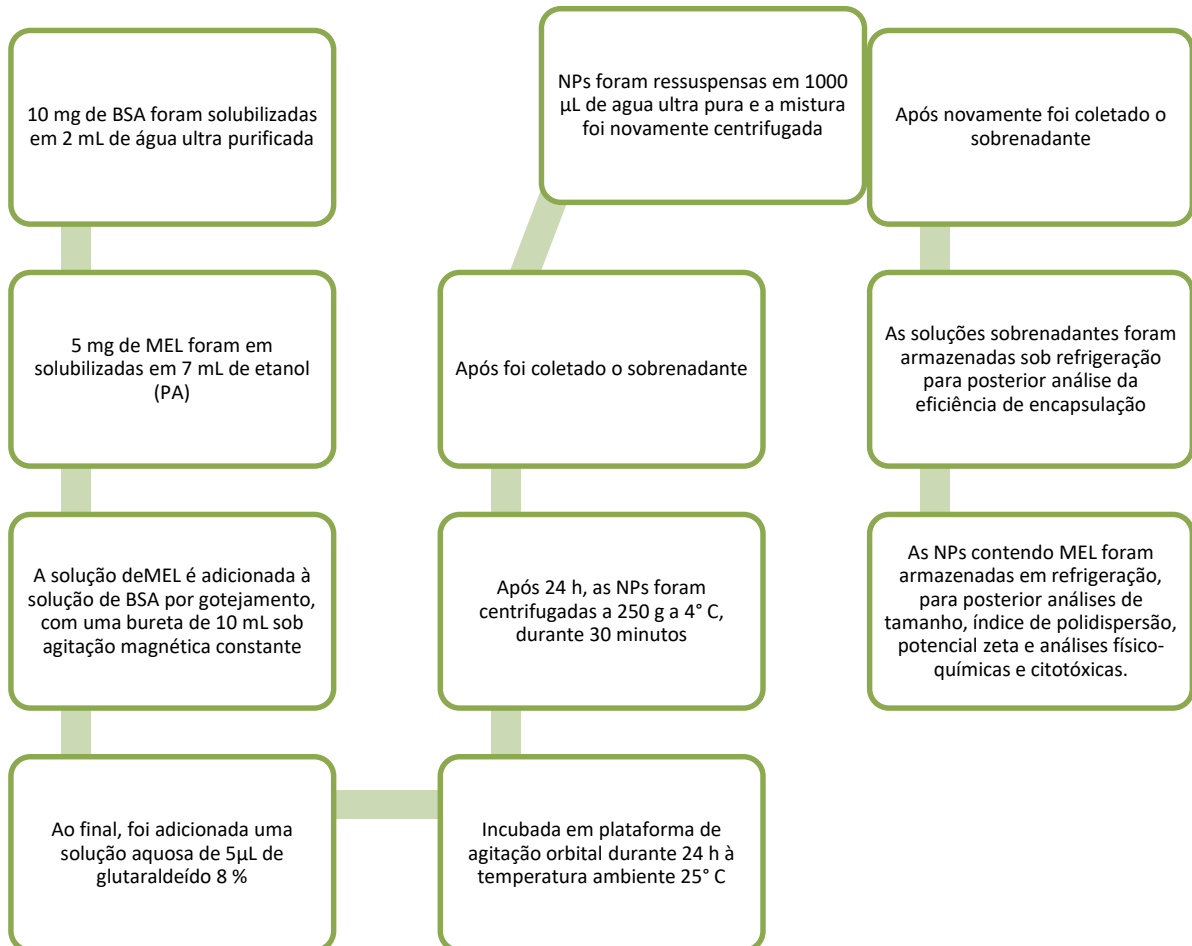


Figura 06. Representação gráfica da preparação das nanopartículas

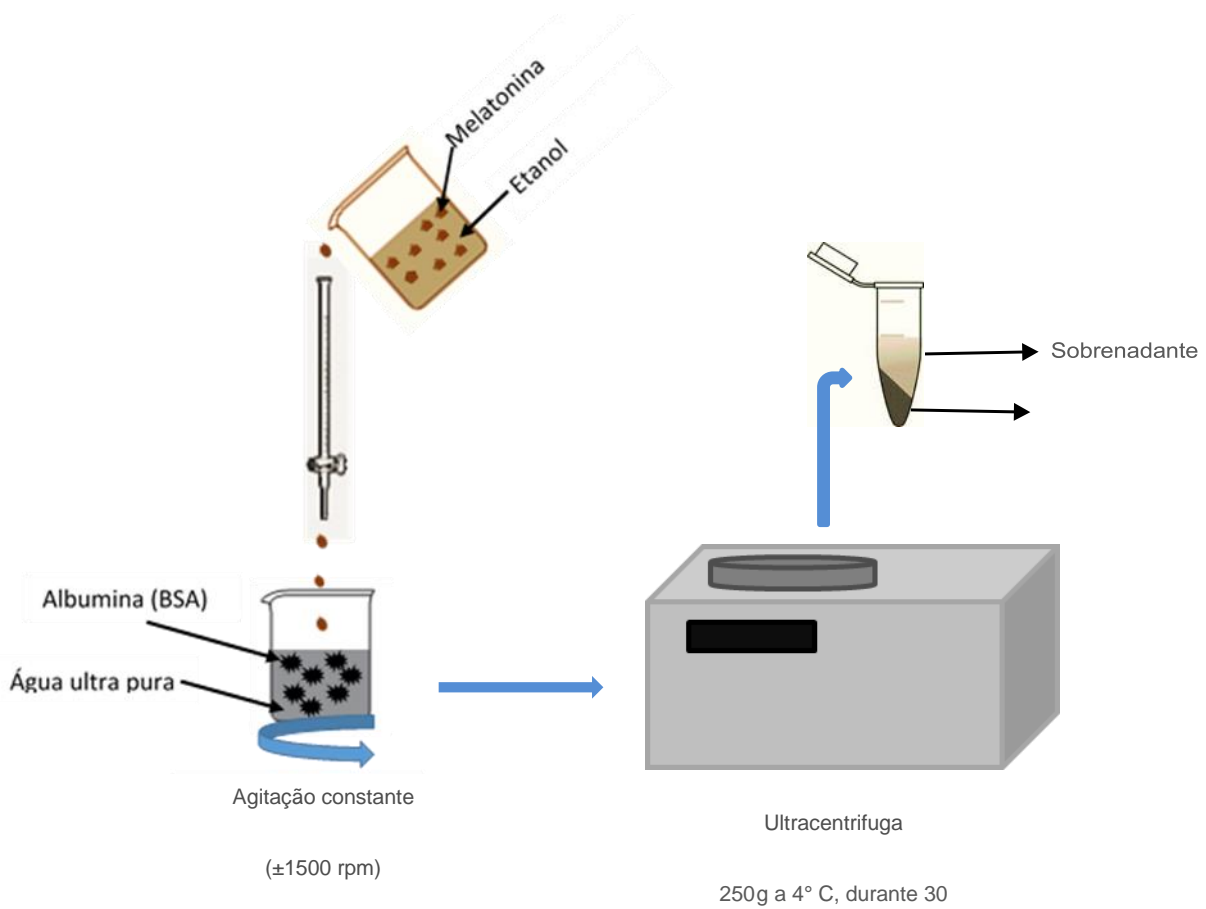
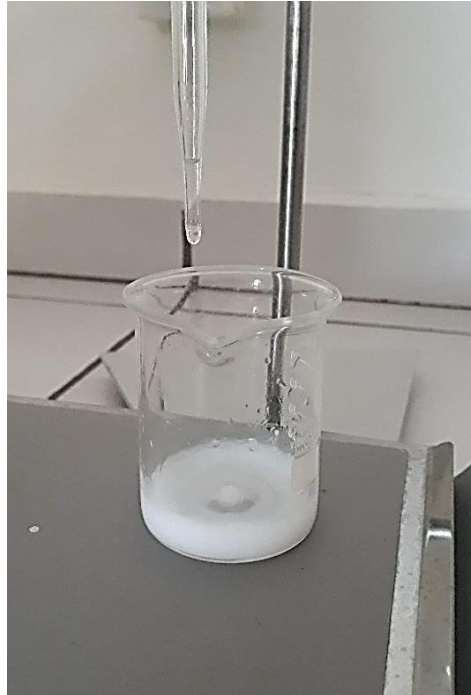


Figura 07. Preparação das nanopartículas.



5.1.1 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Para a determinação da concentração de melatonina incorporada, ocorreu de modo indireto, ou seja quantificou-se a concentração que não foi encapsulada, para isso foram utilizadas as alíquotas do sobrenadante, e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com coluna de fase reversa LiCrospher® 100 RP-18 (endcapped 125 mm X 4 mm) tamanho de partícula 5µm - Merck®, sendo realizada uma curva analítica, utilizando a fase móvel descrita na tabela 3.

Há duas formas de se determinar a quantidade de fármaco que foi nanoencapsulado, pelo método direto e indireto. No método direto sua mensuração é através do rompimento das NPs e posteriormente a quantificação da droga presente dentro da NPs. Neste estudo utilizou-se o processo indireto mais largamente empregado. Ele determina a quantidade do fármaco que não se agregou ao carreador permanecendo livre no solvente (ITO, et al., 2011).

Tabela 03. Fase móvel utilizada para a determinação da MEL.

| Detector | PDA |
|------------------------|----------------------------------|
| Coluna | QC 56018 |
| Fase móvel | Acetonitrila e água (60:40, v/v) |
| Fluxo da fase móvel | 0,9 mL/min |
| Temperatura da coluna | 30° C |
| Temperatura da amostra | 25° C |
| Volume de injeção | 20 µL |
| Comprimento de onda | 345 nm |

A quantificação de MEL encapsulado nas NPs de BSA foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, após uma análise do sobrenadante resultante do processo de lavagem e ultracentrifugação. Uma alíquota do sobrenadante foi diluída (1:10) em acetonitrila e água (60:40, v/v), filtrada em membrana de poro 0,22 μm , as análises foram realizadas em triplicata.

5.1.2 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERÇÃO (IP)

A determinação do diâmetro médio das NPs de BSA contendo MEL e sua distribuição, foi realizada utilizando a metodologia de espalhamento dinâmico da luz com correlação de fótons (DLS). Uma alíquota de 20 μL da amostra foi diluída em uma cubeta de 3 mL em água ultrapura. As leituras foram realizadas em triplicata em uma temperatura de 25° C, ângulo de espalhamento de 90° e comprimento de onda do laser de 660 nm. Os valores dos diâmetros médios das partículas e IP foram registrados como média e desvio padrão.

5.1.3 POTENCIAL ZETA

A análise do potencial zeta foi estudada e verificada pelo rastreamento do movimento de partículas carregadas em um campo de tensão, a mobilidade eletroforética, com o equipamento Zetasizer Nano S90 (Unicentro/Lab. Química). Para o ensaio, 10 μL da amostra de NPs de BSA contendo MEL foram inseridas na célula eletroforética, completado seu volume com água ultrapura, onde o potencial de ± 150 mV foi aplicado e o potencial zeta foi determinado.

A determinação do ξ demonstra a estabilidade de um sistema coloidal, e mostra a carga de superfície e a natureza da partícula, assim como do meio que a envolve. A medida da carga ocorre de forma indireta, com a aplicação de um campo elétrico em

torno dela. As partículas movem-se na presença deste campo elétrico em direção ao eletrodo de carga oposta e, desta forma, o ξ pode ser determinado pela medida da sua velocidade de migração (MALVERN-INSTRUMENTS, 2004). Se as partículas em suspensão apresentarem valores de ξ elevados, tanto positivos ou negativos, elas tenderão a se repelir, não havendo agregação, ou seja, diminuindo consideravelmente a possibilidade de agrupamentos. Assim, normalmente consideram-se estáveis as suspensões que apresentem valores de ξ maiores, em módulo, em torno de 24,5 mV (LIEBERMAN et al., 1988).

5.1.4 ENSAIOS DE ESTABILIDADE

A determinação da estabilidade de uma formulação é fator que decide por quanto tempo as NPs manterão a qualidade inicial e quais modificações podem ocorrer ao longo do tempo. Deste modo, a avaliação da estabilidade é de suma importância para determinar o melhor método de estocagem e seu tempo de armazenamento, sem que ocorra alterações nas estruturas das NPs (WU et al., 2011).

Para o ensaios de estabilidade, as amostras armazenadas: sob refrigeração (6° C) e em temperatura ambiente (25° C), ao abrigo da luz, foram analisadas, quanto ao seu diâmetro, índice de polidispersão e o potencial zeta, nos intervalos de 0 e 60 dias.

5.1.5 ENSAIO DE ESPECTROGRAFIA DE FLUORESCÊNCIA

O ensaio de fluorescência foi realizado utilizando soluções de melatonina livre (20 µg/mL), nanopartículas carregadas (contendo 20 µg/mL MEL) e nanopartículas vazias (com concentração proteica equivalente as nanopartículas carregadas), sendo utilizado tampão PBS (Tampão fosfato-salino) pH 7,4 50 mM nas diluições. Os parâmetros de fluorescência foram descritos por Rehmani, Farhan e Hadi (2016), tendo sido utilizado o comprimento de excitação de 280 nm, e para o comprimento de emissão utilizou-se a faixa de 335 a 500 nm.

5.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise morfológica das NPs contendo MEL e NPs vazias foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG-TESCAN, model Myra® 3 - UFPR). Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi adicionada ao suporte do microscópio (stub) e espalhada de forma uniforme, permanecendo por 6 horas a temperatura ambiente (dentro do dessecador até a completa secagem), e submetida uma voltagem de aceleração de 20 kV.

O MEV é um equipamento que fornece imagens em alta ampliação (até 300.000x) e com uma boa resolução. Seu princípio consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento de tungstênio, no lugar de fótons utilizados em microscópio óptico convencional e com o emprego de uma diferença de potencial, podendo variar de 0,5 a 30 KV. Esta variação de voltagem faz com que ocorra uma variação da aceleração dos elétrons emitidos provocando assim um aquecimento do filamento (BOZZOLA, 1999). A imagem obtida do sinal da varredura eletrônica de uma amostra pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem é resultante de uma ampliação de um sinal obtido entre um feixe eletrônico e a amostra. Como diferentes sinais podem ser emitidos os mais utilizados são os chamados elétrons

secundários e os retroespehados (COHEN, 1977).

Os elétrons retroespehados (“backscattering electron” - BSE), por possuírem uma energia próxima à dos elétrons primários sofreram um espalhamento elástico, por terem uma alta energia e por serem resultantes de uma simples colisão elástica, eles procedem das camadas mais superficiais da amostra. Com isso somente este tipo de elétrons são captados, e as informações de profundidade contidas na imagem serão poucas se comparadas com a profundidade de penetração do feixe (BOYDE, 1978).

5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR)

Os espectros de MEL livre e dos sistemas nanoestruturados foram obtidos no espectrômetro de infravermelho Varian 660 - IR (Departamento de Química da UFPR - DQ/UFPR) e os espectros de todas as amostras foram obtidos a partir de pastilhas de KBr, na região de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e 32 scans, para a identificação do composto utilizado e sua composição.

5.4 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os difratogramas (DRX) da MEL livre, NP vazia e NP carregada, foram obtidos em um difratômetro X-D2 PHASER (Bruker®) (UNICENTRO – Lab. Química), com radiação $K\alpha_1$ de cobre ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). As amostras sólidas foram dispostas em um suporte de vidro e analisadas em uma faixa de ângulo entre 10° e 60° a 30 Kv e 10 mA.

Os materiais em seu estado sólido podem revelar características cristalinas ou

amorfas, dependendo da sua composição. A análise destas características são de suma importância, já que a cristalinidade influencia consideravelmente a saturação da solubilidade e a velocidade de dissolução no processo de transferência do fármaco.

O DRX pode de fato determinar a presença de fases cristalinas e amorfas, com isso pode-se verificar a estabilidade de determinada molécula frente variações de temperatura, mensurar o tamanho e uniformidade das partículas e avaliar a associação do fármaco ao polímero, sendo que substâncias cristalinas apresentam-se com picos bem definidos e, compostos amorfos não apresentam os mesmos planos nítidos característicos dos cristais. Pode-se assim determinar a encapsulação pela ausência de formas cristalinas na associação de nanopartículas de BSA com MEL (DHIRENDRA et al., 2009).

Em geral, sólidos amorfos são mais solúveis do que as formas cristalinas devido à energia livre envolvida no processo de dissolução. Sólidos amorfos possuem moléculas dispostas aleatoriamente e, portanto, baixo consumo de energia é necessário separá-las. Conseqüentemente, sua taxa de dissolução é mais rápida do que quando na forma de cristal (RIEKES et al., 2011).

5.5 ANÁLISE TÉRMICA TERMOGRAVIMETRIA/TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG)

Para os estudos de termogravimétricos foram pesados aproximadamente 10 mg das amostras (MEL livre, NP vazia e NP carregada), em cadinho de alumina. A análise foi realizada em Calorímetro STD Q600-TA simultâneo DSC/TGA (Instruments®) (UNICENTRO – Lab. Química), sob atmosfera de N₂, com vazão de 100 mL/min com uma rampa de aquecimento de 10° C/min, no intervalo de 25° até 850° C.

5.6 PERFIL DE LIBERAÇÃO EM FLUIDO GÁSTRICO

Para os ensaios de liberação simulada em fluido gástrico foram utilizados simulado estomacal (FGS: contendo 0,02 g de NaCl, 0,032 g de pepsina e 70 µL de HCl, em 10 mL) e simulado intestinal (FIS: contendo 0,068 g KH₂PO₄, 0,77 mL de NaOH 0,2 N e 0,1 g de pancreatinina, em 10 mL).

As NPs contendo com concentração de MEL de 300 µg/mL foram utilizadas para os ensaios de FGS e FIS. Nos ensaios de FGS foram feitos nos seguintes tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, após cada tempo as amostras foram centrifugadas a 250 g por 30 minutos, o sobrenadante foi retirado e armazenado em refrigeração para posterior leitura em HPLC. Para o simulado FIS, os tempos de incubação foram 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos, também foram levados a centrifuga para recuperar o sobrenadante que foi conservado refrigerado até a leitura no HPLC.

5.7 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE SOBRE LINHAGEM DE CÉLULAS VERO

As células Vero são uma linhagem usada em culturas celulares, principalmente para avaliar o perfil citotóxico em células normais. A linhagem 'Vero' provem de células epiteliais renais extraídas de um macaco verde africano (*Chlorocebus* sp.). Ela foi desenvolvida em 27 de março de 1962, por Nakamura e colaboradores, na Universidade Chiba, no Japão. A célula original foi nomeada "Vero" após uma abreviação de verda reno, que significa "rim verde" em esperanto. São utilizadas como modelo para pesquisa pela Organização Mundial da Saúde para a produção de imunobiológicos de uso humano (YOKOMIZO, 2001).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em linhagem de células renais de macaco verde africano, Vero (ATCC CCL-81), cultivadas em garrafas de polipropileno, com meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove, com 10 % de soro

fetal bovino (SFB) e antibióticos penicilina 10 000 U.I. mL⁻¹ e estreptomicina 10 mg mL⁻¹. Estas foram mantidas em estufa a 37° C, 95 % de ar e 5 % de CO₂ gasoso. Todas as manipulações dos materiais foram realizadas em ambiente estéril, em capela de fluxo laminar, e os reagentes esterilizados por temperatura ou filtração com o intuito de evitar contaminação celular.

Após 24 h, removeu-se o meio por aspiração e adicionou-se a monocamada de células PBS (Tampão fosfato-salino), e foram adicionadas diferentes concentrações de MEL livre, NPs com MEL e NPs brancas por 24, 48 e 72 horas. Após esse período de incubação, retirou-se o meio e novamente adicionou-se PBS, contendo 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazolio (MTT). Após 3 h de incubação o meio com MTT, foi removido e avaliou-se a formação dos cristais de formazam, em seguida foi realizada a adição de 50 µL de álcool e 150 µL de uma mistura de PBS com álcool isopropílico na proporção 1:1 v/v. A absorbância proveniente da solução resultante de cada poço foi determinada em leitor de placas em 570 nm.

5.8 ENSAIO SOBRE CÉLULAS VERMELHAS (HEMÁCIAS)

A hemólise (lise das hemácias) *in vivo* pode induzir a anemia, icterícia e outras condições patológicas, por isso, o potencial hemolítico de fármacos administrados para a clínica médica deve ser previamente avaliado (FERRARI, 2005). Dispositivos provenientes de nanotecnologia e carregadores de drogas estão surgindo como alternativas viáveis para fármacos convencionais e a *avaliação in vitro* de sua biocompatibilidade com componentes do sangue é uma parte indispensável do desenvolvimento pré-clínico inicial (MCNEIL, 2005). Devido ao seu tamanho pequeno e suas propriedades físico-químicas únicas, as nanopartículas podem ter interações com os eritrócitos distintas daquelas analisadas com os fármacos convencionais (NIMESH, 2006).

O ensaio foi desenvolvido conforme descrito por Ludwig et al. (2018), com modificações. Coletou-se 5 mL de sangue total de um voluntário saudável, com idade acima de 18 anos, do sexo masculino, através de punção venosa periférica, tendo sido o procedimento realizado na Farmácia Escola da Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), Campus CEDETEG – Guarapuava/PR. Após a coleta, o sangue foi transferido para tubos contendo 10 µL de heparina. Estes foram homogeneizados e centrifugados (5 min., 2500 rpm), sendo retirado o plasma por pipetagem, e substituído por solução tampão PBS 10 mM (salinizado 9 %, pH 7,4) na proporção de plasma que foi retirado, tendo sido realizada a centrifugação e adição de solução tampão três vezes. Avaliou-se a quantidade de hematócrito da amostra, para que esta fosse diluída, e assim obter um volume globular final de 3 %, sendo utilizada solução tampão PBS 10 mM (salinizado 9 %, pH 7,4, 1,08 g/L de glicose, 0,3 g/L de penicilina, e 0,5 g/L de estreptomicina, 4 - 8° C). O ensaio possui parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COMEP) da UNICENTRO (CAAE: 08020818.3.0000.0106), parecer nº: 3231864.

Em microtubos, adicionou-se à solução de hemácias, os compostos (MEL, Nps contendo MEL, NPs vazias). As amostras foram incubadas por 24 horas em incubadora de agitação orbital (37° C, 150 rpm); após o período estabelecido as amostras foram retiradas da incubação e centrifugadas (4° C, 2500 rpm, 5 min.), sendo transferido o sobrenadante para uma microplaca de 96 poços, e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro de microplaca ($\lambda=540$ nm), a fim de verificar a quantidade de hemoglobina liberada das hemácias.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos dos experimentos foram expressos como média \pm DP, obtidos das análises em triplicata. A análise estatística dos dados foi realizada usando ANOVA, com 5 % de significância ($p<0,05$) e para comparar cada formulação foi usado teste de Tukey, ambos os cálculos foram realizados pelo programa OriginPro 8 (Northampton, MA, USA).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE BSA

O princípio da dessolvatação/coacervação é baseado na mudança de solubilidade da BSA em solução (PAIK et al., 2013). É uma técnica muito utilizada na preparação de nanopartículas à base de BSA, sua vantagem é a facilidade de produção (ELZOGHBY, SAMY e ELGINDY, 2012). Como a solubilidade da BSA em água é elevada, isto, favorece a formação de coacervados, quando o etanol é incorporado a solução (PAIK et al.,2013). Ele muda progressivamente a estrutura terciária da proteína, gerando um material cada vez mais hidrofóbico, isto faz com que ocorra a formação de agregados de BSA pela dessolvatação. Por serem considerados instáveis, necessitam serem endurecidos por reticulação.

A reticulação é a formação de ligações estáveis através de ligações covalentes, entre as cadeias polipeptídicas da proteína e as ligações poliméricas do coacervante, formando uma estrutura rígida (FAYAD, 2010). O processo com glutaraldeído é frequentemente utilizado na montagem de nanopartículas a base de proteínas (LI et al.,2008).

A preparação de NPs de BSA por dessolvatação envolveu um procedimento de três etapas: (1) um sistema disperso instável (coacervado) é obtido por adição de um agente de dessolvatação, normalmente etanol ou acetona, a uma solução aquosa da proteína; (2) os coacervados são estabilizados pela formação de ligações cruzadas, através de reações de condensação entre os resíduos de aminoácidos da proteína e um aldeído; (3) as NPs resultantes são purificadas e eventualmente liofilizadas (YEDOMON, 2013; MEZIANI, 2003).

Conforme a tabela 04, a concentração de 8 % v/v de GA, foi a que apresentou melhores características no tamanho e IP, sendo padronizada para a sequência de ensaios.

No ensaio de obtenção de NPs contendo MEL utilizando glutaraldeído a 8%, foi obtida NPs com tamanho médio 205 nm ($\pm 2,2$ nm) e índice de polidispersão de 0,085 ($\pm 0,02$).

Tabela 04. Características do tamanho e o índice de polidispersão das NPs de BSA sem MEL reticuladas com diferentes concentrações de glutaraldeído.

| Amostras NPs de BSA | Concentração de Glutaraldeído (%) | Tamanho Médio (nm) | Índice de Polidispersão |
|---------------------------|---|-----------------------|----------------------------|
| 1 | 5 | 225 \pm 5,7 | 0,254 \pm 0,12 |
| 2 | 8 | 184 \pm 1,4 | 0,094 \pm 0,02 |
| 3 | 10 | 326 \pm 6,3 | 1,04 \pm 0,08 |

6.1.1 DETERMINAÇÃO EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%EE)

Utilizando uma curva de analítica de Mel realizada com o HPLC, obtivemos um R no valor de 0,991983, com o qual determinamos a média de encapsulação da MEL em todos os lotes, no valor médio de 70,5 % ($\pm 3,5$ %).

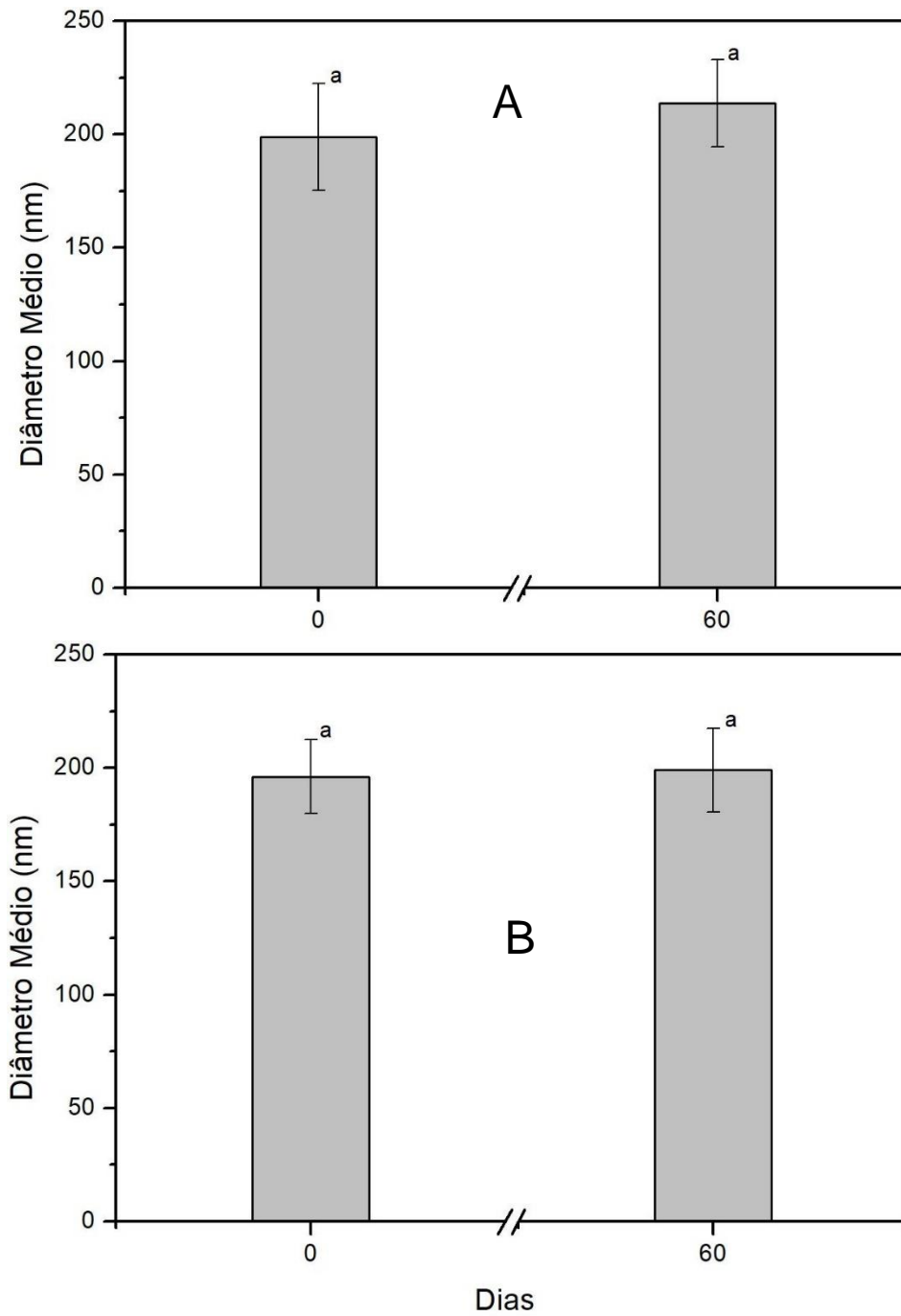
A BSA por ser um polímero utilizado como nanocarreador, apresenta diferentes perfis de %EE, dependendo do composto utilizado. Por exemplo, de 74,76 até 91,01 % para curcumina (JITHAN et al., 2011), de 40,9 % para rodamina B (YU et al., 2014), e de 88,24 % para doxorubicina (ABBASI et al., 2012), dentre outras. Com isso, pode-se perceber que dependendo do composto utilizado a %EE também pode variar bastante, pois isto depende, da afinidade da substância com os sítios aceptores da BSA (BAKER, 2002).

A retenção intermediária de MEL pela NPs, provavelmente ocorreu em virtude da MEL ser uma molécula anfifílica, com isso, pode ter ocorrido que uma parte tenha se ligado na região externa da NPs, soltando-se na ultracentrifugação (COLLIN, 2010).

6.1.2 ESTABILIDADE DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

Para realização deste teste as amostras superconcentradas foram divididas em dois grupos, de formulações idênticas: as refrigeradas e mantidas em temperatura ambiente. Para cada situação experimental as amostras foram testadas em triplicata durante 60 dias. Os diâmetros médios das NPs em temperatura ambiente (25 ° C), se mantiveram dentro de um tamanho médio de 212,02 nm ($\pm 18,14$ nm), as refrigeradas (6 ° C), tiveram um tamanho médio de 210,37 nm ($\pm 17,23$ nm), ao longo do tempo de análise, demonstrando que ambas as NPs de BSA contendo MEL estão dentro dos padrões característicos de suspensões estáveis dentro do tempo analisado, ou seja, tamanho abaixo de 300nm, como mostram as figuras 08 (A e B). Todas as amostras em triplicata foram analisadas com 1, 3, 7, 14, 28 e 60 dias de incubação.

Figura 08. Determinação do diâmetro médio (nm) das amostras de BSA contendo MEL em relação aos dias de incubação, (A) temperatura Ambiente com diâmetro médio de 212,02 nm ($\pm 18,14$ nm), (B) Refrigerada (6° C) com diâmetro médio de 210,37 nm ($\pm 17,23$ nm).



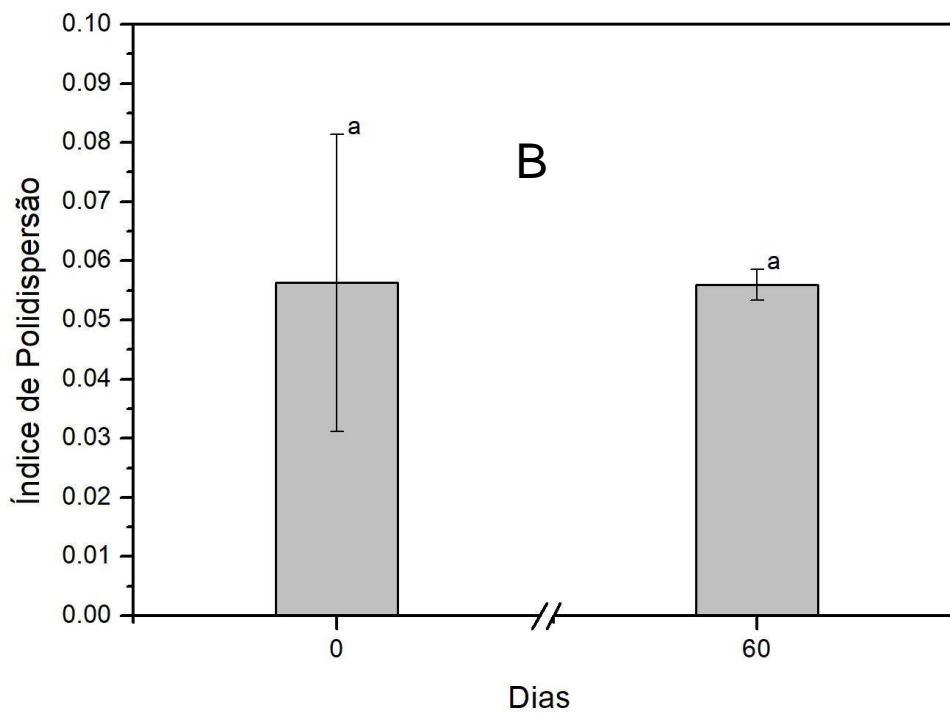
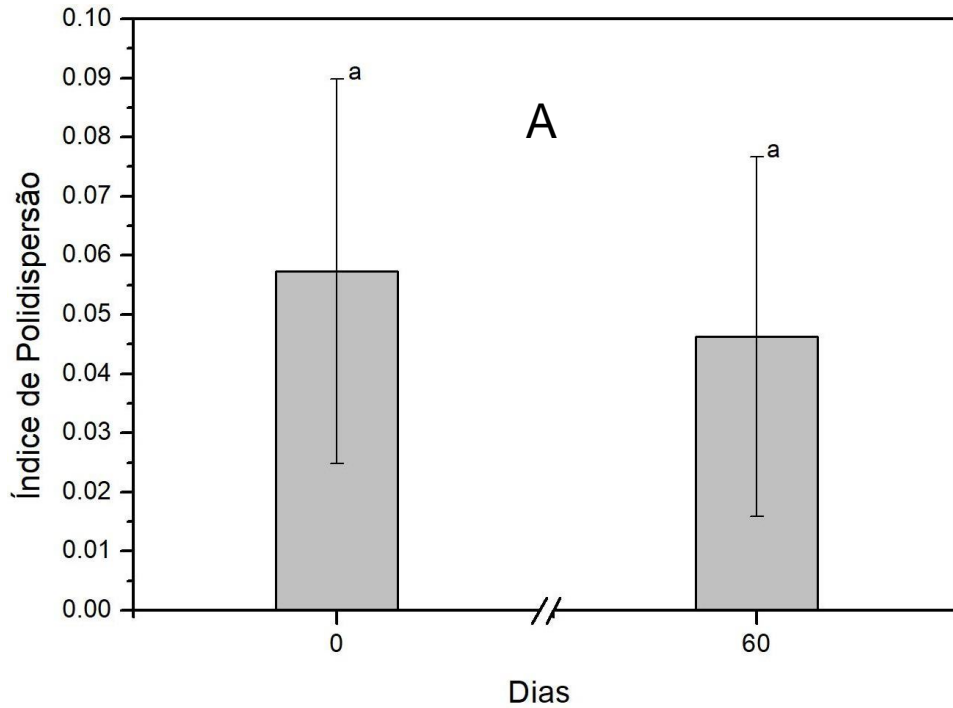
*Letras iguais indicam que não temos diferenças estatísticas significativas a um nível de confiança de 95%, obtidas pelo teste de Tukey.

6.1.3 INDICE DE POLIDISPERSÃO (IP)

Todas as amostras analisadas apresentaram valores abaixo de 0,3 apresentando assim uma distribuição unimodal, com um perfil de distribuição das NPs uniformes, conferindo a presença de uma única família. As NPs em temperatura ambiente a média de polidispersão foi de 0,0635 (\pm 0,0133) e a média das NPs conservadas em geladeira foi de 0,0649 (\pm 0,020), como mostram as figuras 09 (A e B).

O IP fornece as informações sobre a homogeneidade na distribuição dos tamanhos das Nps no sistema coloidal; quando abaixo de 0,3 podemos ter a formação de sistemas monodispersos, podendo representar uma baixa padronização (AVADI, et al., 2010).

Figura 09. Determinação do índice de polidispersão das amostras de BSA contendo MEL em relação aos dias de incubação, (A) NPs em temperatura Ambiente a média foi de 0,0635 (\pm 0,0133), (B) NPs Refrigerada (6° C) com uma média de 0,0649 (\pm 0,020).



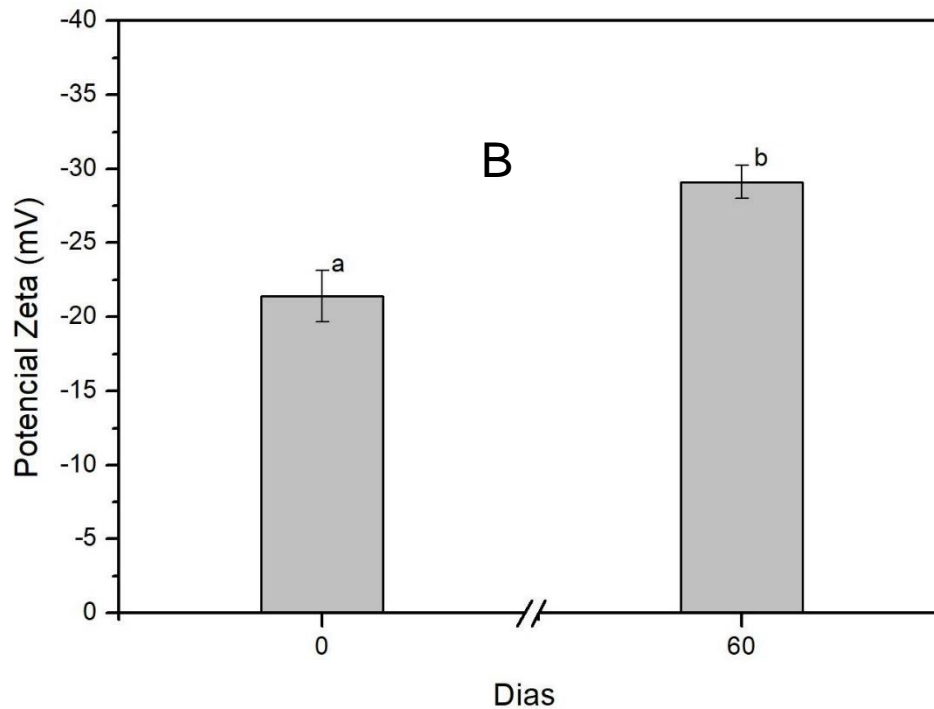
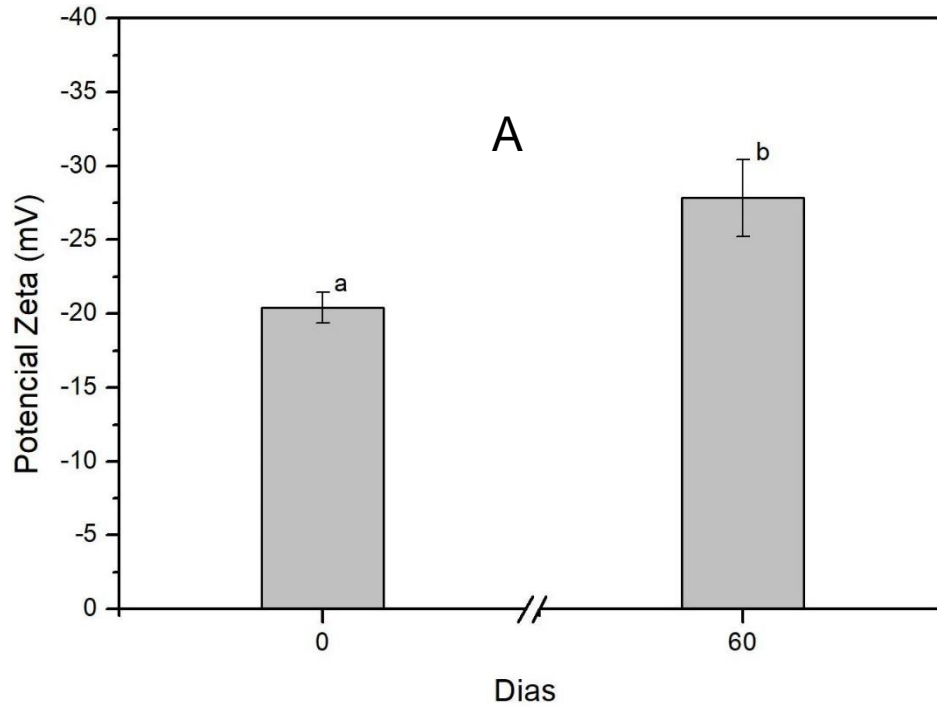
*Letras iguais indicam que não temos diferenças estatísticas significativas a um nível de confiança de 95%, obtidas pelo teste de Tukey.

6.1.4 POTENCIAL ZETA (ξ)

Observou-se que as amostras, apresentaram valores negativos de ξ , característico de sistemas a base de BSA, com uma variação ao longo do tempo, com uma média na temperatura ambiente de $-24,07 \text{ mV}$ ($\pm 2,88 \text{ mV}$) e conservada em refrigeração obteve-se uma média de $-25,31 \text{ mV}$ ($\pm 3,13 \text{ mV}$), caracterizando assim, as NPs como sistemas estáveis, em relação a possíveis agregações. Como mostram as figuras 10 (A e B)

Neste ensaio observamos um pequeno aumento do potencial Zeta durante o tempo de análise, provavelmente correlacionado a uma pequena variação do pH que foi observado, isto ocorreu tanto com as NPs em temperatura ambiente como as NPs conservadas em refrigeração.

Figuras 10. Determinação dos valores do Potencial Zeta em das amostras de NPs de BSA contendo MEL em relação aos dias de incubação, (A) temperatura Ambiente a média foi de $-24,07 \text{ mV} (\pm 2,88 \text{ mV})$, (B) Refrigerada (6°C) a média foi de $-25,31 \text{ mV} (\pm 3,13 \text{ mV})$.

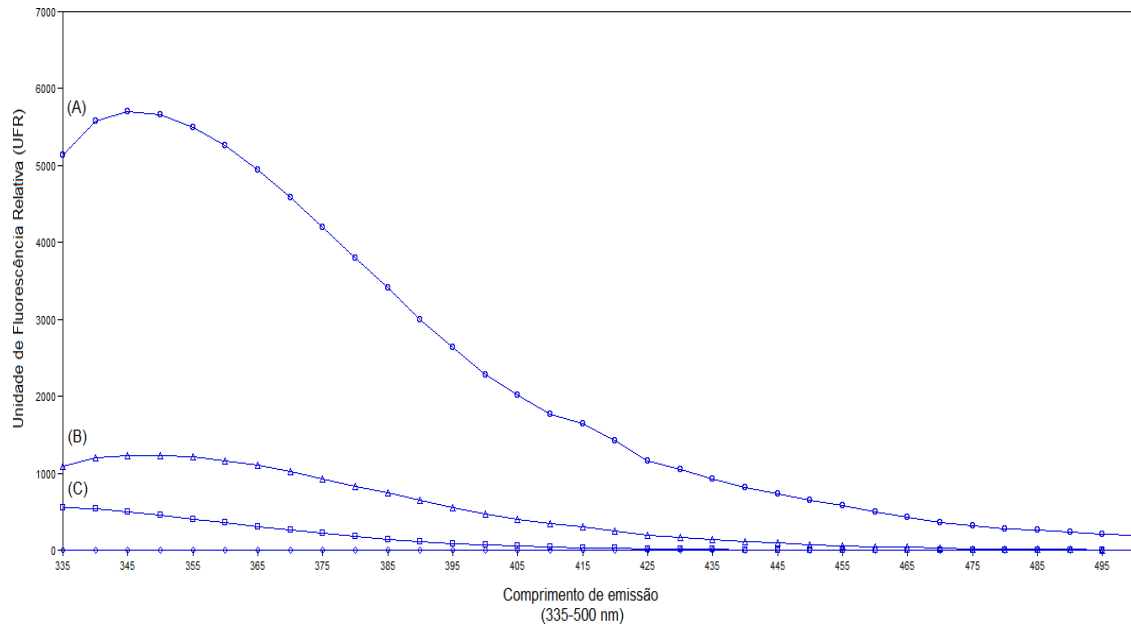


*Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas a um nível de confiança de 95%, obtidas pelo teste de Tukey.

6.1.5 ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA

Na MEL a maioria de suas funções é mediada por dois receptores os MT1 e MT2. A BSA possui sítios homólogos a proteína G onde ocorre as ligações (GPCRs, são uma grande família proteica de receptores transmembranares que captam sinais extracelulares e ativam vias de transdução de sinal no interior da célula) (NASRABADI, 2018). Além da regulação do ritmo circadiano, os receptores melatoninérgicos (MTRs) abrangem inúmeros processos fisiológicos e terapêuticos cuja base molecular subjacente ainda não foi completamente elucidada. Várias técnicas de espectroscopia de fluorescência foram desenvolvidas para estudar diferentes aspectos da farmacologia de MTRs (SAVASKAN, 2002). Como a MEL possui uma porção indol que confere a ela uma fluorescência intrínseca, podemos observar na figura 11, uma maior fluorescência a MEL pura em relação a BSA vazia e na NPs carregadas com MEL com uma concentração de 20 µmg/mL, observa-se um aumento da fluorescência entre 345 a 365 nm, com isso, concluímos que a MEL provavelmente foi incorporada a NPs.

Figura 11. Ensaio de Espectrometria Fluorescência da MEL, (A) Melatonina Livre; (B) Nanopartículas Carregadas; (C) Nanopartículas Vazias.



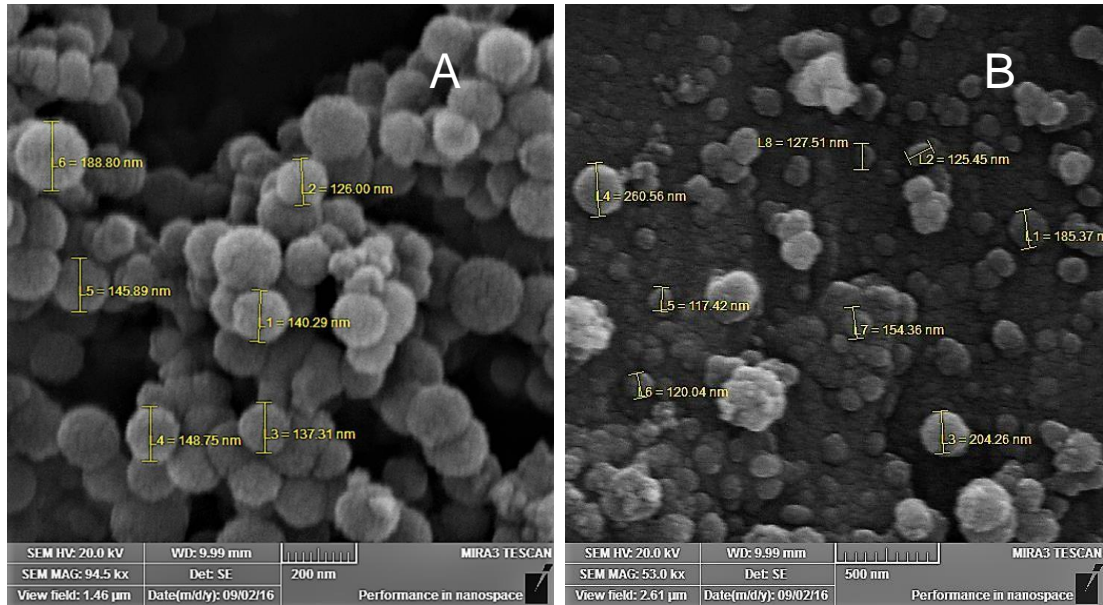
6.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é apropriada para produzir imagens de alta resolução de superfície de uma amostra. Suas imagens possuem uma aparência tridimensional e são relevantes para medir uma estrutura superficial de qualquer tipo de amostra. As amostras precisam estar secas para se obter uma boa imagem, pois a técnica trabalha em vácuo (GOLDSTEIN,1992), portanto todas as amostras foram liofilizadas.

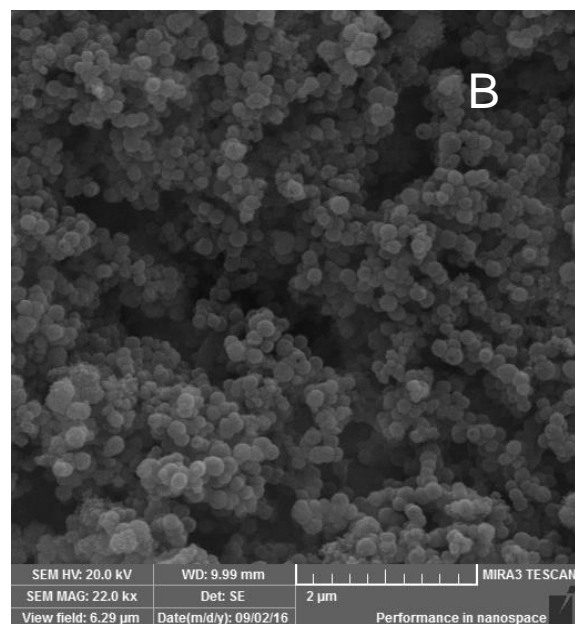
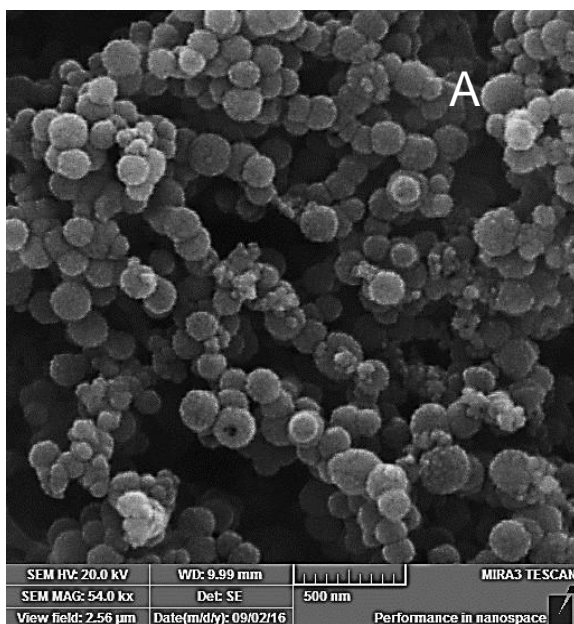
Através das análises de MEV por SE foi possível avaliar a morfologia, bem como o diâmetro médio da NPs. Observou-se que as NPs contendo MEL e NPs livres possuem forma esférica e superfície lisa, características desejáveis para um eficiente sistema nanoestruturado carreador de fármaco. Nas Figuras 12 e 13 são mostradas as micrografias obtidas.

Através do MEV foi possível observar que o diâmetro médio de 147,33 nm para as NPs contendo MEL e para as NPs vazias a média foi de 160 nm, podendo ser comparado ao diâmetro médio obtido pelo aparelho de espelhamento de luz dinâmico (DLS) que foi de 205 ($\pm 2,2$ nm), a diferença apresentada entre as duas análises, foi em relação que as amostras obtidas pelo MEV foram liofilizadas em comparação com as NPs medidas pelo DLS que encontravam-se em suspensão aquosa.

Figuras 12. Microscopia Eletrônica de Varredura com medidas das NPs, (A) NPs de BSA contendo MEL, (B) NPs de BSA vazias.



Figuras 13. Microscopia Eletrônica de Varredura com uma visão geral das nanopartículas obtidas, (A) NPs de BSA vazias, (B) NPs de BSA contendo MEL.



6.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho fundamenta-se no princípio que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, chamadas de níveis vibracionais. O FTIR é um método muito empregado no estudo de nanopartículas por permitir a caracterização dos componentes de suas formulações e sua integridade estrutural após o processo de formulação (BOKOBZA, 1998).

Na Figura 14 estão apresentados os espectros de FTIR da MEL livre, das NPs vazias de BSA e das NPs de BSA carregadas com MEL. Analisando-se o espectro da MEL, podem-se observar as seguintes bandas principais: Tabela 05.

Tabela 05. Espectros de FTIR da MEL livre.

| Bandas principais | Tipo de ligação | Molécula |
|------------------------------|--|----------------------------|
| 3305 e 3280 cm^{-1} | Deformação axial simétrica e assimétrica | N-H (Amida A) |
| 3084 cm^{-1} | Deformação axial | C-H (Aromáticos) |
| 2995 e 2826 cm^{-1} | Deformação axial | C-H (Alifáticos – Amida B) |
| 2050 e 1870 cm^{-1} | Harmônicas ou anéis aromáticos | |
| 1620 cm^{-1} | Deformação axial | C=O (Amida I) |
| 1560 cm^{-1} | Deformação angular | NH (Amida II) |
| 1585 cm^{-1} | Deformação axial | C=C |

| | | |
|------------------------------|--|-------------------------------|
| 1490 cm ⁻¹ | Deformação axial | C-N |
| 1210 e 1040 cm ⁻¹ | Deformação axial simétrica e assimétrica | C-O-C |
| 660 cm ⁻¹ | Deformação angular simétrica | N-H |
| 1100 e 600 cm ⁻¹ | Deformações angulares fora do plano | C-H e C=C (anel aromático) |
| 1100 e 600 cm ⁻¹ | Deformações angulares no plano | C-H |

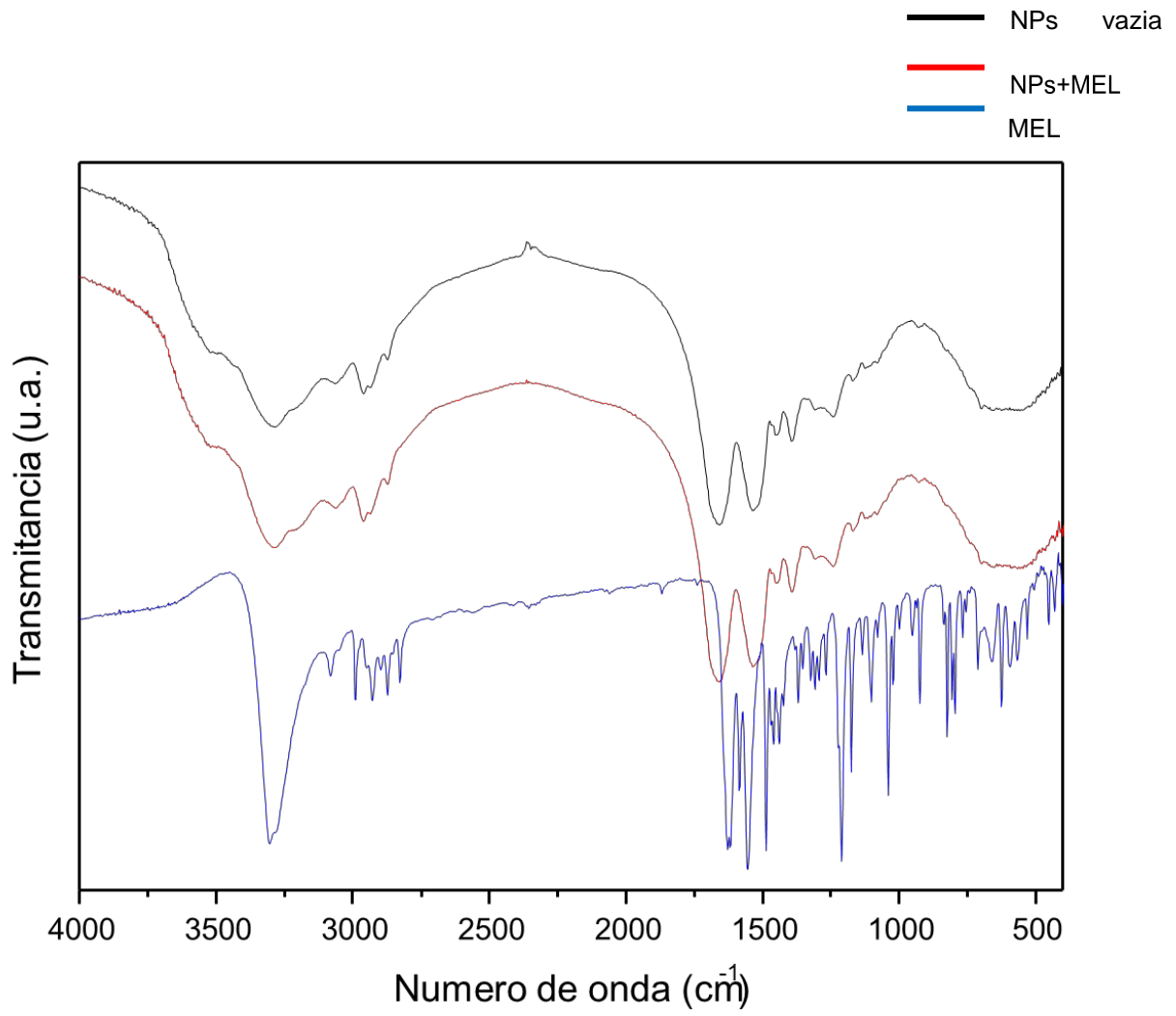
Ao analisar o espectro da NPs vazia de BSA, podem-se observar as seguintes bandas principais como mostram a tabela 06

Tabela 06. Espectros de FTIR da NPS de BSA vazias.

| Bandas principais | Tipo de ligação | Molécula |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| 3300 cm ⁻¹ | Deformação axial | N-H |
| 2900 cm ⁻¹ | Estiramento de ligação | C-H (carbono alifático) |
| 1670 cm ⁻¹ | Deformação axial | C=O (Amida I) |
| 1530 cm ⁻¹ | Harmônicas ou anéis aromáticos | |
| 1450 cm ⁻¹ | Estiramento de ligação | C-N |
| 1250 cm ⁻¹ | Deformação axial | C-O-C |
| 600 cm ⁻¹ | Deformação axial | C-N |

O espectro relativo à nanopartícula de BSA carregada com MEL é muito similar ao da NP vazia, visto que as bandas relativas às absorções das ligações peptídicas da proteína são mais largas, sobrepondo-se àquelas provenientes da MEL. Através da análise de FTIR foi possível verificar que o processo de formação das NPs de BSA-MEL não promove alterações significativas na estrutura química de seus componentes e ainda sugeriu a incorporação da MEL à NPs de BSA.

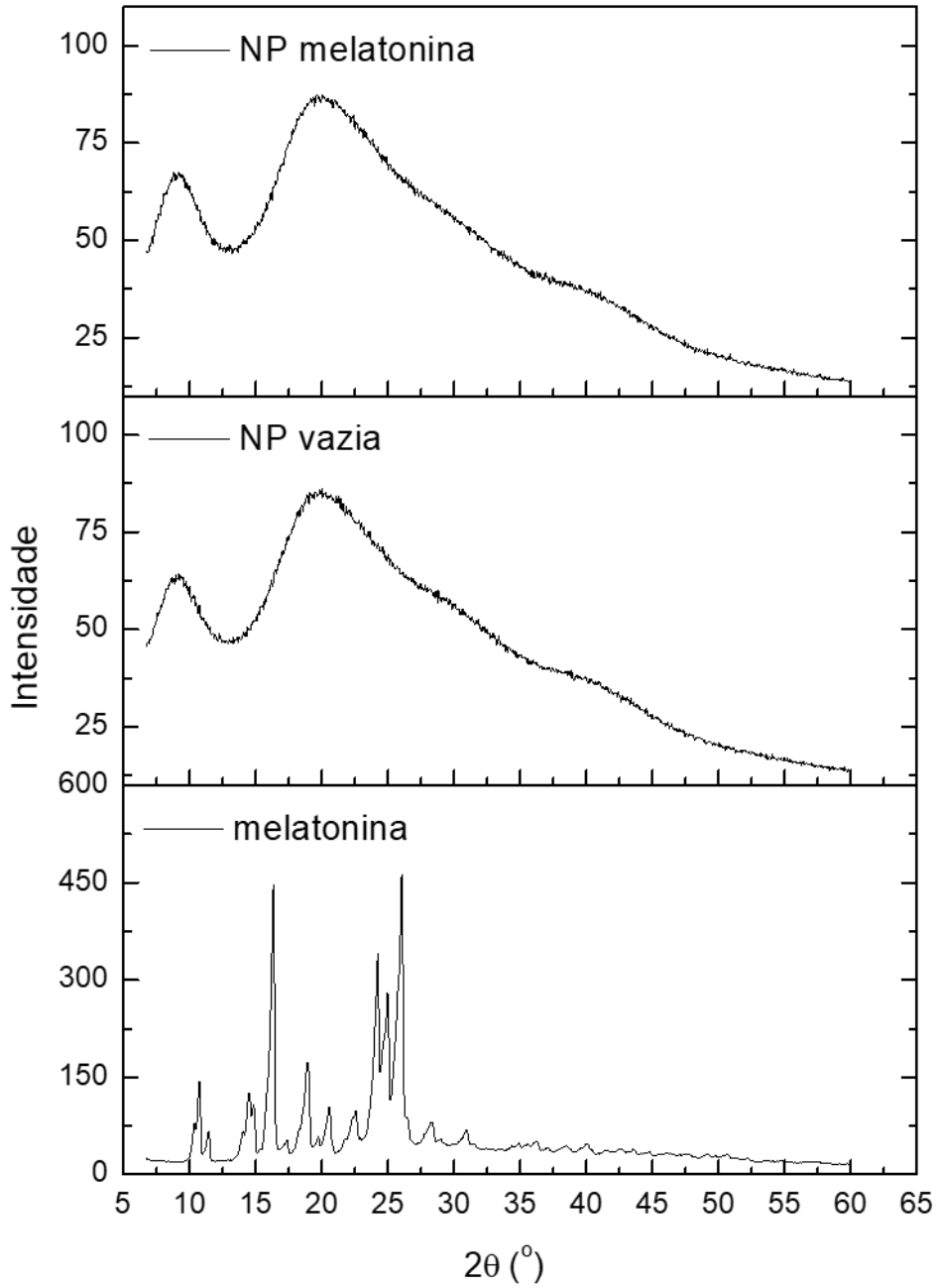
Figura 14. Sobreposição FTIR, NPs vazia de BSA, NPs de BSA com MEL e MEL.



6.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Nos difratogramas obtidos por DRX (Figura 15) pode-se observar uma estrutura altamente cristalina, com picos bem definidos e característicos da MEL livre (MIHAILIASA, 2016). No caso das NPs vazias, pode-se observar uma estrutura bem menos regular, característica de um sistema amorfo. O difratograma relativo às NPs carregadas com MEL é muito similar ao da NP vazia, sem a presença de picos de difração característicos da MEL, indicando que houve alteração da cristalinidade do sistema, o que permitiu a amorfização do fármaco. Essa amorfização é altamente desejável em sistemas de liberação de fármacos, uma vez que drogas com estruturas altamente cristalinas tendem a ser pouco solúveis em meio aquoso, porém, quando se encontram em estado amorfo nota-se um aumento de sua solubilidade, o que reflete na sua absorção e na biodisponibilidade (DHIRENDRA, 2009).

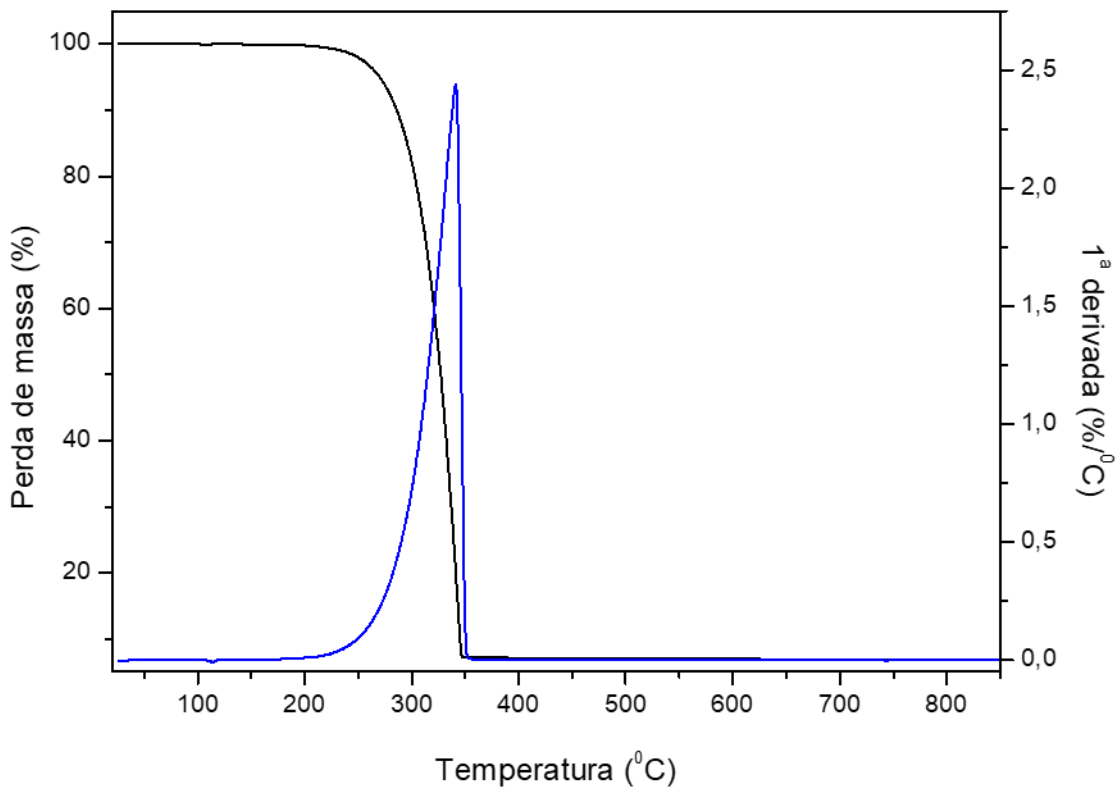
Figura 15. Sobreposição DRX, NPs de BSA com MEL, NPs vazia, e MEL.



6.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

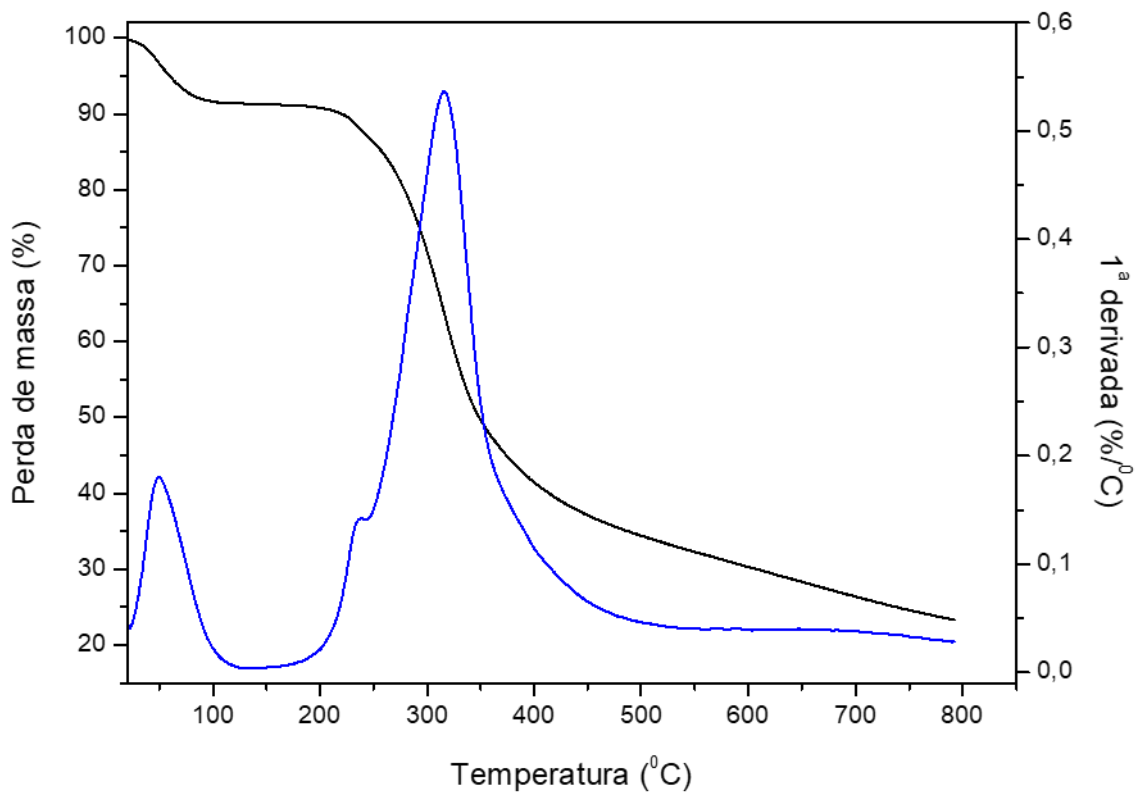
Nas Figuras 16, 17 e 18 são apresentadas as curvas de análise termogravimétrica TG/DTG para a MEL livre, NP de BSA vazias e NP de BSA contendo MEL, respectivamente. A perda de massa observada para a MEL livre ocorre em um único estágio, iniciando-se em aproximadamente 230° C e chegando até 93 % de perda de massa em 350° C. A degradação, em um único estágio, da MEL pode ser confirmada analisando-se a curva de DTG, onde observa-se a presença de um único pico em aproximadamente 340° C.

Figura 16. Curva de (TG/DTG) da MEL livre, com perda de 93% de massa em 350° C.



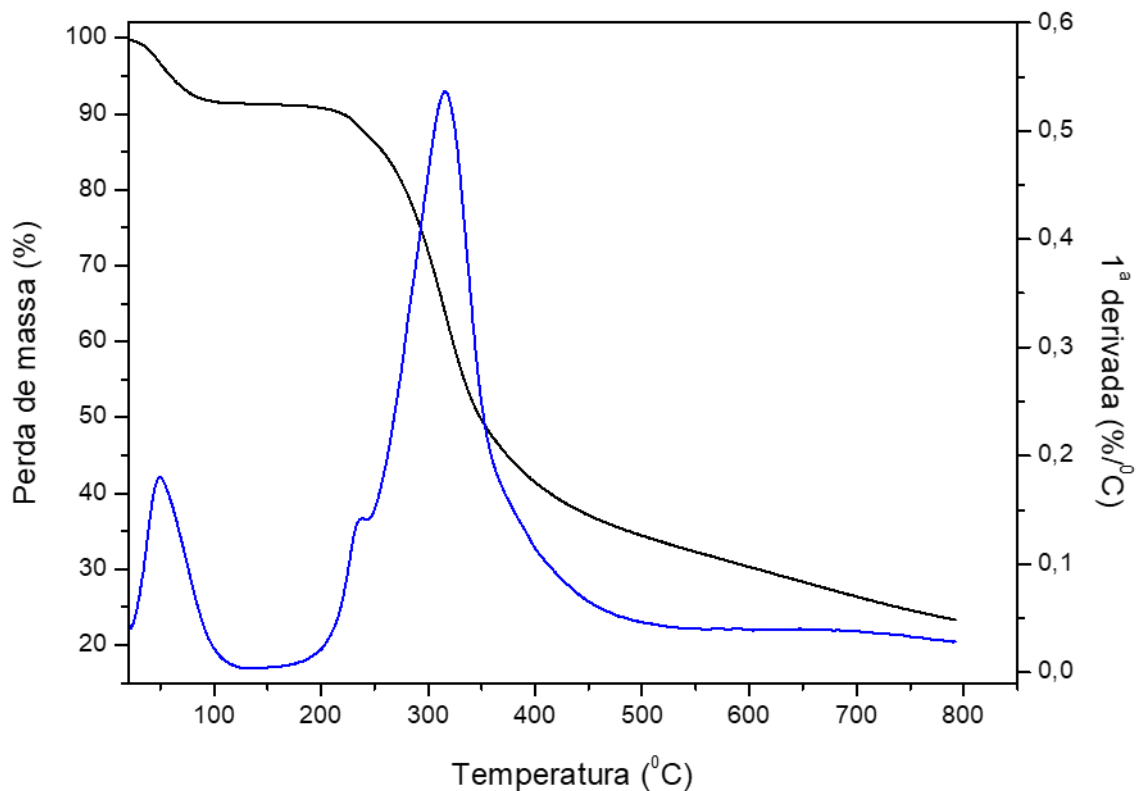
No caso da nanopartícula vazia de BSA, a perda de massa ocorre em dois estágios principais. O primeiro deles em aproximadamente 50° C, correspondente a 8 % de perda de massa, foi atribuído à perda de umidade da amostra. Já o segundo estágio, em aproximadamente 317° C, é relativo à decomposição térmica da BSA, resultando em um total de aproximadamente 70 % de perda de massa na faixa de temperatura analisada.

Figura 17. Curva de (TG/DTG) da NP de BSA vazia com perda de 70% da massa.



No caso das NPs de BSA contendo MEL, são igualmente observados dois estágios principais de perda de massa, sendo o primeiro em aproximadamente 74° C (5 % de perda de massa) relativo à perda de umidade. O segundo estágio pode ser observado em aproximadamente 317° C, correspondendo a um total de 68 % de perda de massa. Esses resultados sugerem um efeito de proteção térmica da BSA à MEL, ocasionada pela encapsulação, visto que não é observado nenhum pico definido em 340° C, temperatura relativa à decomposição da MEL livre, na curva relativa à NP contendo MEL.

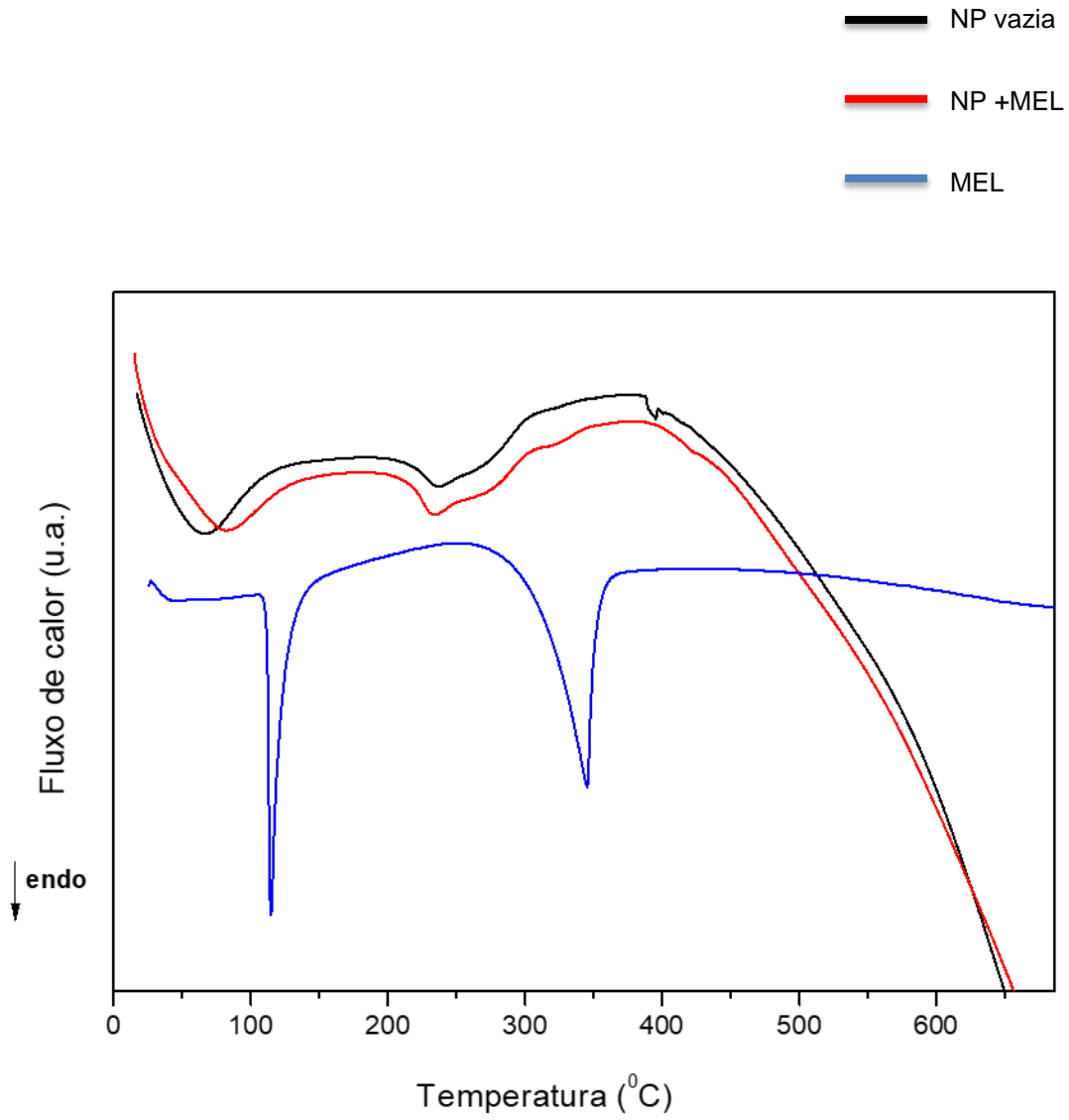
Figura 18. Curva de TG e DTG da NP contendo MEL, com perda de 68 % de massa.



6.6 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Na Figura 19, são apresentadas as curvas de DSC para a MEL livre, para NPs de BSA vazias e NPs de BSA contendo MEL. Analisando-se a curva de DSC da MEL livre, pode-se observar um pico endotérmico estreito e bem definido em aproximadamente 116° C. Este pico é atribuído ao seu ponto de fusão e está de acordo com valores encontrados na literatura (MIHAILIASA, 2016; PANDEY, 2015; MUSUMECIA, 2013). O segundo pico, em 343° C, é relativo à degradação térmica da MEL. Para as NPs vazias de BSA, é observada principalmente a presença de dois picos largos, o primeiro em aproximadamente 63° C, que se refere à desnaturação da proteína e o segundo em aproximadamente 238° C que corresponde à sua decomposição térmica. A curva relativa às NPs de BSA contendo MEL é muito similar àquela obtida para a NP vazia. Observam-se dois picos endotérmicos principais, sendo um deles em aproximadamente 80° C, correspondente à desnaturação da proteína, e o segundo em aproximadamente 235° C, relacionado à decomposição térmica da amostra. Esses resultados estão em concordância com as análises de Raios x (DRX), onde mostra que o sistema nanoestruturado promoveu a amorfização do fármaco, tendo em vista a ausência do pico relativo ao ponto de fusão da droga. Como também temos um deslocamento do pico referente a desnaturação da proteína nas NPS de BSA contendo MEL que pode ser relativo a incorporação da MEL nas de BSA.

Figura 19. Curva de DSC para a NP de BSA vazias, NP de BSA contendo MEL e MEL livre, observa-se um pequeno deslocamento da curva referente as NPs de BSA contendo MEL.



6.7 PERFIL DE LIBERAÇÃO EM FLUIDO GÁSTRICO

Neste trabalho simulou-se dois ambientes em separado, o FGS e FIS, onde, no FGS o meio foi preparado com um pH próximo a 1,2 e no FIS a 6,8. As Nps testadas no FGS, apresentaram uma porcentagem de liberação 1,22 % ($\pm 0,037$ %) em duas horas. No FIS as NPs apresentaram uma porcentagem de liberação de 1,83 % ($\pm 0,0264$ %) em quatro horas. Nos dois sistemas foram utilizadas enzimas proteolíticas, pepsina e Pancreatinina, que estão presentes nos FGS e FIS, respectivamente.

Estes resultados demonstram que as NPs contendo MEL conseguem manter o composto encapsulado, com uma taxa de liberação lenta mas progressiva o que pode aumentar a absorção da MEL por um tempo maior dentro do organismo, como mostra a figura 20.

Devido as suas características físicas e químicas e em virtude de estarem em um sistema de nanoescala, a liberação de medicamentos baseados em NPs estão ultimamente sob extensa pesquisa para o tratamento de diversas doenças como, cardiovasculares, doenças infecciosas, diabetes e câncer (TORCHILIN, 2014; ADISESHIAH, 2016). As NPs do ponto de vista funcional, biodistribuição e internalização são altamente condicionadas as suas propriedades físico-químicas, bem como seu tamanho, forma, química de sua superfície e tipo de composto (DUAN, 2013; ALBANESE, 2012). Biologicamente, as NPs necessitam atravessar ou transpor uma série de barreiras biológicas complexas, incluindo os sistemas de fagócitos mononucleares, pressão do fluido intersticial, internalização celular e bombas de fluxo, antes de exercerem sua capacidade terapêutica (BLANCO, 2015; WILHELM, 2016).

A liberação controlada, significa que os compostos carregados pelas NPs poderão ser liberados de forma prolongada e continua, podendo reduzir significativamente o tempo de administração do fármaco, como também, evitar uma possível toxicidade em relação a outros órgãos (MURA, 2013).

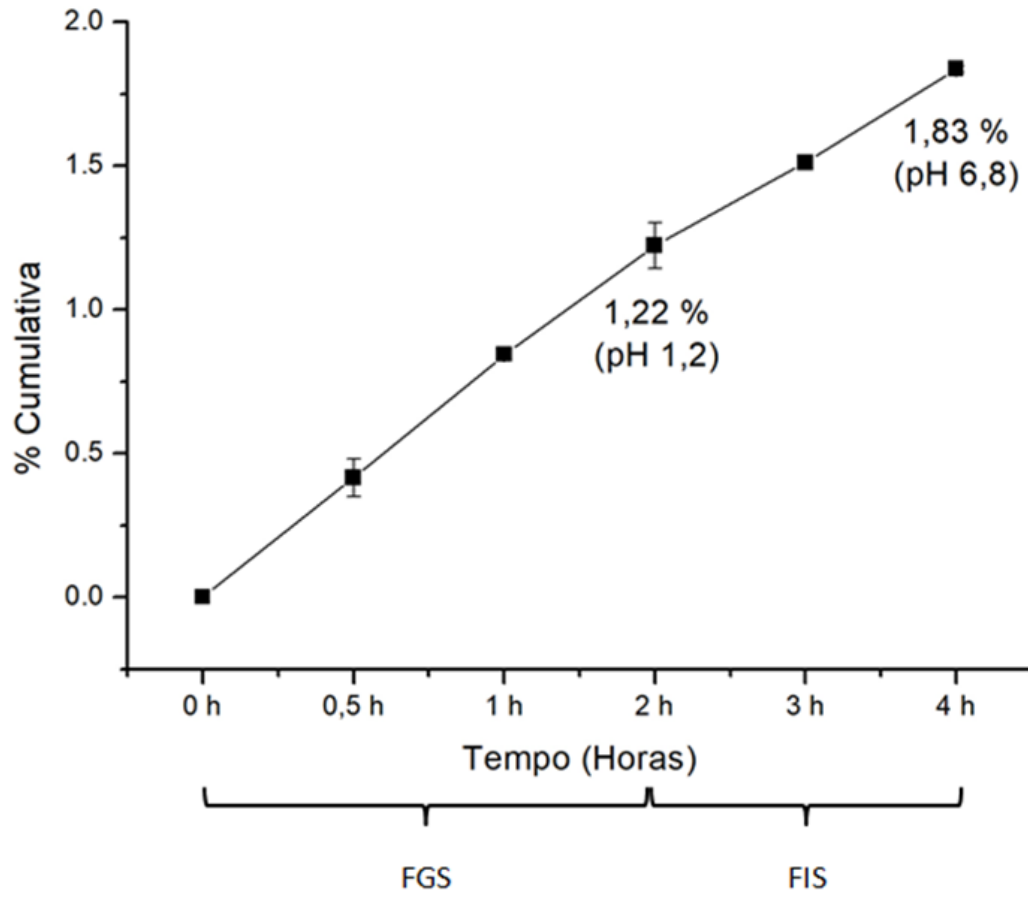
Um dos maiores obstáculos à administração oral de proteínas é o ambiente agressivo encontrado no sistema gastrointestinal, onde, as variações de pH são

extremas, e ainda, temos enzimas digestivas e as forças mecânicas, agindo para decompor os materiais proteicos na digestão (COLLNOT, 2012). O pH altamente ácido no estômago resulta na protonação de proteínas e seu desdobramento, enzimas encontradas tanto no estômago como no intestino delgado clivam proteínas e aminoácidos e pequenos peptídeos (FUHRMANN, 2014). No cólon, temos o processos de fermentação enzimática, que devido a ação microbiana degradam, ainda mais as biomacromoléculas (CHOONARA, et al., 2014). Em virtude das proteínas serem afetadas neste processo, somente uma pequena fração do seu princípio ativo pode manter-se estável a esses procedimentos de degradação, especialmente na presença de alimentos (MÉNARD, 2010).

Reduzir o tamanho dos sistemas de administração de medicamentos para escala micro ou nanométrica pode aumentar o tempo permanência dentro do sistema gastrointestinal, bem como, conseguir ultrapassar a barreira da mucosa intestinal, assim podendo ser levada até a corrente sanguínea (DVORAK, 1980).

Nas últimas duas décadas, a maior parte da investigação da absorção de partículas à base de polímeros, tem-se centrado sobre o epitélio não-absorvente (ou regiões de Peyer) do intestino delgado (JANI, 1989). Partículas pequenas e grandes podem ser absorvidas mais prontamente pelas células M, através de processos endocíticos e fagocíticos (ERMAK, et al., 1995).

Figura 20. Ensaio de liberação em fluido gástrico



6.8 ENSAIOS CITOTOXICOS COM CÉLULAS VERO

Neste estudo demonstrou-se que a MEL e as Nps de BSA contendo MEL, nas concentrações entre 5,0 e 40 µg/mL não alteram o crescimento das células Vero, nem, possivelmente, promovem sua apoptose. Os ensaios foram realizados nos tempos de 24,48, 72 horas (Figuras 21, 22 e 23). Esse resultado demonstra, em um primeiro momento, que os sistemas nanoestruturados NPS de BSA contendo MEL, bem como a MEL livre, não apresentam perfil de citotoxicidade sobre as células Vero no período estudado.

Na figura 21 com o tempo de exposição de 24 horas da MEL nas células Vero não apresentaram nenhuma diferença estatística significativa, demonstrando uma proteção as células Vero.

Na figura 22 com o tempo de exposição de 48 horas da MEL demonstrou que pequenas concentrações tem-se uma pequena variação em relação a lise das células Vero, mas não estatisticamente significativa, que poderia mostrar alguma toxicidade.

Na figura 23 com o tempo de 72 horas de exposição da MEL mostrou-se também que as diferenças em relação ao controle não foram estatisticamente significativas, demonstrando com isso que dentro desta concentração e tempo de exposição a MEL não causa toxicidade as células Vero.

As células Vero também são frequentemente usadas para avaliação da citotoxicidade de biomateriais, detecção de toxinas presentes em solução, teste de eficácia de fármacos e medicamentos e em análise de contaminação por micoplasma (UNCHERN, 1999; ALVES et al., 2008).

Figura 21. Ensaio sobre células Vero: NPs com MEL (A), MEL livre (B) com 24h de incubação.

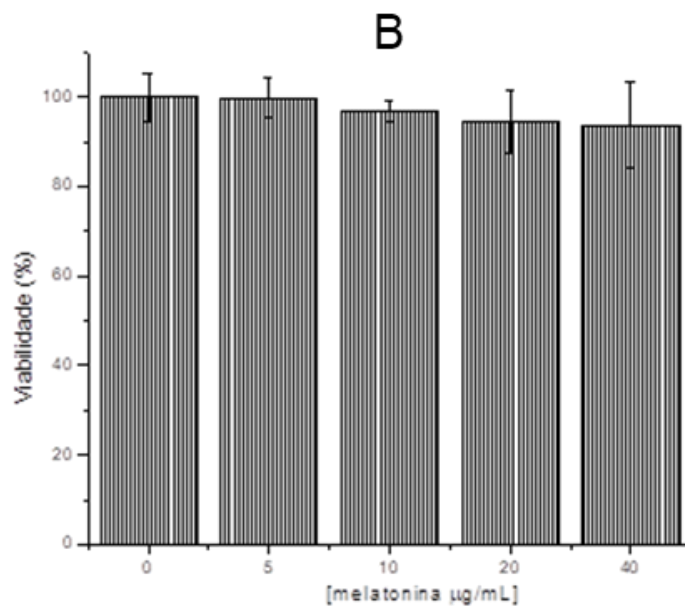
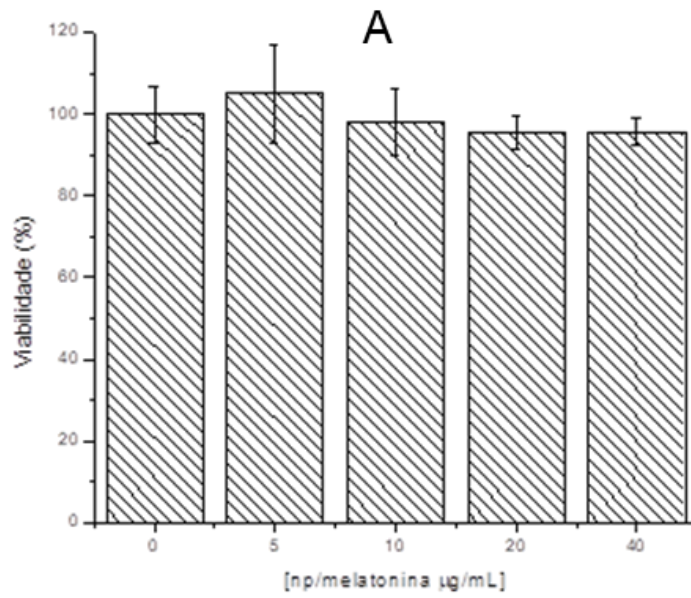


Figura 22. Ensaio sobre células Vero: NPs de BSA contendo MEL (A), MEL livre (B) com 48h de incubação.

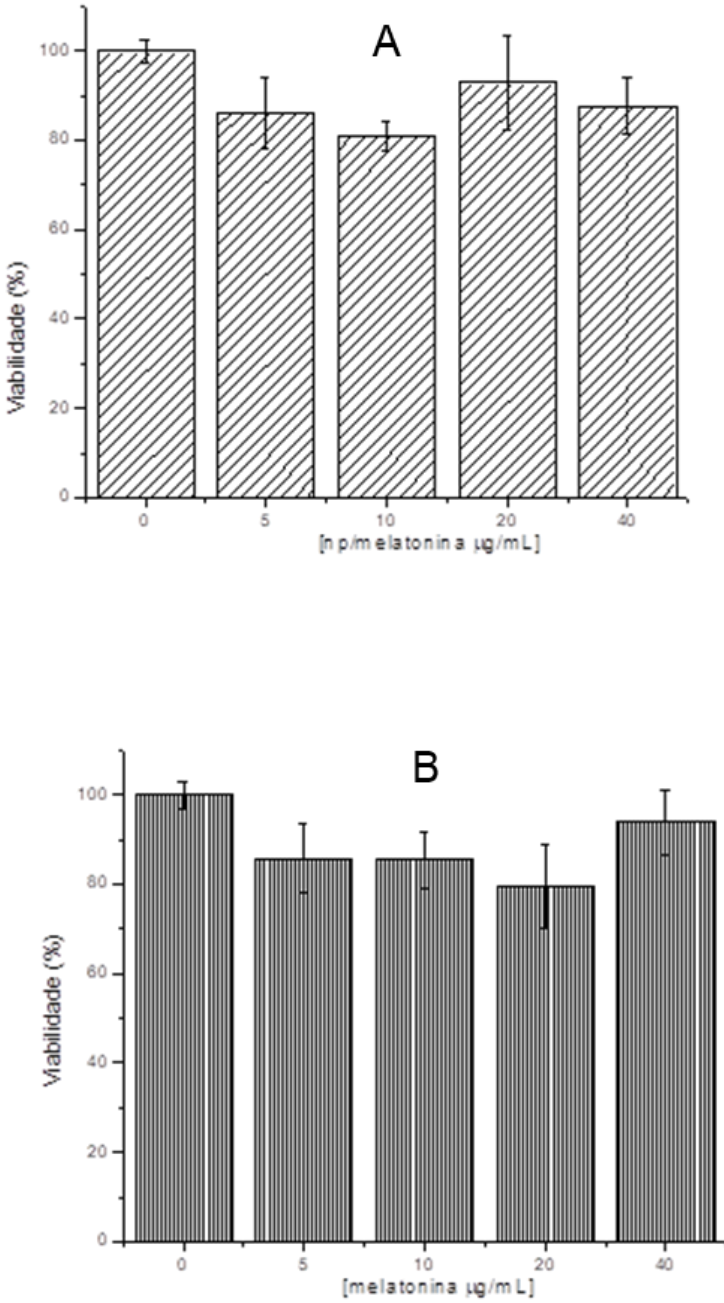
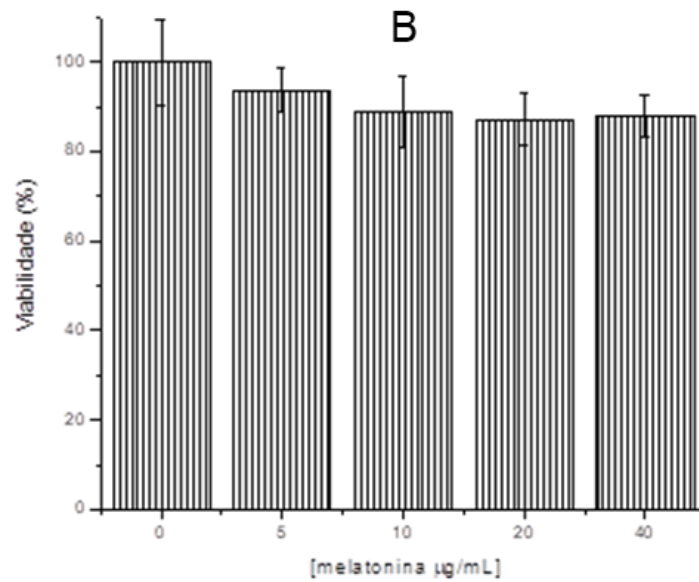
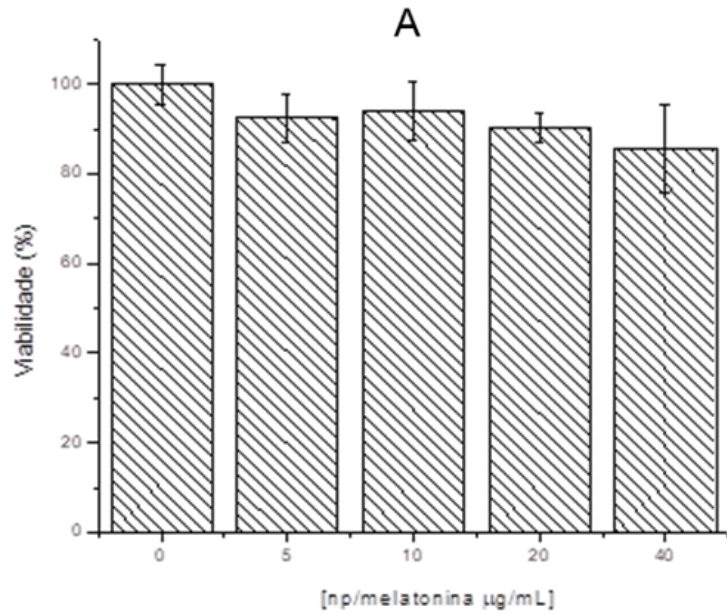


Figura 23. Ensaio sobre células Vero: NPs de BSA contendo MEL (A), MEL livre (B) com 72h de incubação.



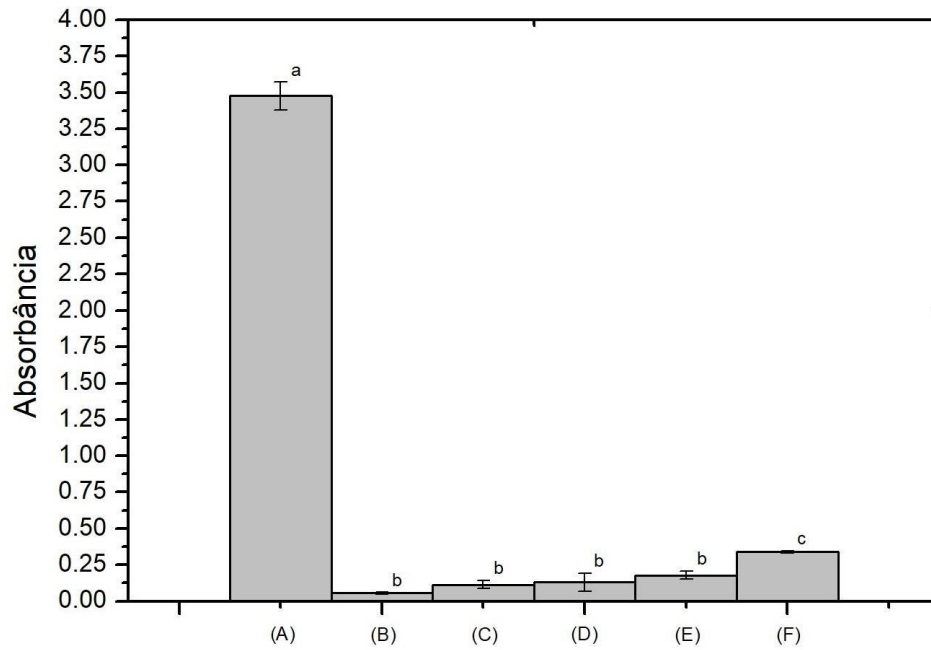
6.9 ENSAIOS COM CÉLULAS VERMELHAS

Este estudo teve o objetivo de avaliar o percentual de hemólise que poderia ocorrer com as NPS com MEL em relação ao controle positivo (A), (hemácias diluídas em água destilada) e controle negativo feito com tampão (B), como demonstrado na figura 24. Aqui pode-se perceber que as NPs de MEL não provocaram a hemólise, em virtude de a MEL estar presente em determinados períodos na corrente sanguínea, tanto como as próprias NPs de BSA brancas provocam um mínimo de danos por lise nas hemácias em consequência de ser praticamente homóloga a BSA humana.

Neste estudo, avaliou-se o perfil citotóxico sobre hemácias, através da liberação de hemoglobina, devido a possível alteração no citoplasma. Conforme apresentado na figura 24, o controle negativo (B, apenas hemácias a 3%), nanopartículas contendo MEL (E, 50µg/mL), MEL (D, 50mg/mL) e controle etanol (C), apresentaram baixa liberação de hemoglobina, após 24 horas de incubação, demonstrado baixo perfil de citotoxicidade sobre a membrana plasmática dessas células. As nanopartículas vazias (F) apresentaram um pequeno aumento na taxa de liberação da hemoglobina, significativamente diferente do controle negativo (B), podendo ser em razão da nanoescala das BSA. O ensaio utilizando água destilada (A, 100% de hemólise) apresentou alta liberação de hemoglobina, com absorvância em 540nm próximo a 3,5 A.

Estudos tem demonstrado que alguns nanomateriais amorfos, tais como NPs de prata tem causado a lise de hemácias, limitando assim a sua rápida aplicação em ensaios em humanos (KIM, et al., 2008). Outros estudos mostram que as nanopartículas de fosfato tricálcico e hidroxapatita, altamente empregadas em diversas aplicações médicas, podem apresentar atividade citotóxica sobre hemácias (HUANG, et al., 2012). Em outro estudo, os efeitos citotóxicos, de nanoparticulados de prata nanométrica com diferentes tamanhos, revelaram altas taxas hemolíticas, nos nanoparticulados de tamanho pequenos, podendo, ter acontecido devido ao acréscimo da liberação de íons de prata, aumento da área de superfície ou interações mecânicas (WEI, et al., 2010). Os autores admitem que uma maior superfície efetiva está relacionada com uma maior liberação de íons de prata (CHOI, et al., 2011)

Figura 24. Ensaio com células vermelhas: 100% hemólise (A), controle tampão (B), controle etanol (C), MEL livre (D), NPs de BSA contendo MEL (E), NPs de BSA vazias (F).



DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A MEL é um composto que tem sido analisado sobre diferentes ensaios biológicos, como antioxidante e antitumoral, e atualmente, para distúrbios do sono. Devido ao seu perfil farmacocinético, há o interesse na obtenção de sistemas nanoestruturados contendo MEL para um possível protótipo de medicamento. Esses sistemas devem ter como características a fácil obtenção e baixo custo, para a viabilização comercial.

Por suas propriedades físico-químicas únicas em nanoescala, os sistemas de liberação de medicamentos baseados em NPs estão atualmente sendo cada vez mais pesquisados para aplicações nos mais diversos tipos de doenças. Enquanto nas formulações convencionais, as concentrações plasmáticas de fármacos são proporcionais à dose administrada, ou seja, administração por períodos longos pode dificultar a manutenção da posologia dentro dos parâmetros terapêuticos, pode resultar em um aumento do risco dos efeitos colaterais adversos (KIM et al.,2009).

Neste trabalho foram desenvolvidos NPs de BSA (uma proteína de baixo custo) contendo MEL, visando uma possível melhor disponibilidade da MEL, em relação ao fármaco livre, com um protocolo com possibilidade de escalonamento.

Utilizando o método de dessolvatação/coacervação, durante as etapas de obtenção, foram encontradas algumas dificuldades em relação a albumina, entre elas, a de manter a estabilidade do sistema durante o processo de agitação (pequenas variações desestabilizam o sistema), também, a velocidade de adição da MEL, que determina variações nos valores de encapsulação média. A concentração de glutaraldeído apresentou importante influência no diâmetro médio e índice de polidispersão.

As nanopartículas obtidas apresentaram diâmetro médio (abaixo de 300 nm), índice de polidispersão (abaixo de 0,3) e potencial zeta (acima de -20 mV) compatíveis com sistemas nanoestruturados utilizados no tratamento para humanos.

As caracterizações físico químicas demonstraram a incorporação e amorfização da MEL no sistema nanoestruturado, características importantes para um

fármaco ser administrado por via oral.

Nos ensaios de fluorescência observou-se que houve encapsulação pela BSA da MEL, devido a acentuada queda do espectro de emissão da MEL em relação as NPs contendo MEL.

O perfil de liberação em fluido gástrico demonstrou baixa liberação da MEL, importante resultado que demonstra a liberação lenta do composto, um dos requisitos para sistemas de liberação controlada.

Nos ensaios sobre células normais, realizado sobre hemácias e células Vero, as nanopartículas não apresentaram perfil citotóxico, uma pré-condição para a continuidade dos estudos para a viabilização de um medicamento.

Os resultados obtidos nesse projeto estão em consonância com alguns resultados e possíveis aplicações da MEL, relatados na literatura.

Elzoghby (2011), demonstrou que a albumina é um interessante composto para o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, para carreamentos de fármacos, devido aos diversos possíveis locais para a interação e sua alta capacidade de modificar sua configuração de torção, com isso resistindo a uma variação de pH do meio onde se encontra.

Nos estudos de Zhang (2014), que desenvolveu NPs de albumina contendo magnetita, preparadas por técnica de microemulsão, observou-se tamanho médio de 238 nm, visualizado pelo MEV, semelhantes ao desenvolvidos nesse projeto.

Sebak (2010), analisou a estabilidade de NPs de albumina contendo noscapine para tratamento de cancer, observando uma estabilidade por mais de 5 dias. Observou-se também uma dependência em relação ao tamanho e potencial Zeta, com valor do pH da solução de noscapina-albumina, sendo, o melhor resultado encontrado em pH 8,2, mas não apresentando esse mesmo perfil quando liofilizadas, devido ao aumento do índice de polidispersão.

A análise das amostras de Nps vazias e com MEL analisadas por FTIR apresentam-se compatíveis com o trabalho de Rohiwal e Pawar (2014), bem como também com o de Dostert et al. (2014), mostrando que as bandas analisadas aqui são semelhantes com os referidos trabalhos. As análises das amostras de MEL estão em

concordância com os trabalhos apresentados por Cione et al. (2011) e Filali et al. (2017), mostrando bandas semelhantes.

As análises de difração de Raios X mostram que as NPs de BSA sem MEL tem características amorfas bem diferentes da amostra de MEL, que são cristalinas. As NPs carregadas com MEL apresentam perfil amorfo, compatíveis com o trabalho apresentado por Chen et al., (2013) que analisou NPs de BSA contendo brucina.

As curvas TG/DTG e DSC demonstraram que as NPs de BSA promoveram uma interação com MEL incorporada nas NPs. Estas análises estão de acordo com os estudos de Csach (2012), em seu trabalho com NPs magnéticas revestidas de BSA, como também com o trabalho de Wiśniewska (2015), quando analisou as propriedades térmicas da BSA e dióxido de silício.

Moravčík (2014), demonstram em seu estudo a capacidade que a MEL tem em proteger as células Vero contra agentes tóxicos, podendo supor que os resultados protetores da MEL podem ter se manifestado através de múltiplos arranjos de proteção, incluindo a preservação de microtúbulos e microfilamentos e por suas interações mútuas, ou seja a MEL não possui citotoxicidade nas células Vero.

Salucci (2014), mostrou por diferentes técnicas experimentais a capacidade da MEL na prevenção da morte celular apoptótica induzida por gatilhos químicos, provavelmente interagindo com o alvo mitocondrial, podendo ser utilizada para diferentes condições fisiopatológicas.

A MEL tem sido comparada, em diversos estudos, aos clássicos antioxidantes vitamínicos e, na maioria desses estudos a MEL apresenta-se mais eficaz, em conter os danos moleculares causados por radicais livres (BAYDAS, 2002; MONTILLA, 2001).

Considerando a baixa toxicidade e o fato de ter sido efetivamente usada para reduzir danos causados por radicais livres, a MEL está sendo utilizada com eficiência como coadjuvante em muitos tratamentos. Por exemplo, na terapia combinada em quimioterapia, em que este hormônio não exerce efeitos sobre as células normais, embora seja, direcionado as células cancerígenas, especialmente em combinação com os agentes quimioterápicos (MIN et al., 2012).

Durante a progressão do câncer, há uma redução na concentração de MEL, possivelmente por causa de uma diminuição de produção da glândula pineal. Quando a MEL é administrada exogenamente, ela pode restaurar ou potencializar seus efeitos favoráveis em células normais, modulando sua ritmicidade. Para poder desempenhar um papel como fármaco, é necessário alcançar as mitocôndrias (SHEN et al., 2017), o que exige doses maiores de MEL e um aumento do tempo de exposição. Quanto mais fácil for sua transposição para as células cancerígenas, teremos uma influência na dosagem de MEL necessária para o uso em terapia de combinação para o câncer. (RODRIGUEZ, et al., 2013). Outro fator importante que pode determinar a dose de melatonina é a idade dos pacientes, na qual pacientes acima de 50 anos experimentam uma redução considerável nos níveis plasmáticos de melatonina (RADIO, DOCTOR e WITT, 2006), com isso, há uma necessidade maior de reposição neste grupo de pacientes.

Com isso, observou-se que as nanopartículas de BSA contendo MEL apresentaram características físico-químicas e perfil de liberação condizentes com o esperado para nanopartículas para aplicação biológica, baixo citotoxicidade sobre células normais, bem como, de fácil obtenção e baixo custo, sendo uma interessante plataforma para aplicação e desenvolvimento industrial.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

- O protocolo de desenvolvimento do sistema nanoestruturado apresentou NPs com tamanho médio de 215,51 nm ($\pm 2,15$ nm), polidispersão média de 0,071 ($\pm 0,006$), e valores de zeta médio de -22,7 mV.
- A formulação de preparação das NPs com MEL mostrou-se estável, dentro do tempo estudado, tanto em temperatura ambiente como em geladeira.
- Pelos ensaios com fluorescência observou-se que a MEL foi incorporada pela NPs de BSA.
- A análise do MEV demonstra a obtenção de NPs esféricas e lisas, formas ideais para absorção pelo organismo.
- As análises de DRX mostram uma amorfização da MEL pela NPs de BSA.
- Os estudos citotoxicidade demonstraram que as NPs de MEL não possuem efeito sobre as células Vero e hemácias.
- Nos ensaios com hemólise temos que a MEL como também as NPs de BSA não causam danos as hemácias.
- Os ensaios de liberação demonstraram que as NPs com MEL possuem uma baixa capacidade de liberação do composto, em FGS e FIS.
- Conforme o exposto as nanopartículas contendo MEL apresentam perfil físico-químico compatível com os sistemas nanoestruturados para aplicação biológica, não apresentam toxicidade nas células analisadas e foi desenvolvido um protocolo de fácil obtenção e baixo custo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ABBASI, S.; PAUL, A.; SHAO, W. Cationic albumin nanoparticles for enhanced drug delivery to treat breast cancer: preparation and in vitro assessment. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p.1-8, 2012.
- ADISESHAIHAH, P. P.; CRIST, R. M.; HOOK, S. S., et al. Nanomedicine strategies to overcome the pathophysiological barriers of pancreatic cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v.13, 750-65, 2016.
- ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, p. 1–16, 2012.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the Cell, Garland Science, **4th edition, New York, 2002.**
- ALEXIS, F.; RHEE, J. W.; RICHIE, J. P.; RADOVIC-MORENO, A. F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urologic Oncology*, **Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 74–85, 2008.
- ALGHAMDI, B. S. The neuroprotective role of melatonin in neurological disorders, **Journal of Neuroscience Research**, Jul, v. 96(7), p. 1136–1149, 2018.
- ALVES, P. M. M.; CARRONDO, M. J. T.; CRUZ, P. E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais, **Editora Roca**, 1^o ed., Cap 1, p. 2-14, 2008.
- ARSHADY, R. Preparation of microspheres and microcapsules by interfacial polycondensation techniques, **Journal of Microcapsule**, v. 6, p. 13–28, 1989.
- AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; MOHAMMADPOUR, N.; et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 58–63, 2010.
- BARTSCH, C.; BARTSCH, H.; JAIN, A. K.; LAUMAS, K. R.; WETTERBERG, L. Urinary melatonin levels in human breast cancer patients, **Journal of Neural Transmission**, v. 52(4), p. 281-294, 1981.
- BAYDAS, G.; CANATAN, H.; TURKOGLU, A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on strep-tozocin-induced diabetes mellitus, **Journal of Pineal Research**, v. 32, p. 225–230, 2002.
- BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care, **Editora Springer-Verlag**, p. 163–169, 2011.
- BENDER, L.; LO, H. S.; LEE, H.; KOKOJAN, V.; PETERSON, V.; BENDER, A. Associations among PH and SH3 domain-containing proteins and Rho-type GTPases in Yeast, **Journal of Cell Biology**, v. 4, p. 879-94, 1996.

- BENOIT, J. P.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J. P.; FESSI, H., PUISIEUX, F.; ROBLOTTREUPEL, L. Carrier" or "modulated distribution" forms, new systems for drug administration, **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 41, p. 319, 1986.
- BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J. E.; SANTANA, C. C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana, **Journal Polymer**, v. 9, p. 163-169, 1999.
- BEYER, C. E.; STEKETEE, J. D.; SAPHIER, D. Antioxidant properties of melatonin - An emerging mystery, **Biochemical Pharmacology**, v.56, p. 1265–1272, 1998.
- BEYER, K. U. Serum proteins as drug carriers of anticancer agents: a review, **Drug Delivery**, v 5, p. 281–99, 1998.
- BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, **Nature Biotechnology**, v. 33 (9), p. 941-51, 2015.
- BLASK, D. E.; HILL, S. M. Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture, **Journal of Neural Transmission, Supplementa**, v. 21, p. 433-449, 1986.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response, **Nature Immunology**, v. 2, p. 907 - 916, 2001.
- BOKOBZA, L. Near Infrared Spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 6, BOLDT, J. Use of albumin: an update, **British Journal of Anesthesia**, v.104, p. 276-284, 2010.
- BRASIL, Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). Desenvolvimento da nanociência e da nanotecnologia. Proposta do Grupo de Trabalho Criado pela Portaria MCT n.º 252 como subsídio ao **Programa de Desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia** do PPA 2004-2007. Brasília: MCT, 2004.
- BRZEZINSKI, A. Melatonin in humans, **The New England journal of medicine**, v. 336, p.186-195, 1997.
- CARTER, D.C.; HO, J. X. Structure of Serum-Albumin, **Advances in Protein Chemistry**, v.45, p. 153-203, 1994.
- CASA, D. M.; KARAM, T. K.; SOARES ALVES A. C.; ZGODA A. A.; KHALIL N. M.; MAINARDES R. M. Bovine Serum Albumin Nanoparticles Containing Amphotericin B: Characterization, Cytotoxicity and In Vitro Antifungal Evaluation, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, V 15, N 12, p. 10183-10188, 2015.
- CHATTOPADHYAY, K. K.; BANERJEE, A. N. Introduction To Nanoscience And Nanotechnology, **PHI Learning**, ISBN-978-81-203-3608-7, 2009.
- CHEN, Z.; CHEN, J.; WU, L.; et al. Hyaluronic acid-coated bovine serum albumin nanoparticles loaded with brucine as selective nanovectors for intra-articular injection. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p. 3843–3853, 2013.

CHOI, J.; REIPA, V.; HITCHINS, V. M.; GOERING, P. L.; MALINAUSKAS, R. A. Physicochemical characterization and in vitro hemolysis evaluation of silver nanoparticles, **Toxicological Sciences**, v. 123, p. 133-143, 2011.

CHOONARA, B. F.; CHOONARA, Y. E.; KUMAR, P.; BIJUKUMAR, D.; TOIT du, L. C.; PILLAY, V. A. Review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules, **Biotechnology Advances**, v.32, p. 1269-1282, 2014. n. 1, p. 3-17, 1998.

CIONE, A. P.; TONHI, E.; SILVA, P. Stability indicating methods, in: Y; Shoyama Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas, **Ed. InTech**, p. 25–36, 2011.

COLLINS, A.; YUAN, L.; KIEFER, T. L.; CHENG, Q.; LAI, L.; HILL, S. M. Overexpression of the MT1 melatonin receptor in MCF-7 human breast cancer cells inhibits mammary tumor formation in nude mice, **Cancer Letters**, v. 189(1), p. 49-57. 2003.

COLLNOT, E. M.; ALI, H.; LEHR, C. M. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa, **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 235-246, 2012.

COON, S. L.; ROSEBOOM, P. H.; BALER, R.; et al. Serotonin Pineal Nacetyltransferase: cloning of expression and molecular analysis, **Science**, v. 270, p. 1681-1683, 1995.

COSTA, J. X. E.; SHIDA, S. C.; BIAGGI, H. M.; ITO, A.; LAMY-FREUND, M. T. How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies, **FEBS Letters**, v. 416, p. 103-106, 1997.

CRUZ-AGUILAR, M. A.; RAMÍREZ-SALADO, I.; CRUZ-ULLO, A. C.; BENÍTEZ-KING, G. Melatonin effects on macro sleep architecture in Alzheimer's disease patients, **Salud Mental**, v. 36, p. 243-249, 2013.

CSACH, K.; JURÍKOVÁ, A.; MIKUF, J.; KONERACKÁ, M.; ZÁVIOVÁ, V.; KUBOVČÍKOVÁ AND M.; KOPCANSKÝ, P. Thermogravimetric Study of the Decomposition of BSA-Coated Magnetic Nanoparticles. **Acta Physica Polonica**, v.121, p. 1293-1295, 2012.

DEKKER, C. Carbon Nanotubes as Molecular Quantum Wires, **Physics Today**, v. 52, p. 22-28, 1999.

DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid Dispersions: A Review, **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 22, p. 234-246, 2009.

DOSTERT, K. H.; O'BRIEN, C. P.; RIEDEL, W.; SAVARA, A.; LIU, W.; MARTIN, O.; TKATCHENKO, A.; SCHAUERMANN, S. Interaction of Isophorone with Pd (111): A Combination of Infrared Reflection–Absorption Spectroscopy, Near-Edge X-ray Absorption Fine Structure, and Density Functional Theory Studies, **Journal of Physical Chemistry**, v. 118, p. 27833–27842, 2014.

DUAN, X.; LI, Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. **Small journal**, v. 9, p. 1521–32. 2013.

DUBEY, S. K.; SHARMA, A. K.; NARAIN, U. O.; MISRA, K.; PATI, U. Design, synthesis and characterization of some bioactive conjugates of curcumin with glycine, glutamic acid, valine and demethylenated piperic acid and study of their antimicrobial and antiproliferative properties, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1837-46, 2008.

DVORAK, A. M.; DICKERSIN, G. R. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. I. Barrier function. Possible changes related to alterations of cell coat, mucous coat, epithelial cells, and Paneth cells, **Human Pathology**, v. 11, p. 561-571, 1980.

EL-NABARAWI, M. Modulation of Tenoxicam release from hydrophilic matrix: modulator membrane versus rate-controlling membrane, **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 1083-7, 2005.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems, **Journal of Controlled Release**, v. 157, p. 168–182, 2012.

EMERSON, T. E. Unique Features of Albumin - a Brief Review, **Critical Care Medicine**, v. 17, p. 690-694, 1989.

EPA, Nanotechnology White Paper, describes why EPA is interested in nanotechnology across its programs, the Agency's statutory mandates, and risk assessment issues specific to nanotechnology across media. <http://www.epa.gov/osa/pdfs/nanotech/epa-nanotechnology-whitepaper-0207.pdf>, acessado em 2017.

ERMAK, T.; DOUGHERTY, E. P.; BHAGAT, H. R.; KABOK, Z.; PAPPO, J. Uptake and transport of copolymer biodegradable microspheres by rabbit Peyer's patch M cells, **Cell and Tissue Research**, v. 279, p. 433-436, 1995.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology: technological platform for biomaterials and biological application of nanostructures, **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, p. 32-53, 2012.

FASANO, M.; CURRY, S.; TERRENO, E.; GALLIANO, M.; FANALI, G.; NARCISO, P.; NOTARI, S.; ASCENZI, P. The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin, **IUBMB Life**, v. 57, p. 787–796, 2005.

FAYAD, S. J. Obtenção de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2010.

FERRARI, M.; DOWNING, G. Shortening Clinical Trials and Regulatory Pathways? **BioDrugs**, v.19, p. 203–210, 2005.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. H.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, 1989.

FEYNMAN, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom, **Engineering and Science**, V. 23, 1960.

FILALI, S.; BERGAMELLI, C.; LAMINE, T. M.; SALMON, D.; LALEYE, D.; DHELENS, C.; DIOUF, E.; PIVOT, C.; PIROT, F. Formulation, stability testing, and analytical characterization of melatonin-based preparation for clinical trial; **Journal of Pharmaceutical Analysis**, p. 237–243, 2017.

FILIPPONI, L.; SUTHERLAND, D. Fundamental concepts in nanoscience and nanotechnologies, **Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO) Aarhus University**, Denmark, 2010.

FREIRE JR, O.; PESSOA JR, O.; BROMBERG, J. L.; ORGS. Teoria Quântica: estudos históricos e implicações culturais, **EDUEPB**; São Paulo, Livraria da Física, p. 456, 2011.

FUHRMANN, G.; LEROUX, J. C. Improving the stability and activity of oral therapeutic enzymes-recent advances and perspectives, **Pharmaceutical Research**, v. 31, p. 1099-1105, 2014

GARCIA-MEDIAVILLA, M. V.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; GONZALEZ PEREZ, P.; et al. Differential contribution of hepatitis C virus NS5A and core proteins to the induction of oxidative and nitrosative stress in human hepatocyte-derived cells, **Journal of Hepatology**, v. 43, p. 606–613, 2005.

GOLDBERG, R. J. A Theory of Antibody Antigen Reactions .1. Theory for Reactions of Multivalent Antigen with Bivalent and Univalent Antibody, **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, p. 5715-5725, 1952.

GOMEZ-ESTACA, J.; ALTSKÄ, A.; STADING, M. Correlation Between Viscoelasticity, Microstructure, and Molecular Properties of Zein and Pennisetin Melts, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 1, p. 2246–2251, 2012.

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.

GUYTON, A.; HALL, J. Chapter 16: The Microcirculation and the Lymphatic System. In Grulow, **Textbook of Medical Physiology 11th ed., Elsevier Inc.**, pp. 187–188, 2006.

HAZRA, M.; DOLAI, T.; GIRI, S.; PATRA, A. Synthesis of biologically active cadmium (II) complex with tridentate N2O donor Schiff Base: DFT study, binding mechanism of serum albumins (bovine, human) and fluorescent nanowires Dey, **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 21, p. 445, 2017.

HIRAYAMA, K.; AKASHI, S.; FURUYA, M.; FUKUHARA, K. Rapid Confirmation and Revision of the Primary Structure of Bovine Serum-Albumin by Esims and Frit-Fab Lc Ms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.173, p. 639-646, 1990.

HOFFMEISTER, C. R.; DURLI, L. T.; SCHAFFAZICK, R. S.; RAFFIN, P. R. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery, **Nanoscale Research Letters**, v. 7, p. 251, 2012.

HU, Y. J.; LIU, Y.; SUN, T. Q.; BAI, A. M.; LÜ, J. Q.; PI, Z. B. Binding of anti-inflammatory drug cromolyn sodium to bovine serum albumin, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.39, p. 280–285, 2006.

HUANG, Z. W.; DING, T. T.; SUN, J. Study of Effect on Cell proliferation and Hemolysis of HAP and TCP Nanometer Particles, **Advanced Materials Research**, v. 378, p. 711-714, 2012.

IGUCHI, H.; KATO, K. I.; IBAYASHI, Y. The melatonin serum levels and rate of metabolic clearance in patients with liver cirrhosis, **Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 54, p. 1025-1027, 1982.

ITO, F.; FUJIMORI, H.; KAWAKAMI, H.; KANAMURA, K.; MAKINO, K. Technique to encapsulate a low molecular weight hydrophilic drug in biodegradable polymer particles in a liquid-liquid system, **Colloids and Surfaces, A**, p. 384, 2011.

JAIN, K. K. Role of nanobiotechnology in developing personalized medicine for câncer, **Technology in Cancer Research & Treatment**, v.4, p. 645–650. 2005a.

JAIN, K. K. The role of nanobiotechnology in drug Discovery, **Drug discovery today**, v. 10, p. 1435–1442, 2005b.

JANI, P.; HALBERT, W.; LANGRIDGE, J.; FLORENCE, A. T. The uptake and translocation of latex nanospheres and microspheres after oral administration to rats, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 41, p. 809-812, 1989.

JITHAN, A. V.; MADHAVI, K.; MADHAVI, M.; et al. Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer, **International Journal of Pharmaceutical Investigation**; v. 1, p. 119–25, 2011.

KARIMI, M.; AVCI, P.; MOBASSERI, R.; et al. The novel albumin–chitosan core–shell nanoparticles for gene delivery: preparation, optimization and cell uptake investigation. *J Nanopart Res.* 2013; 15 (5): 1-14.

KIM, Y. S., KIM, J. S., CHO, H. S., RHA, D. S., KIM, J. M., PARK, J.D., et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats, **Inhalation Toxicology**, v. 20, p. 575-583, 2008.

KIM, S.; KIM, J. H.; JEON, O.; KWON, I. C.; PARK, K. “Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery”. NIH Public Access Author Manuscript, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 420-30, 2009.

KOUCHAKZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S. A.; SHOKRI, F. Efficient loading and entrapment of tamoxifen in human serum albumin based nano-particulate delivery system by a modified desolvation technique, **Chemical Engineering Research and Design at ScienceDirect**, v.92, p. 1681-1692, 2014.

KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles; **Journal of Controlled Release**, v. 132, p. 171–183, 2008.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1–18, 2010.

- LARS, M. I.; JÜRGEN, G. Amyloid- β and tau—A toxic pas de deux in Alzheimer's disease, **Nature Reviews Neuroscience**, v.12, p. 67–72, 2011.
- LI, C.; ZHANG, D.; GUO, H.; HAO, L.; ZHENG, D.; LIU, G.; SHEN, J.; TIAN, X.; ZHANG, Q. Preparation and characterization of galactosylated bovine serum albumin nanoparticles for liver-targeted delivery of oridonin, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, p. 79-86, 2013.
- LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, **Mercel Dekker**, v. 1, 1988.
- LISSONI, P.; BARNI, S.; MEREGALLI, S.; FOSSATI, V.; CAZZANIGA, M.; ESPOSTI, D.; et al. Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone, **British Journal of Cancer**, v. 71, p. 854-856, 1995.
- LUDWIG, D. B.; CAMARGO, L. E. A.; KHALIL, N. M.; AULER, M. E.; MAINARDES, R. M. Antifungal Activity of Chitosan-Coated Poly(lactic-co-glycolic) Acid Nanoparticles Containing Amphotericin, **Mycopathologia**, v. 183, n. 4, p. 659-668, 2018.
- LYNCH, H. J.; WURTMAN, R. J.; MOSKOWITZ, M. A.; ARCHER, M. C.; HO, M. H. Daily rhythm of human urinary melatonina, **Science**, v. 187, 1975.
- MALVERN INSTRUMENTS, **Zetasizer nano series user manual**, 2004.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p.3 75-399, 2002.
- MARTINELLO, T.; AZEVEDO, V. Nanotecnologia em Cosméticos. 2008. **Portal Racine**, 2008.
- MATOS, G. C.; ROZENFELD, S. Avaliação do uso de BSA humana em hospital do Rio de Janeiro, Brasil, **Public Health Reports**, v.21, p. 1224-33, 2005.
- MCNEIL, S. E. Nanotechnology for the biologist, **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, 2005.
- MEDINA, C.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; RADOMSKI, A.; CORRIGAN, O. I.; RADOMSKI, M. W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance, **British Journal of Pharmacology**, v.150, p. 552–558, 2007.
- MEMDUH, K.; BAYRAM, C. M.; FEHMI, O.; AHMET, D.; RECEP, S.; IRFAN, A.; NAMIK, D. Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress, **Experimental Brain Research**, v. 163, p. 406–410, 2005.
- MÉNARD, S.; CERF-BENSUSSAN, N.; HEYMAN, M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens, **Mucosal Immunology**, v. 3, p. 247-259, 2010.

MEZIANI, M. J.; SUN, Y. P. Protein-conjugated nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution into aqueous solution, **Journal of the American Chemical Society**, v.125, p. 8015–8018, 2003.

MIHAILIASA, M.; CALDERAB, F.; LIA, J.; PEILAA, R.; FERRIA, A.; TROTTA, F. Preparation of functionalized cotton fabrics by means of melatonin loaded cyclodextrin nanosponges, **Carbohydrate Polymers**, v. 142, p. 24–30, 2016.

MISAK, H. E.; ASMATULU, R.; GOPU, J. S. Albumin-based nanocomposite spheres for advanced drug delivery systems, **Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 163-170, 2014.

MONTILLA, P.; CRUZ, A.; PADILLO, F.J. Melatonin versus vitamin as a protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats, **Journal of Pineal Research**, v. 31, p. 138–144, 2001.

MORAVČÍK, R., OKULIAROVÁ, M., KOVÁČOVÁ, E., ZEMAN M. Diquat-induced cytotoxicity on Vero and HeLa cell lines: effect of melatonin and dihydromelatonin, **Interdisciplinary Toxicology**, v.7, 2014.

MURA, S.; NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, **Nature Materials**, v. 12, p. 991–1003, 2013.

NASRABADI, N. N.; SARGAZI, F.; SHOKRZADEH, M. Expression of MT1 receptor in patients with gastric adenocarcinoma and its relationship with clinicopathological Features, **Neuro Endocrinology Letters**, v. 39, p. 111-118, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry; **W. H. Freeman and Company**, 3^o Ed.1986.

NIMESH, S.; GOYAL, A.; PAWAR, V.; JAYARAMAN, S.; KUMAR, P.; CHANDRA, R.; SINGH, Y.; GUPTA, K. C. Polyethylenimine nanoparticles as efficient transfecting agents for mammalian cells, **Journal of Controlled Release**, v.10, p. 457-468, 2006.

NISHIYAMA; Drug Discovery Today: Technologies 2, **Ed. Elsevier BV**, p. 21-26, 2005.

PAIK, S. Y. R.; NGUYEN, H. H.; RYU, J.; CHE, J. H.; KANG, T. S.; LEE, J. K.; SONG, C. W.; KO, S. Robust size control of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by intermittent addition of a desolvating agent and the particle formation mechanism. **Food Chemistry**, v. 141, p. 695–701, 2013.

PALUMBO, M.; RUSSO, U.M.; CARDILE, V.; RENIS, H.; PAOLINO, D.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Improved Antioxidant Effect of Idebenone-Loaded Polyethyl-2-Cyanoacrylate Nanocapsules Tested on Human Fibroblasts, **Pharmacological Research**, v. 19, p. 71–78, 2002.

PANDEY, S. K.; HALDAR, C.; VISHWAS, D.K.; MAITI, P. Synthesis and in vitro evaluation of melatonin entrapped PLA nanoparticles: An oxidative stress and T-cell response using golden hamster, **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 103A, p. 3034 – 3044, 2015.

- PARK, S.Y.; LEE, H.U.; PARK, E.S.; LEE, S.C.; LEE, J.W.; JEONG, S.W.; et al. Photoluminescent Green Carbon Nanodots from Food-Waste- Derived Sources: Large-Scale Synthesis, Properties, and Biomedical Applications, **Applied Materials & Interfaces**, v. 6, p. 3365-3370, 2014.
- PATIL, G. V. Biopolymer Albumin for Diagnosis and in Drug Delivery, **Drug Development Research**, v. 58, p. 219–247, 2003.
- PLAPIED, L.; et al. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery, **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 16, p. 228–237, 2011.
- PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J-P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. Polymeric Biomaterials; ed., **Marcel Dekker**, cap. 16, 1994.
- RADIO, N. M.; DOCTOR, J. S.; Witt, P. A. E. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade, **Journal of Pineal Research**, v. 40, p. 332– 342, 2006.
- REITER, R. J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by Melatonina, **Progress in Neurobiology**; v. 56, p. 359-384, 1998.
- REHMANI, N.; FARHAN, M.; HADI, S. M. DNA Binding and its Degradation by the Neurotransmitter Serotonin and its Structural Analogues Melatonin and Tryptophan: Putative Neurotoxic Mechanism, **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, v. 10, 2016.
- REPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; RIVKEES, S. A.; STOPA, E. G. Putative melatonin receptors in a human biological clock, **Science**, v. 242, p. 78-81, 1988.
- RIEKES, M. K.; BARBOZA, F. M.; VECCHIA, D. D.; BOHATCH, M. JR.; FARAGO, P.V.; FERNANDES, D.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. "Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3 hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers, **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 962–968, 2011.
- RODRIGUEZ, A. G.; MAYO, J. C.; HEVIA, D.; QUIROS, I. G.; NAVARRO, M.; SAINZ, R. M. Phenotypic changes caused by melatonin increased sensitivity of prostate cancer cells to cytokine-induced apoptosis, **Journal of Pineal Research**, v. 54, p. 33– 45. 2013.
- ROHIWAL, S. S.; PAWAR, S. H. Synthesis and characterization of bovine serum albumin nanoparticles as drug delivery vehicle, **International Journal of Pharma e Bio Sciences**, v. 5, p. 51-57, 2014.
- SAIJA, A.; TOMAINO, U. M.; TROMBETTA, D.; PELLEGRINO, M. L.; TITA, B.; CARUSO, S.; CASTELLI, F. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity, **European Journal of Pharmaceutics**, v. 53, p. 209–215, 2002.

SAIKIA, C.; GOGOI, P.; MAJI, T. K. Chitosan: A Promising Biopolymer in Drug Delivery Applications, **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, 2015.

SALUCCI, S.; BURATTINI, S.; BATTISTELLI, M.; BALDASSARRI, V.; CURZI, D.; VALMORI, A.; FALCIERI, E. Melatonin Prevents Chemical-Induced Haemopoietic Cell Death, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, 2014.

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*

SARKER, D. K. Engineering of nanoemulsions for drug delivery, **Current Drug Delivery**, p. 297–310, 2005.

SAVASKAN, E.; WIRZ-JUSTICE, A.; OLIVIERI, G.. Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina, **Journal Of Histochemistry And Cytochemistry**, v. 50, p. 519–26, 2002.

SAUER, L.A.; DAUCHY, R.T.; BLASK, D. E. Polyunsaturated fatty acids, melatonin and cancer progression, **Biochemical Pharmacology**, v. 61, p. 1455–1462, 2001.

SEBAK, S.; MIRZAEI, M.; MALHOTRA, M.; KULAMARVA, A.; PRAKASH, S. Human serum albumin nanoparticles as an efficient nospapine drug delivery system for potential use in breast cancer: preparation and in vitro analysis, **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 525-532, 2010.

SHEN, Y. Q.; GUERRA, A. L.; FERNÁNDEZ, B. I. G.; FLORIDO, J.; GARCÍA, S. L.; MARTINEZ, L. R.; ORTEGA, H. A. Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: Suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation, **Journal of Pineal Research**, v. 64, 2017.

SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R., RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices; **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1, 2001

TAN, D. X.; 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**, v. 42, p. 28–42, 2007.

TAN, M. L.; CHOONG, P. F. M.; DASS, C. R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery, **Journal Peptides**, v. 31 n.1, p.184-193, 2010.

TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; CHEN, X.; JING, X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application, **Progress in Polymer Science**, 2011.

TOMA, H. E. Developing nanotechnological strategies for green industrial processes, **International Union of Pure and Applied Chemistry**, n. 85, p. 1655-1669, 2013.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, p. 813-27, 2014.

TURSILLI, R.; CASOLARI, A.; IANNUCELLI, V.; SCALIA, S. Enhancement of melatonin photostability by encapsulation in lipospheres; **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 3, p. 910-4, 2006.

UNCHERN, S. Basic techniques in animal cell culture. In: Drug Delivery System **Workshop**, Bangkok, Thailand, p. 19-20, 1999.

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

WALDHAUSER, F.; WALDHAUSER, M.; LIEBERMAN, H. R.; DENG, M. H.; LYNCH, H. J.; WURTMAN, R. J. Bioavailability of oral melatonin in humans, **Journal of Neuroendocrinology**, v. 39, p. 307-313, 1984.

WARTLICK, H.; MICHAELIS, K.; BALTHASAR, S.; et al. Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells, **Journal of Drug Targeting**, v. 12, p. 461-471, 2004.

WEBER, C.; COESTER, C.; KREUTER, J.; LANGER, K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 194, p. 91–102, 2000.

WEI, H.; DING, T.; SUN, J.; XU, D. Preliminary study of biological evaluation on hydroxyapatite nanoparticles, **3rd International Nanoelectronics Conference (INEC)**, p. 1425-1426. 2010.

WILHELM, S.; TAVARES, A.J.; DAI, Q. Analysis of nanoparticle delivery to tumours, **Nature Reviews Materials**, v.1, 2016.

WIŚNIEWSKA, M.; SZEWCZUK, K.; STERNIK, K. D. Adsorption and thermal properties of the bovine serum albumin–silicon dioxide system, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, Issue 2, p. 1355–1364, 2015.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1257–1272, 2004.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Nanodrug particles and nanoformulations for drug delivery, **Nanotechnology in Drug Delivery**, v. 63, p. 456–69, 2011.

XU, C.; UM, L.; ROES, I.; MIRANDA-NIEVES, D.; NAHRENDORF, M.; ANKRUM, J. A.; ZHAO, W.; KARP, J. M. Nanoparticle-based monitoring of cell therapy, **Nanotechnology**, v. 22, 2011

YEDOMON, B.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C. Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles by desolvation using a membrane contactor: A new tool for large scale production, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 398–405, 2013.

YOKOMIZO, A. Y. Obtenção de antígeno viral a partir de culturas de células vero em microcarregadores porosos. São Paulo, 2001. 99p. (Dissertação de Mestrado) **Universidade de São Paulo**, SP, 2001.

YU, Z.; YU, M.; ZHANG, Z. Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear Nanoscale, **Release Letter**, v. 9, p. 343-50, 2014.

ZAIONCZ, S.; KHALIL, N.; MAINARDES, R. Exploring The Role Of Nanoparticles In Amphotericin B Delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, p. 1-1, 2016.

ZHANG, C.; CAO, J.; Yin, D. Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy, **Applied Radiation and Isotopes**, v. 61, p. 1255 – 9, 2004.

ZHU, Y. Properties of polymeric drug delivery systems prepared by hot-melt extrusion; Tese (Doutorado) **Faculty of the Graduate School of the University of Texas**, Austin, 2002.