

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**NANOCÁPSULAS E NANOESFERAS DE
DISSELENETO DE DIFENILA: SÍNTESE E
DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camila Ferrazza Alves Giordani

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

NANOCÁPSULAS E NANOESFERAS DE DISSELENETO DE DIFENILA: SÍNTESE E DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA

Camila Ferrazza Alves Giordani

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**.

Orientador: Prof. Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**NANOCÁPSULAS E NANOESFERAS DE DISSELENETO DE
DIFENILA: SÍNTESE E DITRIBUIÇÃO BIOLÓGICA**

elaborada por
Camila Ferrazza Alves Giordani

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues, Dr.
(Presidente / Orientador)

Cristiane Luchese, Dra. (UNIFRA)

Luciano Dornelles, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 30 de março de 2012.

AGRADECIMENTO

Ao Jessye, meu amado esposo, pelo carinho, dedicação, paciência, compreensão, amor incondicional, incentivo. Muito obrigada, não tenho palavras para dizer o quanto és importante em minha vida.

Aos meus pais e minha irmã, pelo incentivo, ensinamentos, apoio e dedicação. Muito obrigada por tudo, são muito especiais e importantes para mim.

Aos colegas de laboratório: Diego, Cris, Josimar, Letiére, Carol, Fernanda, Patrícia, Rafael, André, Bruna, Augusto, Elisiane, Mariane, Lucas, Willian, Juliano, Otávio, Vinícius, Renata e Natália pelo apoio, incentivo, ensinamentos e momentos de descontração.

À Isabel e Gabriela pelas análises físico-químicas das formulações.

À professora Dra. Marta pelos conhecimentos passados e pelas importantes sugestões.

À Marina pelo enorme auxílio na realização dos testes bioquímicos e auxílio na elaboração do artigo.

Ao professor Oscar pela oportunidade e orientação neste trabalho, obrigada pelos ensinamentos.

Ao colega Josimar, por me receber no laboratório, pela sua enorme paciência, disponibilidade independente do momento, pelos ensinamentos e conhecimento compartilhado ao longo deste período.

Aos professores Dra. Cristiane Luchese, Dr. Nilda Vargas Barbosa e Dr. Luciano Dornelles pela disponibilidade de fazer a leitura desta dissertação e compor a banca examinadora.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica.

Às agências financiadoras FAPERGS, CNPq e CAPES, pelas bolsas e auxílios concedidos.

**“Comece fazendo o que é necessário,
Depois o que é possível,
E de repente você estará fazendo o impossível.”**

São Francisco de Assis.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

NANOCÁPSULAS E NANOESFERAS DE DISSELENETO DE DIFENILA: SÍNTESE E DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA

AUTORA: Camila Ferrazza Alves Giordani
ORIENTADOR: Prof. Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues
Data e Local da defesa: Santa Maria, 30 de março de 2012.

Nos últimos anos, os compostos orgânicos de selênio têm sido alvos de interesse em síntese orgânica em virtude da descoberta de suas aplicações sintéticas e de suas propriedades farmacológicas. O disseleneto de difenila (PhSe_2) é um composto orgânico de selênio que apresenta diversos efeitos farmacológicos descritos, porém a pouca solubilidade em água e baixa biodisponibilidade oral podem ser um limite para seu uso clínico. Nanopartículas poliméricas vem sendo um importante modelo para o transporte de fármacos, apresentando vantagens como maior biodisponibilidade, direcionamento a sítios específicos e possibilidade de encapsulamento de compostos lipofílicos de maneira bastante eficiente. Tendo em vista a busca pelo desenvolvimento de um sistema de controle da liberação de fármacos, este trabalho teve como objetivo preparar nanoesferas e nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado utilizando diferentes óleos (miglyol, óleo de canola e ômega-3) como núcleo oleoso. As nanocápsulas foram caracterizadas através da medida do pH, tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, taxa de associação e doseamento do $(\text{PhSe})_2$. Os resultados das formulações desenvolvidas apresentaram uma distribuição do tamanho de partícula com um índice de polidispersão de até 0,2; diâmetro médio inferior a 330 nm; o potencial zeta foi superior a -16 mV, onde a taxa de encapsulamento encontrada foi de 99,9% para todas as formulações desenvolvidas. Os ensaios biológicos feitos em camundongos com as nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ contendo óleo de canola como núcleo oleoso mostraram maior biodisponibilidade das nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ em comparação com o $(\text{PhSe})_2$ livre, mostrando uma proeminente influência dos sistemas nanoparticulados nas propriedades biológicas de compostos organocalcogênio.

Palavras chave: Disseleneto de difenila. Nanocápsula. Nanoesfera. Excreção. Distribuição.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post Graduate Course on Biological Sciences:
Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria (RS, Brazil)

DIPHENYL DISELENIDE NANOCAPSULES AND NANOSPHERES: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL DISTRIBUTION

AUTHOR: Camila Ferrazza Alves Giordani
ADVISER: Prof. Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues
Date and Place of defense: Santa Maria, March, 30, 2012.

In last years, selenium organic compounds of selenium have been targets of interest in organic synthesis because of their synthetic application and their pharmacological properties. Diphenyl diselenide (PhSe)₂ is an organic compound of selenium that has several pharmacological effects; however the poor water-solubility and low oral bioavailability can be a limit for its clinical utility. Polymeric nanoparticles has been an important model to carry drugs with advantages such as increase bioavailability, targeting to specific sites and the possibility of encapsulation of lipophilic compounds quite efficiently. In view of the quest for developing a system to control drug release and improve its oral bioavailability, this study aims to prepare nanospheres and nanocapsules of (PhSe)₂ by the interfacial deposition method of preformed polymer cores using different oils (miglyol, canola oil and omega-3) as the oil core. The nanocapsules will be characterized by measuring the pH, mean particle size, polydispersity index, zeta potential, rate of association and determination of (PhSe)₂. By adjusting the process parameters, the results of the optimized formulation showed a size distribution with a polydispersity index of up to 0.2, an average diameter of less than 330 nm, zeta potential was greater at -16 mV, and encapsulation rate efficiency of 99.9 % found for all formulations developed. The biological tests performed in mice with the nanocapsules of (PhSe)₂ containing canola oil as the oil core, showed increased bioavailability of the (PhSe)₂ compared with the (PhSe)₂ free, showing a prominent influence of nanoparticle systems for biological properties of organochalcogenium compounds.

Keywords: Diphenyl diselenide. Nanocapsules. Nanospheres. Excretion. Distribution.

LISTA DE ABREVIATURAS

(PhSe)₂ – Disseleneto de difenila

EHL – Equilíbrio hidrófilo-lipófilo

PEG – Polietilenoglicol

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

PCL – Poli(ε-caprolactona)

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

DNA – Ácido desoxirribonucléico

RBC – Eritrócito

[NCS-(PhSe)₂] – Nanocápsula de disseleneto de difenila

ANOVA – Análise de variância

BHE – Barreira hemato-encefálica

CLAE – Cromatografia de alta eficiência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Sistemas carreadores de fármacos	15
3.2. Vantagens das nanopartículas sobre os fármacos convencionais	18
3.3 Vetorização de fármacos	21
3.3.1. Mudanças no tamanho de partícula	22
3.3.2. Controle das propriedades da superfície da partícula	24
3.3.3. Exemplo de vetORIZADORES	25
3.4. Caracterização físico química	26
3.4.1. Avaliação morfológica	27
3.4.2. Distribuição do tamanho de partícula	29
3.4.3. Potencial zeta	30
3.4.4. pH da suspensão	31
3.5. Polímeros biodegradáveis	32
3.6. Liberação do fármaco	33
3.7. Preparação das nanopartículas	34
3.8. Selênio	37
3.8.1. Disseleneto de difenila	38
4. RESULTADOS	41

4.1. Capítulo 1: Artigo Científico: Nanocápsulas de disseleneto de difenila: Síntese e distribuição biológica	41
4.2. Capítulo 2: Resultados complementares	93
5. DISCUSSÃO	98
5.1. Parâmetros físico-químicos	98
5.2. Avaliação biológica	100
6. CONCLUSÃO	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
8. ANEXOS	108

1. INTRODUÇÃO

Os compostos orgânicos de selênio têm sido amplamente utilizados e pesquisados devido tanto aos seus efeitos farmacológicos e toxicológicos, quanto à aplicação na síntese orgânica. Com relação à toxicidade, os compostos de selênio dependem não somente da forma química e da quantidade consumida deste elemento, mas também de uma gama de outros fatores, como espécie, idade, estado fisiológico, nutrição, interação alimentar e via de administração (NOGUEIRA e ROCHA, 2010).

O selênio apresenta propriedades antioxidantes e desempenha um papel fundamental como componente do centro ativo da glutathione peroxidase e fosfolípido hidropéroxido glutathione peroxidase (NOGUEIRA e ROCHA, 2010). Dentre os organocalcogênios, destaca-se o disseleneto de difenila (PhSe)₂ que é um composto orgânico de selênio e facilmente preparado. Devido a isso, diversos grupos têm estudado suas propriedades tanto farmacológicas quanto toxicológicas, onde os resultados mostram que este se comporta como mimético da glutathione peroxidase em sistemas biológicos (NOGUEIRA E ROCHA, 2010). Adicionalmente, estudos em animais de laboratório mostram propriedades antiinflamatória e antinociceptiva (SAVEGNAGO et al., 2007) e efeito antioxidante em modelos de estresse oxidativo, tais como provocado por cádmio (BORGES et al., 2008) e por atividade física (PRIGOL et al., 2009).

Por ser um composto lipofílico, característica importante para protótipos de sistemas nanoencapsulados e por apresentar diversas propriedades farmacológicas já estudadas, pode-se propor o desenvolvimento de novos sistemas para vetorização e liberação controlada deste composto.

Sabe-se que a tecnologia de liberação controlada de fármacos capazes de otimizar a velocidade de cedência e o regime de dosagem das substâncias tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos anos. As nanoemulsões, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos são exemplos destes sistemas. Com relação a estas formulações, as nanopartículas apresentam vantagens em relação aos lipossomas devido às suas potencialidades terapêuticas, além da maior

estabilidade tanto em fluidos biológicos quanto durante o armazenamento (SOPPIMATH et al., 2001).

As nanopartículas poliméricas incluem nanocápsulas e nanoesferas onde estas diferem segundo sua composição e organização estrutural. As nanocápsulas constituem os sistemas do tipo reservatório onde é possível identificar um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso sendo que o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido ao polímero. Já as nanoesferas são sistemas do tipo matricial e não possuem óleo em sua composição, portanto, não é possível identificar um núcleo diferenciado. Nela o fármaco encontra-se homoganeamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica (BARRAT, 2000; BARRAT, 2003; SCHAFFAZICK et al., 2003; SINGH e LILLARD, 2009; MORA-HUERTAS et al., 2010).

Por serem sistemas nanométricos, estes apresentam elevada área superficial possibilitando uma liberação homogênea e, na maioria das vezes, controlada de fármacos, aumentando a resposta terapêutica no sítio de ação por períodos prolongados. Em razão da vetorização em órgãos, tecidos ou células específicas também apresenta como vantagem a diminuição dos efeitos adversos apresentados pelo fármaco (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As formulações das nanopartículas são obtidas como suspensões coloidais aquosas. Dessa forma, as características e a compreensão do comportamento físico-químico das nanopartículas poliméricas são indispensáveis, pois podem fornecer informações importantes em relação à estabilidade destes compostos levando a um desenvolvimento racional do sistema nanoparticulado desejado (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Fazem parte desta caracterização, a avaliação morfológica, distribuição de tamanho de partícula, distribuição da massa molar do polímero, determinação do potencial zeta e do pH, determinação da quantidade de fármaco associado às nanoestruturas, a cinética de liberação do fármaco e avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Existem diversos métodos para preparação de nanocápsulas. Dentre estes, destaca-se o de deposição interfacial do polímero pré-formado que foi proposto por Fessi e colaboradores em 1988, onde compreende uma fase orgânica composta por um fármaco a ser encapsulado, o tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrófilo-

lipófilo), o óleo e o polímero, solubilizado em solvente miscível em água. Já a fase aquosa é composta por tensoativo hidrofílico e água (MORA-HUERTAS et al, 2010).

A formação das nanocápsulas acontece instantaneamente quando a fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa, através de um funil. As vantagens que este método apresenta são: obtenção de partículas com menor diâmetro, a monodispersão e a ausência de monômeros residuais (MORA-HUERTAS et al, 2010).

Nesse contexto, baseado no exposto acima, almeja-se a preparação e caracterização físico-química de nanocápsulas, utilizando o disseleneto de difenila como substância ativa para poder investigar o potencial farmacológico e toxicológico destes compostos em comparação com sua forma livre.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Com base nas características apresentadas pelos sistemas descritos, os objetivos deste trabalho foram de desenvolver e caracterizar sistemas coloidais (nanocápsulas e nanoesferas) utilizando como substância ativa o disseleneto de difenila. Adicionalmente, foi investigado a distribuição *in vivo* das nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ contendo óleo de canola como núcleo oleoso.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar suspensões poliméricas de nanocápsulas com diferentes núcleos oleosos (óleo de canola, miglyol e ômega-3) contendo $(\text{PhSe})_2$ através do método de deposição interfacial de polímero pré formado;
- Preparar suspensões poliméricas de nanoesferas contendo $(\text{PhSe})_2$ através do método de deposição interfacial de polímero pré formado;
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos das suspensões coloidais de $(\text{PhSe})_2$;
- Determinar e quantificar os níveis de Se no plasma, eritrócitos, fígado, rim, gordura, cérebro, pulmão, urina e fezes em camundongos tratados com nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ contendo óleo de canola como núcleo oleoso;
- Comparar a distribuição e excreção do $(\text{PhSe})_2$ livre e nanoencapsulado (contendo óleo de canola como núcleo oleoso).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sistemas carreadores de fármacos

A constante busca pela utilização de formulações que permitam a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem dos fármacos tem sido um desafio entre pesquisadores e a indústria farmacêutica. A partir disto, destacam-se os carreadores coloidais de fármacos que se apresentam como veículos de interesse tanto para a administração intravenosa de fármacos lipofílicos, como também para administração via oral e cutânea (SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES et al., 2007).

Estes sistemas incluem nanoemulsões, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos. Entretanto, as nanopartículas apresentam vantagens em relação aos lipossomas devido às suas potencialidades terapêuticas, além da maior estabilidade em fluidos biológicos e também, durante o armazenamento (BARRAT, 2000; BARRAT, 2003; SCHAFFAZICK et al., 2003; SOPPIMATH et al., 2001).

As nanoemulsões são sistemas transparentes ou translúcidos e semelhantes às nanocápsulas, porém sem a presença do polímero em sua formulação. (SOLAN et al, 2004).

Estes compostos apresentam como vantagem maior capacidade de solubilização, rápido início de ação, segurança toxicológica e a possibilidade de produção em larga escala (PARVEEN et al, 2011).

Os lipossomas (Figura 1) são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas circundada no núcleo aquoso interno usado para o encapsulamento de drogas, sendo classificados em lipossomas unilamelares e multilamelares. Estes compostos são biodegradáveis e biocompatíveis apresentando outras vantagens como a de encapsular fármacos hidrofílicos no núcleo aquoso e também fármacos lipofílicos ou anfifílicos no interior da bicamada lipídica. Adicionalmente não apresentam significativa toxicidade e não são invasivos (BARRAT, 2003; CUKIERMAN e KHAN, 2010).

Os lipídeos mais utilizados para essas formulações são os que apresentam forma cilíndrica como, por exemplo, fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline que tendem a formar uma bicamada mais estável em solução aquosa (BATISTA et al, 2007).

Os lipossomas apresentam vantagens em relação aos sistemas convencionais por aumentarem a eficácia dos fármacos e reduzirem seus efeitos tóxicos. Atualmente, já existem formulações sendo comercializadas contendo lipossomas para o tratamento de câncer e infecções sistêmicas por fungos (BATISTA et al, 2007). Estudos mostram que lipossomas de aproximadamente 100 nm de diâmetro podem ser ótimos para a entrega de quimioterápicos para tumores (CUKIERMAN e KHAN, 2010).

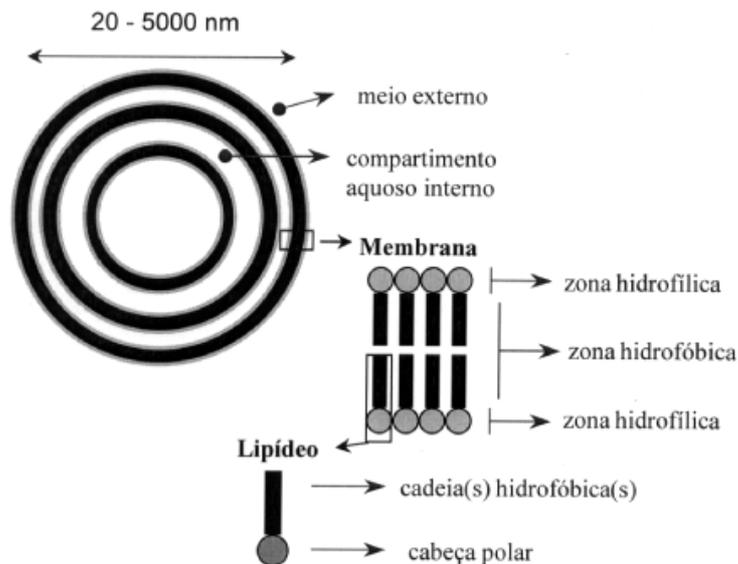


Figura 1 – Exemplo de lipossoma (FRÉZARD et al, 2005).

As nanopartículas poliméricas (Figura 2) incluem nanocápsulas e nanoesferas onde estas diferem segundo sua composição e organização estrutural. As nanocápsulas constituem os sistemas do tipo reservatório onde é possível identificar um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso sendo que o ativo pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido ao polímero. Já a nanoesfera não possui óleo em sua composição, portanto, não é possível identificar um núcleo diferenciado. Nela o fármaco encontra-se homogêaneamente disperso ou solubilizado

no interior da matriz polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS et al., 2010; BARRAT, 2003; SINGH e LILLARD, 2009; BARRAT, 2000; SOPPIMATH et al., 2001).

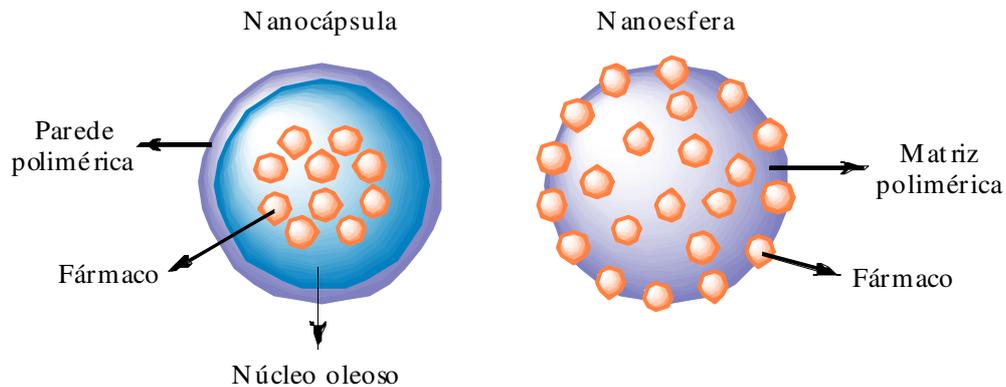


Figura 2 – Desenho comparativo de nanocápsula e nanoesfera.

Os fármacos lipofílicos que tem alguma solubilidade na matriz polimérica ou no núcleo oleoso são mais facilmente incorporados em comparação aos compostos hidrofílicos, embora estes possam ser adsorvidos na superfície da partícula (BARRAT, 2000).

Esses sistemas nanométricos apresentam elevada área superficial possibilitando uma liberação homogênea e, na maioria das vezes, controlada de fármacos, aumentando a resposta terapêutica no sítio de ação por período prolongado. Em razão da vetorização em órgãos, tecidos ou células específicas também apresentam como vantagem a diminuição de efeitos adversos apresentados pelo fármaco (SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES et al., 2007).

As nanopartículas como carreadoras de fármacos apresentam algumas vantagens em relação aos fármacos convencionais principalmente pelo seu pequeno tamanho, que desta forma pode extravasar através do endotélio para os sítios inflamatórios, epitélio, tumor ou penetrar nos microcapilares. Dessa forma, o tamanho nanométrico permite uma eficiente absorção por diversos tipos celulares e um acúmulo seletivo do fármaco no sítio de ação (SINGH e LILLARD, 2009; BARRAT, 2000).

Uma vez acumulado no sítio de ação, nanopartículas hidrofóbicas podem atuar como um depósito local do fármaco dependendo da composição do carreador sendo uma fonte para o fornecimento contínuo de compostos terapêuticos encapsulados no local de ação, como tumores sólidos (SINGH e LILLARD, 2009).

Devido ao seu pequeno tamanho, estudos indicam que as nanopartículas apresentam-se mais versáteis quando comparadas às micropartículas quanto à liberação de fármacos. As microesferas poliméricas com diâmetro maior que 1 μm não podem ser administradas por uma rota geral e devem ser implantadas próximas ao sítio de ação pretendido. Por outro lado, partículas nanométricas são capazes de serem administradas pela via parenteral sendo capazes de liberar o ativo no local de ação distante do ponto da administração (BARRAT, 2003; SINGH e LILLARD, 2009). Outra vantagem é o uso de materiais biodegradáveis durante sua preparação que permitem a liberação sustentada do ativo no local durante dias ou até mesmo semanas (BARRAT, 2003; SINGH e LILLARD, 2009; BARRAT, 2000).

Em razão dos menores capilares do corpo humano estarem entre 5-6 μm de diâmetro, o tamanho das partículas que serão distribuídas na corrente sanguínea devem ser significativamente menor que 5 μm , sem formar agregados, para garantir que as partículas não causem embolismo, apresentando desta forma, outra vantagem no uso dos sistemas nanométricos (SINGH e LILLARD, 2009).

Esses sistemas constituídos de polímeros biodegradáveis são capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias. Também podem melhorar a estabilidade da substância ativa, sendo biocompatível com tecidos e células (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS et al., 2010).

3.2. Vantagens das nanopartículas sobre os fármacos convencionais

De acordo com o exposto anteriormente, as nanopartículas são veículos promissores para a administração de fármacos e também apresentam inúmeras vantagens frente aos fármacos convencionais tanto em relação à estabilidade quanto a melhora da biodisponibilidade (BARRAT, 2003).

O uso de nanocápsulas poliméricas torna-se viável também para a proteção de diferentes sistemas, especialmente para substâncias que degradam em temperaturas acima de 40 °C ou são sensíveis a oxidação por variação de pH, em presença de água ou por efeito de luz ultravioleta. Um exemplo consiste do nanoencapsulamento do ácido lipóico que é uma substância lábil, pouco estável quimicamente – o que dificulta a formulação de um modelo farmacêutico adequado para a administração tanto oral quanto tópica - visando aumentar a estabilidade do referido composto (KÜLKAMP et al., 2009).

Este estudo mostrou que o nanoencapsulamento do ácido lipóico apresentou-se viável com o emprego de poli(ϵ -caprolactona) como polímero. O acompanhamento da estabilidade feito pelo grupo apresentou o efeito protetor que essas nanocápsulas exercem sobre o ativo aumentando sua estabilidade em comparação com formulações de ácido lipóico livre (KÜLKAMP et al., 2009).

Com relação à administração oral, pode-se perceber que o potencial terapêutico dos sistemas coloidais não específicos acontece provavelmente não por direcionar o fármaco diretamente no fluxo sanguíneo, mas aumentando a biodisponibilidade por proteger o mesmo da desnaturação no lúmen gastrointestinal ou através do aumento da concentração do ativo por um período prolongado de tempo diretamente na superfície da membrana mucosa (PONCHEL e IRACHE, 1998).

Para verificar a eficácia *in vivo* destes sistemas nanoparticulados no tratamento da malária, foram preparadas nanocápsulas contendo quinina, poli (ϵ -caprolactona) e polissorbato 80 utilizando *Plasmodium berghei* em ratos Wistar. Os resultados obtidos mostraram que o nanoencapsulamento deste ativo reduziu a dose efetiva cerca de 30%, passando de 105 mg/kg/dia para 75 mg/kg/dia. Além disso, foi verificada a diminuição nos níveis de parasitemia já no primeiro dia de tratamento, ao contrário do fármaco livre que ocorreu apenas no final do tratamento. Segundo os resultados deste trabalho, as nanocápsulas teriam aumentado a concentração do ativo no local de ação diminuindo também a variabilidade intrínseca da farmacocinética (HAAS et al., 2009).

O desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas de metipranolol com base para a administração oftálmica em coelhos apresentou redução da pressão intra-ocular semelhante à observada com o colírio comercial. Estes resultados também mostraram que a bradicardia decorrente da absorção sistêmica de metipranolol é

muito reduzida quando o mesmo é nanoencapsulado. Esta resposta farmacológica pode ser entendida como consequência do contato direto da nanocápsula com o epitélio corneano e também da difusão facilitada através da córnea (LOSA et al, 1992).

Lipossomas e nanopartículas podem ser usadas para concentrar o antibiótico no sítio da infecção. Por exemplo, nanopartículas contendo ampicilina mostraram-se mais efetivas contra *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* que o fármaco livre (BARRAT, 2000 - 2003).

Nanopartículas de indometacina utilizando a poli(ϵ -caprolactona) como polímero mostraram que houve aumento na concentração do fármaco na córnea, humor aquoso e corpo ciliar da íris em comparação com o fármaco livre, mostrando também que este aumento na biodisponibilidade se deve principalmente pela natureza coloidal, ao invés da estrutura interna ou composição destes carreadores (SINHA ET AL., 2004).

Um trabalho desenvolvido por Almeida e colaboradores mostrou que a aplicação de óleos vegetais alternativos na preparação de nanocápsulas e nanoemulsões, tanto para fins farmacêuticos ou cosméticos, é eficaz no encapsulamento de substâncias capazes de sofrer fotodegradação mediante radiação UV, como no caso da benzofenona-3, ativo estudado no trabalho em questão (ALMEIDA ET AL., 2009).

A aplicação de nanopartículas capazes de atravessar a barreira hematoencefálica torna-se extremamente promissora. Elas podem atravessar essa barreira após a abertura das junções oclusivas (SINGH e LILLARD, 2009; SOPPIMATH et al., 2001). Esse transporte pode acontecer vinculando as nanopartículas ao revestimento endotelial interno dos capilares cerebrais, com posterior entrega do fármaco no cérebro por proporcionar um alto gradiente de concentração aumentando a difusão passiva, ou também absorção por fagocitose (SOPPIMATH et al., 2001). Diversos estudos mostraram que a presença do surfactante tween 80 nas nanopartículas possui capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (SINGH e LILLARD, 2009; SOPPIMATH et al., 2001). Sistema de entregas capazes de acumular altas concentrações de fármaco no cérebro pode ser útil no tratamento de tumores cerebrais.

Quando as nanopartículas são administradas por via intravenosa, estas são facilmente reconhecidas pelo sistema imune. Além do tamanho reduzido, a

hidrofobicidade da superfície também determina a quantidade adsorvida pelos componentes sanguíneos, principalmente opsoninas (SOPPIMATH et al., 2001).

Desta forma, carreadores coloidais de fármacos mostram-se úteis para o desenvolvimento de novas formulações, pois podem fornecer proteção contra a degradação nos fluidos biológicos e também promover sua penetração nas células (BARRAT, 2000; MORA-HUERTAS et al, 2010).

3.3. Vetorização de fármacos

A busca por medicamentos capazes de reconhecimento e direcionamento ao sítio específico de ação está cada vez mais próxima com o avanço dos estudos e as pesquisas direcionadas nos nanocarreadores funcionalizados (BARRAT, 2003; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Porém, antes de chegarem local de ação, esses carreadores coloidais devem passar pelas barreiras de defesa do organismo como, por exemplo, o sistema reticulo endotelial. Caso o transportador conseguir passar por estas barreiras, ele pode chegar ao local de ação desejado. Algumas características (Figura 3) dessas partículas como tamanho, forma, superfície química e flexibilidade mecânica influenciam esses processos e no direcionamento destes carreadores (YOO et al, 2011).

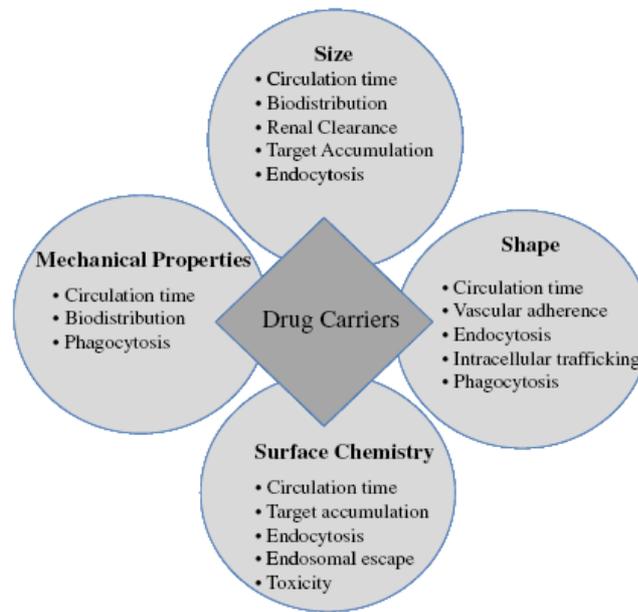


Figura 3- Características que influenciam transporte de fármacos (YOO et al, 2011).

Estudos recentes têm funcionalizado nanocarreadores com diferentes moléculas alvo como peptídeos, proteínas e anticorpos para direcioná-los ao sítio de ação desejado (YOO et al, 2011).

Com relação a estes sistemas, estão incluídos polímeros solúveis covalentemente ligados ao ativo, algumas vezes visando o acoplamento ao fármaco, ao conjugado fármaco-anticorpo como imunotoxinas ou conjugados a outras macromoléculas naturais e pró-fármacos lipofílicos (BARRAT, 2003). Em seguida, iremos apresentar de maneira sucinta alguns estudos relacionados a esta vetorização.

3.3.1. Mudanças no tamanho de partícula

Uma maneira de modificar parâmetros como tempo na circulação sanguínea, entrega do ativo ao alvo e também na eliminação do mesmo é através do tamanho de partícula (Figura 4), que pode mudar de acordo com a exposição a estímulos

como pH, temperatura e luz. Nanopartículas que exibem rápido e reversível comportamento de expansão tem sido utilizadas para dispersar na membrana endossômica, como por exemplo, no aumento do tamanho da partícula induzido por mudanças na temperatura (YOO et al, 2011).

A agregação e re-dispersão também é outra forma de alterar o tamanho das partículas e, dessa forma, os nanocarreadores seriam vantajosos no direcionamento de tumores, pois a agregação das partículas melhoraria a penetração e retenção destes na massa tumoral. Um exemplo disso são as nanopartículas capazes de aumentar seu tamanho em resposta ao baixo pH extracelular (6,4-6,8) do tumor, tornando-a fisicamente confinada neste local em razão da agregação.

A alteração do tamanho das partículas seria também uma ferramenta oportuna na eliminação de fármacos do organismo, pois a redução destas em tamanho menor que 10 nm levariam a excreção renal (YOO et al, 2011).

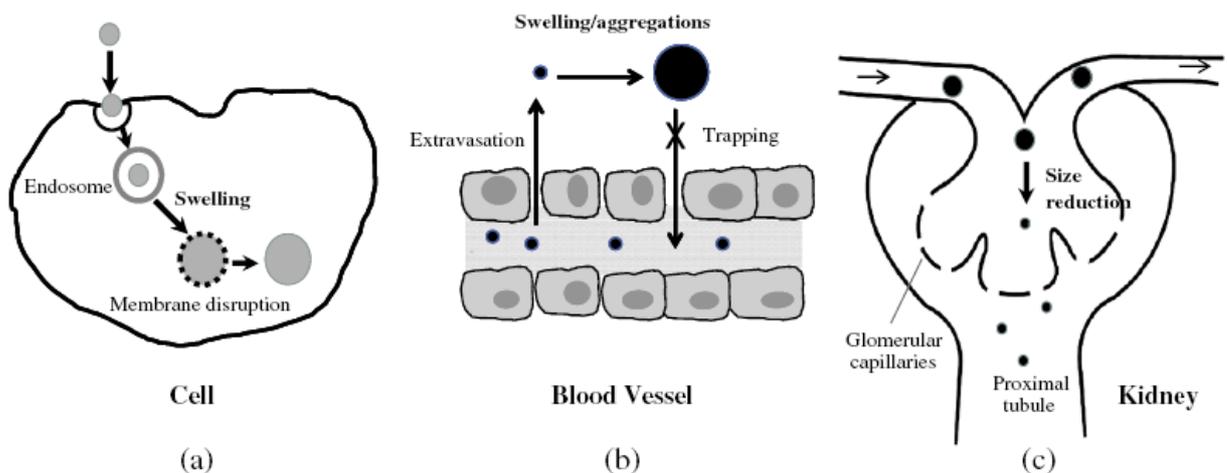


Figura 4 – Vantagens da liberação de fármacos a partir do controle do tamanho das partículas. (a) passagem pelo endossoma com posterior expansão no tamanho da partícula; aumento no tamanho da partícula dentro do endossoma pode romper fisicamente o compartimento endossômico levando a liberação citosólica. (b) aprisionamento pela expansão do tamanho; quando as partículas chegam ao sítio alvo por extravasamento ocorre o aumento no tamanho dessas partículas no espaço das junções entre as células endoteliais adjacentes impedindo que essas partículas retornem à circulação direcionando-as ao local de ação. (c) excreção renal por redução no tamanho das partículas; a eliminação das partículas pode acontecer por diminuí-las de tamanho, menores que 10 nm, onde podem ser filtradas pelas fenestras do capilar glomerular do rim (YOO et al, 2011).

3.3.2. Controle das propriedades da superfície da partícula

A superfície dos nanocarreadores (Figura 5) possui um importante papel visando melhora nas funções terapêuticas, pois podem abrandar as interações entre o retículo endotelial e o tecido alvo. Por exemplo, o polímero polietilenoglicol (PEG) é muito utilizado nas formulações, pois tem excelente efeito estérico de estabilização e reduz a adsorção de proteínas na superfície evitando o reconhecimento pelo retículo endotelial com aumento no tempo de circulação. Em contrapartida, quando chega ao alvo, as formulações contendo este polímero podem inibir algumas funções como liberação do ativo e as interações entre a célula e o nanocarreador (YOO et al, 2011).

Para controlar estas desvantagens, tem-se desenvolvido formulações onde o polímero é desconectado do nanocarreador através da clivagem de pontes dissulfeto, por exemplo. Outra estratégia é o uso de ligantes juntamente com PEG que seriam ativos no local de ação através da remoção do polímero. Pesquisas também têm usado ligantes móveis sob a estrutura do PEG que, se encontrando depois no sítio alvo, esses se estendem e interagem com a célula. A conversão dinâmica da carga da superfície das nanopartículas é outra possibilidade utilizada para modular as interações com a célula alvo (YOO et al, 2011).

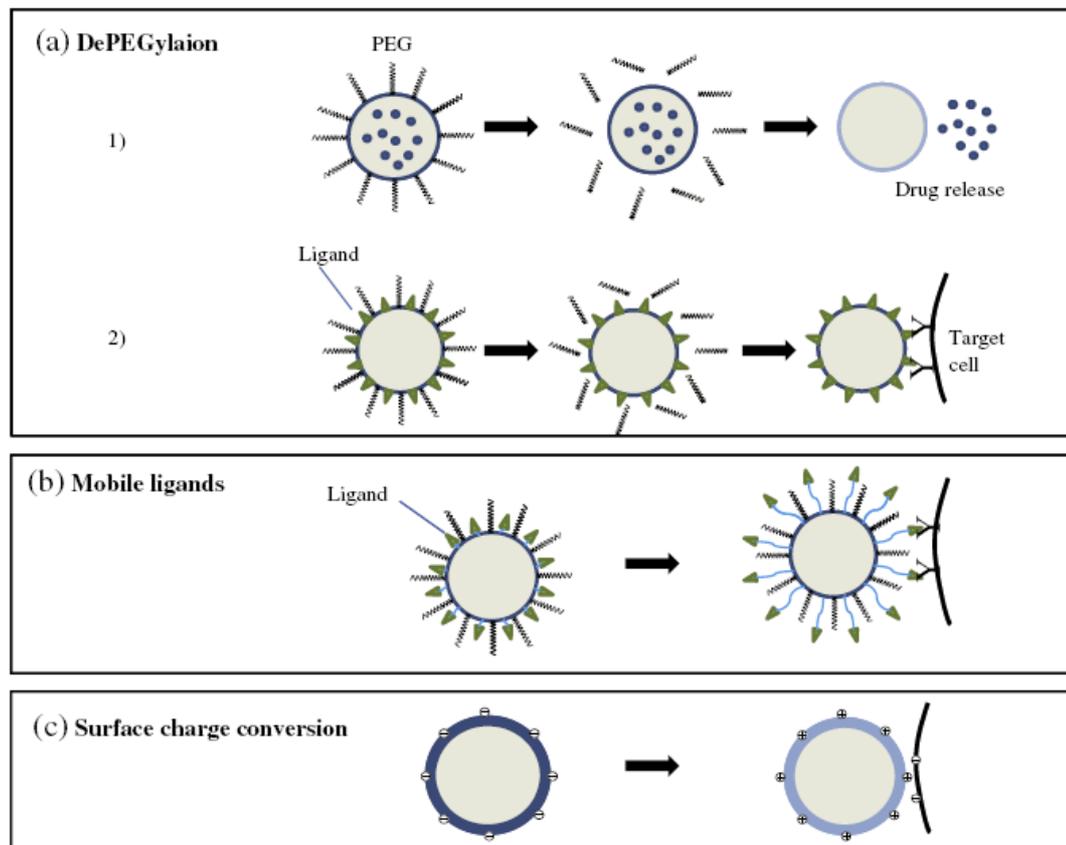


Figura 5 - controle dinâmico da superfície de partícula para entrega do fármaco. (a) desconecção do polímero 1) a remoção do PEG da superfície da nanopartícula pode promover a liberação da partícula dentro ou fora da célula 2) ligantes que almejam a penetração celular pode ser mascarado pelo PEG durante a circulação evitando o sistema retículo endotelial e chegando no sítio de ação o polímero se desconecta aumentando a interação entre a partícula e a célula; (b) ligantes móveis que no sítio alvo se estendem e interagem com as células; (c) partículas que durante a circulação são negativas ou neutras para evitarem as ligações não específicas que chegando ao local desejado a carga de superfície passa para positivo interagindo com as membranas celulares que são carregadas negativamente. (YOO et al, 2011).

3.3.3. Exemplo de vetORIZADORES

Em função do difícil direcionamento de fármacos no cérebro em função da barreira hematoencefálica e pelo curto período da meia vida plasmática, pesquisadores desenvolveram imunonancapsulas sintetizadas por conjugação à nancapsulas lipídicas para a entrega de radionucleotídeos lipofílicos e moléculas

terapêuticas ao cérebro. A partir dos testes realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, pôde-se desenvolver uma formulação com eficiente vetorização cerebral, consistindo numa alternativa viável de direcionamento de sistemas lipossômicos em alvos terapêuticos (BÉDUNEAU et al, 2007- 2008).

Outra área promissora é o direcionamento de ativos nas células tumorais. Isto se torna importante, pois fármacos como paclitaxel, que é um potente antitumoral utilizado em terapias, apresenta algumas desvantagens como ausência de seletividade citotóxica entre células tumorais e saudáveis, causando sérios efeitos colaterais reduzindo suas aplicações na terapêutica (SHAN et al, 2012).

Levando em consideração estas desvantagens, foram desenvolvidas nanopartículas de paclitaxel conjugadas com adenovírus modificado, onde este apresenta capacidade de direcionamento no tecido tumoral.

Neste trabalho, Shan e colaboradores desenvolveram dois pró-fármacos onde os estudos *in vitro* e de toxicidade aguda mostraram baixa toxicidade de ambas as formulações comparadas ao fármaco livre, além da melhora na vetorização (SHAN et al, 2012).

Um grupo de pesquisadores desenvolveram nanocápsulas lipídicas de DNA complexado com lipídeos catiônicos a fim de obter um sistema eficiente, estável e de liberação sustentada utilizando polietilenoglicol funcionalizado para vetorização do composto. Os resultados foram promissores no direcionamento ao local de ação através da injeção sistêmica (MORILLE et al, 2009).

3.4. Caracterização físico-química

As formulações das nanopartículas são obtidas como suspensões coloidais aquosas. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a formação de agregados no meio gerando precipitados. Aliado a isso, pode existir problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, incluindo o fármaco. Devido a esta estabilidade limitada em função do tempo, tem-se um obstáculo para a aplicabilidade industrial destas suspensões. Dessa forma, a compreensão do comportamento físico-químico das nanopartículas poliméricas pode

fornecer importantes informações em relação à estabilidade destes compostos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A partir das informações obtidas pela caracterização físico-química podem-se propor modelos que descrevam a organização das nanopartículas em nível molecular, sendo dependente da composição quali-quantitativa das formulações. A avaliação morfológica, distribuição de tamanho de partícula, distribuição da massa molar do polímero, determinação do potencial zeta e do pH, determinação da quantidade de fármaco associado às nanoestruturas, a cinética de liberação do fármaco e avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento são exemplos desta caracterização (SCHAFFAZICK et al., 2002-2003).

3.4.1. Avaliação morfológica

Para a avaliação morfológica, têm sido empregadas as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) (Figura 6) ou de transmissão (MET) (Figura 7) fornecendo informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas. Outra técnica empregada é a microscopia de força atômica que fornece informações com alta resolução em três dimensões sendo capaz de resolver detalhes de superfície em nível atômico. A MET também pode permitir a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, possibilitando a determinação da espessura da parede das nanocápsulas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

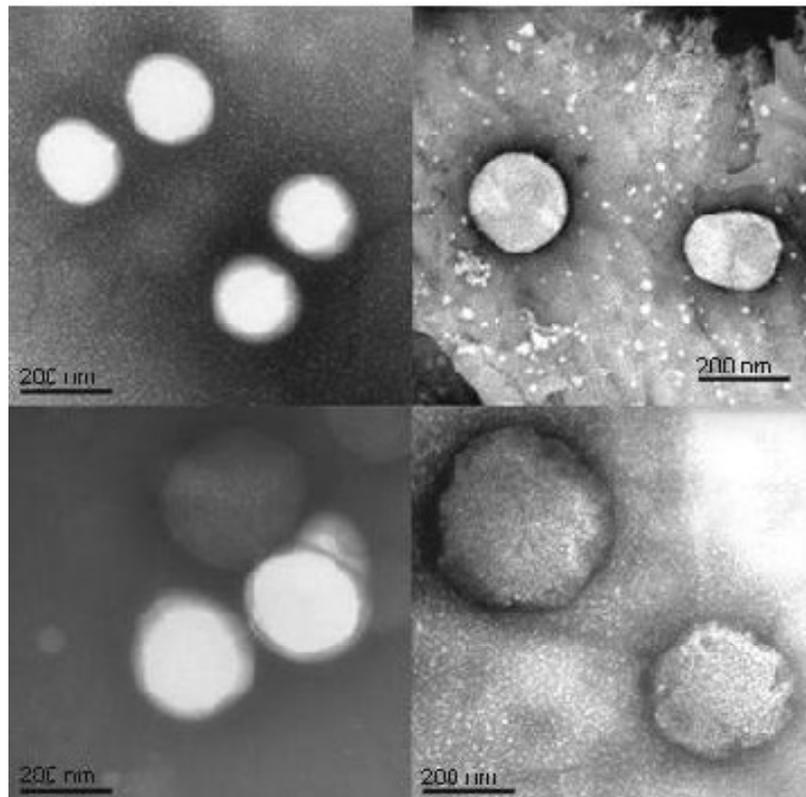


Figura 6 – Exemplo de microscopia eletrônica de transmissão de nanocápsulas contendo óleo de semente de uva (a), nanocápsulas contendo óleo de amêndoa (b), nanoemulsão contendo óleo de semente de uva (c), nanoemulsão contendo óleo de amêndoa (d) (ALMEIDA et al, 2009).

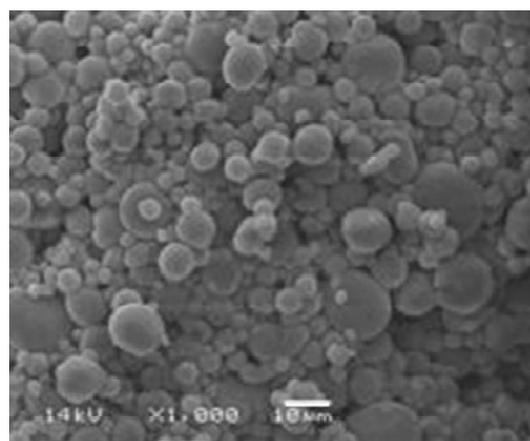


Figura 7 – Exemplo de microscopia eletrônica de varredura de micropartículas nanorrevestidas (DOMINGUES et al, 2008).

3.4.2. Distribuição do tamanho de partícula

A distribuição do tamanho de partícula (Figura 8) é um parâmetro importante a ser avaliado, já que determinam a distribuição *in vivo*, toxicidade e capacidade do sistema de liberação. Aliado a isso, há influência no carreamento e liberação do fármaco bem como estabilidade das nanocápsulas (SINGH e LILLARD, 2009).

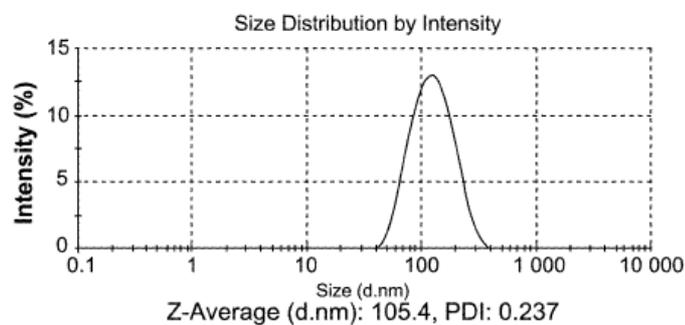


Figura 8 – distribuição do tamanho de partícula (KHUDA-BUKHSH et al, 2010).

O tamanho de partícula e a massa molecular da nanopartícula dependem do tipo e concentração do estabilizante e/ou surfactante usado (SOPPIMATH et al., 2001).

Quando a nanoprecipitação é o método utilizado para a preparação das nanocápsulas, a natureza e concentração do polímero, a polaridade do solvente, a natureza e a relação entre as fases interna e externa, além da natureza e concentração do surfactante utilizado são fatores essenciais na determinação do tamanho da partícula (MORA-HUERTAS et al, 2010).

Pelo seu tamanho muito pequeno, as nanopartículas apresentam maior área superficial e, dessa forma, o fármaco associado à superfície das nanopartículas pode levar a liberação mais rápida do ativo. Por outro lado, partículas maiores têm maior núcleo fazendo com que mais fármaco seja encapsulado levando a liberação mais lenta do ativo. Dessa forma, controlando o tamanho de partícula há influência na proporção da taxa de liberação (SINGH e LILLARD, 2009).

O tamanho da partícula também influencia na depuração esplênica e renal, onde partículas maiores que 200 nm estão mais suscetíveis à eliminação pelo baço enquanto que partículas menores que 10 nm são eliminadas através do sistema de filtração pelo rim. Com relação à captação celular, as partículas menores que 500 nm são normalmente internalizadas por endocitose e acredita-se que partículas maiores que 500 nm são captadas por fagocitose (YOO et al, 2011).

Com relação às nanocápsulas, a natureza do óleo influencia o diâmetro das partículas, sendo os resultados, atribuídos às diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial das substâncias empregadas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

3.4.3. Potencial Zeta

A determinação do potencial zeta (Figura 9) das nanopartículas é usado para caracterizar as propriedades da carga superficial (SINGH e LILLARD, 2009; SOPPIMATH et al., 2001), pois ele reflete o potencial das cargas de superfície das partículas e é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante. Isso ocorre em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK et al, 2003; SINGH e LILLARD, 2009).

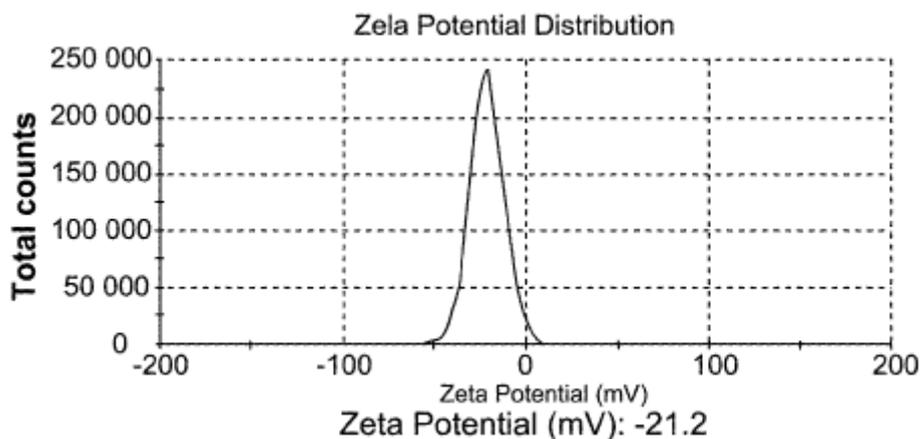


Figura 9 – potencial zeta (KHUDA-BUKHSH et al, 2010).

Dessa forma, o valor do potencial zeta irá depender da natureza química do polímero, da natureza química do agente estabilizante e do pH do meio. Por exemplo, quando nanocápsulas são preparadas com polímeros de poliéster ou derivados de metacrilato usando estabilizante não iônico, o valor desta determinação será negativo devido à presença de grupos carboxílicos terminais do polímero. Do mesmo modo, valores positivos serão obtidos quando polímeros catiônicos e estabilizantes não iônicos são usados (MORA-HUERTAS et al, 2010).

Valores de potencial zeta que variam acima de 10mV em módulo, predizem boa estabilidade coloidal em razão da alta barreira energética entre as partículas (MORA-HUERTAS et al, 2010). Sendo assim, o potencial zeta com valor relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões que possam ocorrer de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK et al, 2003).

Essa determinação também pode ser útil para elucidar o mecanismo de associação do fármaco com as nanopartículas (SCHAFFAZICK et al, 2003). Um grupo de pesquisadores fez estudos comparativos entre nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão mostrando que a presença da fase oleosa, nas nanocápsulas e nanoemulsões, lhes conferiu um potencial zeta mais negativo em relação às nanoesferas (CALVO et al., 1996; SCHAFFAZICK et al., 2002).

3.4.4. pH da suspensão

O monitoramento do pH em função do tempo fornece informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões. Desta forma, a alteração do pH pode ser indício da degradação do polímero. Contudo, a diminuição dos valores de pH em um curto período de tempo também pode ser devido à ionização de grupos funcionais presentes na matriz polimérica, como por exemplo, a de grupos carboxílicos que se encontram presentes no polímero (SCHAFFAZICK et al, 2003).

Em um trabalho, Schaffazick et al, prepararam diversas formulações de nanocápsulas e nanoesferas mostrando que suspensões de nanopartículas

preparadas com poli(ϵ -caprolactona)(PCL) apresentaram redução nos valores do pH em um período de 3,5 meses. Este fato foi atribuído ao polímero, uma vez que a relaxação das cadeias poliméricas de PCL poderia ocasionar a exposição de um maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais ocasionando a hidrólise do poliéster (SCHAFFAZICK et al., 2002).

No mesmo trabalho, foi observado que as suspensões de poli(ϵ -caprolactona) apresentaram-se significativamente mais estáveis em relação as suspensões de Eudragit[®] quanto à diminuição do teor de diclofenaco, aos 3 - 5 meses de armazenamento à temperatura ambiente. Os autores concluíram que esta diminuição do teor poderia ser atribuída à formação de nanocristais do fármaco durante a formação das nanoestruturas (SCHAFFAZICK et al., 2002).

3.5. Polímeros biodegradáveis

A aplicação de materiais poliméricos apresenta interessante aplicação na indústria farmacêutica e em outros setores. Tem-se especial atenção nos polímeros biodegradáveis por serem capazes de modular a liberação de fármacos e degradar-se *in vivo* em fragmentos menores, possibilitando assim a excreção pelo organismo. Adicionalmente, estes não devem apresentar toxicidade e não devem criar nenhuma resposta inflamatória (VELDE e KIEKENS, 2002; VILLANOVA et al, 2010).

Os principais polímeros utilizados no emprego das formulações de nanopartículas são poli (ácido lático), poli (ácido glicólico), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) e poli (ϵ -caprolactona) (VELDE e KIEKENS, 2002).

A poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster amplamente estudado devido a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, pois é um polímero adequado para a entrega de medicamentos controlados devido a alta permeabilidade a muitos medicamentos sendo também livre de toxicidade (CHAWLA e AMIJI, 2002; GUTERRES et al., 2007; SINHA et al., 2004; NGUYEN e NGUYEN, 2010). A biodegradação deste é mais lenta em comparação com outros polímeros, sendo adequado para liberação controlada (CHAWLA e AMIJI, 2002; SINHA et al., 2004). A poli(ϵ -caprolactona) é um tipo de polímero hidrofóbico e semicristalino, tendo ponto de fusão por volta de 60 °C (NGUYEN e NGUYEN, 2010; FUKUSHIMA, et al., 2010).

Apresenta solubilidade em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano. Tem pouca solubilidade em acetona, 2-butanona, acetato de etila, dimetilformamida e acetonitrila (SINHA et al., 2004).

A degradação dos poliésteres semi-cristalinos em meio aquoso ocorre em duas etapas. Primeiramente, inicia com a difusão da água nas regiões amorfas. Por serem menos organizadas, permite fácil penetração da água na matriz polimérica. Após a degradação da maior parte da região amorfa, tem-se início a segunda etapa, onde acontece a degradação hidrolítica da superfície em direção ao centro do polímero cristalino (FUKUSHIMA, et al., 2010).

O padrão cinético da degradação da poli (ϵ -caprolactona) consiste em um processo auto catalítico onde a liberação dos grupamentos finais dos ácidos carboxílicos catalisa sua hidrólise (SINHA et al., 2004).

Existem relatos de que este polímero mostra-se relativamente estável à hidrólise abiótica, porém pode ser facilmente degradado por microorganismos amplamente distribuídos em diferentes ambientes. A sua biodegradação é resultante da erosão da superfície com redução do peso molecular (FUKUSHIMA, et al., 2010).

3.6. Liberação do fármaco

Quando se visa o desenvolvimento de um sistema de entrega do ativo é importante considerar tanto a liberação do fármaco quanto a biodegradação do polímero. Na maioria das vezes, depende da solubilidade do ativo, dessorção do fármaco na superfície das partículas, da difusão através da matriz das nanopartículas, erosão da matriz polimérica e a combinação dos processos de difusão e erosão. Assim sendo, a solubilidade, difusão e biodegradação das partículas da matriz é que regem esse processo de liberação (SOPPIMATH et al., 2001; SINGH e LILLARD, 2009).

Como as nanoesferas estão com o fármaco uniformemente distribuído, a liberação deste acontece por erosão ou difusão da matriz. Se a difusão do ativo é mais rápido que a erosão da matriz, então o mecanismo de liberação é basicamente controlado pelo processo de difusão, caso contrário, depende da degradação. A

rápida liberação inicial é atribuída principalmente ao fármaco ligado ou adsorvido a superfície relativamente grande das nanopartículas, do que o ativo incorporado nas nanopartículas (SOPPIMATH et al., 2001; SINGH e LILLARD, 2009).

Desta forma, torna-se claro que o método de incorporação do ativo tem efeito sobre o perfil de liberação e uma maior quantidade do fármaco pode ser encapsulada pelo método de incorporação quando comparado com o método de adsorção, apresentando também melhores características de liberação sustentada (SOPPIMATH et al., 2001; SINGH e LILLARD, 2009).

Quando o fármaco é incorporado no momento da formulação da nanopartícula, este é o método de incorporação, enquanto que no método de absorção/adsorção a absorção do ativo acontece após a formação da nanopartícula (SINGH e LILLARD, 2009).

A liberação do fármaco também é afetada pelo tamanho da partícula, onde partículas menores têm maior relação na superfície área-volume. Portanto, a maioria dos compostos associados a partículas pequenas estaria junto à superfície levando a uma rápida liberação. Em contraste, partículas maiores têm grandes núcleos onde uma maior quantidade de ativo pode ser encapsulado tendo, dessa forma, uma liberação mais lenta (SINGH e LILLARD, 2009).

Outro fator que influencia na liberação é o revestimento da membrana que pode atuar como uma barreira onde a solubilidade e difusão do fármaco através do polímero da membrana se torna um fator determinante para isto. Além disso, interações iônicas entre a substância ativa e os outros componentes da formulação também pode afetar a liberação. Quando o fármaco interage com estes, pode ocorrer a formação de um complexo menos solúvel em água, retardando sua liberação (SINGH e LILLARD, 2009).

3.7. Preparação das nanopartículas

Para a preparação de nanocápsulas, existem diversos métodos descritos na literatura. O método de polimerização interfacial de monômeros dispersos apresenta algumas desvantagens, como a provável presença de resíduos, possivelmente proveniente dos monômeros e oligômeros, reação cruzada com o fármaco e

dificuldade de predizer o peso molecular do polímero resultante (QUINTANAR-GUERRERO et al, 1998).

O método emulsificação-difusão é usado para preparar nanoesferas de polímero pré-formado. Este método envolve a formação de emulsão óleo em água entre o solvente parcialmente solúvel em água que contém o polímero e o fármaco e, a fase aquosa contendo o estabilizante (QUINTANAR-GUERRERO et al, 1998).

O uso de menores quantidades do solvente orgânico, a reprodutibilidade e a maior facilidade para a produção industrial são algumas das vantagens deste método. Porém, neste processo é usado alto volume de água que necessita de evaporação e pode ocorrer perda da substância ativa hidrossolúvel para a fase externa aquosa saturada, durante a etapa de emulsificação (QUINTANAR-GUERRERO et al, 1998).

O método de deposição interfacial do polímero pré-formado ou nanoprecipitação (Figura 10) foi proposto por FESSI e colaboradores em 1988, onde compreende uma fase orgânica composta por um fármaco a ser encapsulado, o tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo), o óleo e o polímero, solubilizado em solvente miscível em água. Já a fase aquosa é composta por tensoativo hidrofílico e água (MORA-HUERTAS et al, 2010).

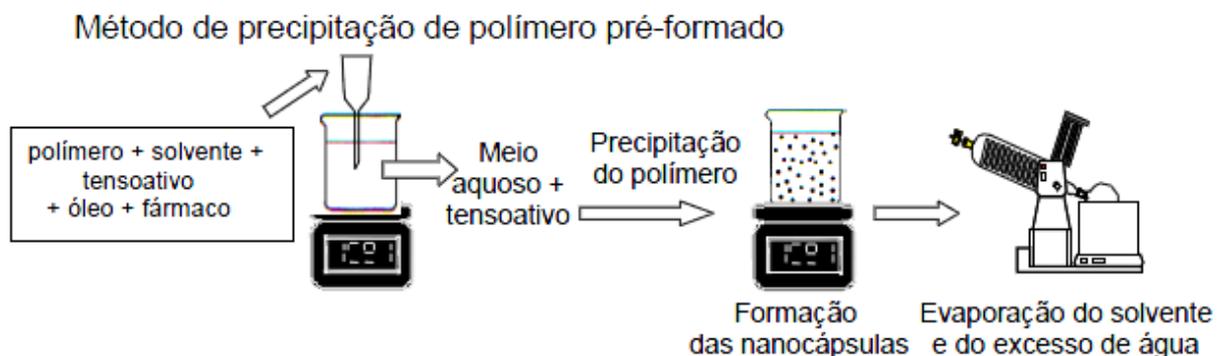


Figura 10: Método empregado na preparação de nanocápsulas poliméricas (Schaffazick et al., 2003).

As nanocápsulas são formadas instantaneamente quando a fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa, através de um funil (MORA-HUERTAS et al, 2010; SOPPIMATH et al., 2001). Este método apresenta algumas vantagens, como: fácil

execução, eficiência e reprodutibilidade, obtenção de partículas com menor diâmetro, a monodispersão e a ausência de monômeros residuais (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES et al., 2007).

Este método também apresenta melhores resultados na encapsulação. A natureza química do ativo bem como sua polaridade determina a eficiência na encapsulação, dessa forma, fármacos hidrofílicos podem chegar a 10% no máximo enquanto que compostos lipofílicos apresentam maior eficiência podendo chegar de 70 % ou mais (MORA-HUERTAS et al, 2010).

Segundo pesquisadores, a formação das nanopartículas através deste método compreende três etapas: nucleação, crescimento e agregação. A taxa de cada etapa determina o tamanho da partícula e a força motriz destes fenômenos é a supersaturação, que é definido como a relação entre a concentração do polímero sobre a solubilidade do polímero frente ao solvente. O fator importante para a formação de partículas uniformes é a separação entre a nucleação e o estágio de crescimento onde as condições de funcionamento devem permitir alta nucleação fortemente dependente da supersaturação e da baixa taxa de crescimento (MORA-HUERTAS et al, 2010).

Outro grupo de pesquisa explica a rápida formação das nanopartículas como um processo devido a diferenças na tensão superficial. Isso ocorreria porque um líquido com alta tensão superficial (fase aquosa) atrai mais fortemente sobre o líquido ao redor do que um com baixa tensão superficial (fase orgânica). Essa diferença entre a tensão superficial provoca uma turbulência interfacial e as diferenças térmicas do sistema levariam a formação contínua dos turbilhões de solvente na interface de ambos líquidos (MORA-HUERTAS et al, 2010).

Conseqüentemente, a violenta propagação se observa devido à miscibilidade mútua entre os solventes, o fluxo do solvente fora da região de baixa tensão superficial e o polímero tende a agregar na superfície oleosa formando as nanocápsulas. De acordo com isto, a formação das nanocápsulas ocorre devido à agregação de gotículas da emulsão estabilizada (MORA-HUERTAS et al, 2010).

Em razão das vantagens dos carreadores coloidais de fármacos, mais especificamente nanocápsulas e nanoesferas, torna-se interessante o emprego destes sistemas nos compostos organocalcogênio, como no caso do disseleneto de difenila que já é amplamente estudado e apresenta diversas propriedades farmacológicas bem descritas na literatura.

3.8. Selênio

O selênio (Se) é um elemento essencial para o ser humano, apresentando um grande número de funções biológicas (RAYMAN, 2000). Foi descoberto em 1817, pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius podendo se apresentar sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}).

Por apresentar atividade redox, este calcogênio reduz peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos de lipídeos e fosfolipídeos através da glutathione peroxidase dependente de selênio. Dessa forma, esta função auxilia na integridade da membrana, protege a produção de prostaciclina e reduz a probabilidade de propagação do dano oxidativo das biomoléculas como lipídeos, lipoproteínas e DNA que estão associados com aumento do risco de doenças como aterosclerose e câncer (RAYMAN, 2000).

O selênio está presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo de diversas enzimas, onde o grupamento selenol-selenolato da selenocisteína ocupa um lugar central no ciclo catalítico de importantes enzimas antioxidantes, como, por exemplo, tioredoxina redutase e glutathione peroxidase (NOGUEIRA e ROCHA, 2010).

Durante o ciclo catalítico da glutathione peroxidase (GPx) nas selenoproteínas (Figura 11), o composto selenol-selenolato interage primeiramente com as moléculas pró-oxidantes como peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos formando o ácido selenínico no centro ativo da enzima. O resíduo de selenocisteína oxidado é reduzido a selenol por meio da reação com dois equivalentes de glutathione reduzida (GSH) (NOGUEIRA e ROCHA, 2010).

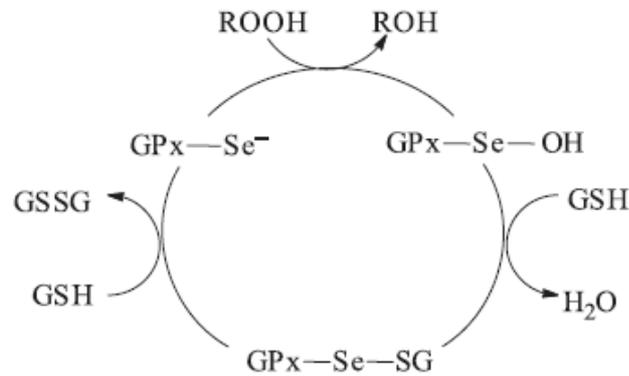


Figura 11- Ciclo catalítico da glutatona peroxidase. Durante o ciclo catalítico, o átomo de enxofre (S) proveniente do tiol reage com o átomo de selênio da selenocisteína oxidada promovendo interações Se-S nos sistemas biológicos (NOGUEIRA e ROCHA, 2010).

3.8.1. Disseleneto de difenila

O disseleneto de difenila (Figura 12) é um composto orgânico que contém Se na sua estrutura. Devido a isso, diversos grupos estudam suas propriedades tanto farmacológicas quanto toxicológicas e resultados mostram que este se comporta como mimético da glutatona peroxidase em sistemas biológicos (NOGUEIRA e JOÃO, 2010).

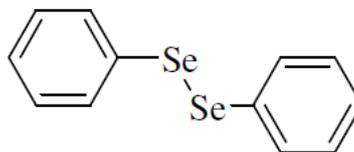


Figura 12: Estrutura química do disseleneto de difenila.

Pesquisadores avaliaram a toxicidade da exposição oral do disseleneto de difenila por um período prolongado em coelhos. Para isto, foram determinados parâmetros bioquímicos do sangue como possíveis marcadores de toxicidade. Os resultados do trabalho indicaram que este composto é relativamente seguro para coelhos que o ingeriram por tempo prolongado. Porém, as altas doses testadas,

promoveram algumas alterações bioquímicas podendo indicar algum possível efeito tóxico do disseleneto de difenila (DE BEM et al., 2006).

Sabendo-se da atividade antioxidante do disseleneto de difenila, investigou-se a proteção sobre o dano oxidativo no músculo esquelético e nos pulmões de camundongos causado pelo exercício físico. A partir deste estudo, concluiu-se que o exercício físico agudo causa estresse oxidativo nos tecidos estudados e o disseleneto de difenila reduz esse dano sugerindo que pode ser útil na terapia antioxidante contra o estresse oxidativo causado pelo exercício físico em camundongos (PRIGOL et al., 2009c).

O disseleneto de difenila ainda pode reduzir significativamente os níveis de glicose sanguínea em ratos tratados com estreptozotocina quando comparado com ratos diabéticos não tratados (KADE, 2009; BARBOSA et al., 2006).

Apesar de o composto apresentar excelentes propriedades farmacológicas, é necessário conhecer suas características farmacocinéticas e também farmacodinâmicas a fim de certificar sua viabilidade como potencial fármaco de uso terapêutico (PRIGOL, 2010a).

Pesquisas recentes tem estudado a farmacocinética do $(\text{PhSe})_2$, demonstrando que o pico plasmático após a administração oral (500 mg/kg) foi de 30 minutos e a concentração plasmática máxima foi de 13,13 $\mu\text{g/ml}$ para ratos e 10,11 $\mu\text{g/ml}$ para camundongos, decaindo continuamente e permanecendo detectável por até 8 horas após sua administração (PRIGOL et al, 2009b).

Com o objetivo de investigar a distribuição do Se em diferentes tecidos após a exposição *in vivo* do disseleneto de difenila, Maciel e colaboradores demonstraram que o tratamento agudo e crônico aumentou significativamente as concentrações de Se no fígado, rim e cérebro de camundongos, sendo que a deposição foi dependente da dose (MACIEL et al, 2003).

Diversos fatores influenciam na excreção de compostos como peso molecular e carga. Compostos aromáticos, como cloretos de bifenila que apresentam peso molecular maior que 200 são excretados preferencialmente pela bile e não pela urina. Em razão de o peso molecular do $(\text{PhSe})_2$ ser 312, é esperado que o composto seja excretado pela bile, estando de acordo com os resultados encontrados pois o Se depositou-se predominantemente no fígado (MACIEL et al, 2003).

Com o objetivo de investigar os parâmetros relacionados ao comportamento do $(\text{PhSe})_2$ no organismo, Prigol estudou modelos cinéticos *in vitro* e constatou que o ativo em questão apresenta baixa solubilidade em água ($0,98 \mu\text{M}$) e que o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (capaz de prever a habilidade do composto em atravessar as membranas) foi bastante elevado (3,14) indicando que o composto apresenta rápida absorção pelo trato intestinal e atravessa a barreira hematoencefálica, devido a essa alta lipofilicidade. (PRIGOL, 2010a).

O mesmo estudo mostrou que o $(\text{PhSe})_2$ apresenta estabilidade química nos fluidos gástrico e intestinal simulados e também quando em contato com o plasma evidenciando que quando administrado em animais, este não sofre degradação estomacal, intestinal ou pelas enzimas plasmáticas (PRIGOL, 2010a).

Por este composto apresentar alto grau de lipofilicidade verificou-se que as concentrações do $(\text{PhSe})_2$ encontradas na circulação são baixas quando comparadas à dose administrada. A alta lipofilicidade atua também explicando sua rápida absorção e disponibilidade na corrente sanguínea, além da rápida queda nos níveis do $(\text{PhSe})_2$. Em função da baixa solubilidade em água, a eficácia das drogas lipofílicas, como o disseleneto de difenila, é reduzida por apresentar menor absorção. Dessa forma, os pesquisadores sugerem que apenas uma pequena quantidade do composto é dissolvida no fluido gastrointestinal para ser absorvida na corrente sanguínea (PRIGOL, 2010a).

4. RESULTADOS

4.1. Capítulo 1: Artigo científico

Os resultados que fazem parte do capítulo 1 desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito apresentado a seguir. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados, Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. A apresentação do manuscrito está baseada na versão a ser submetida à revista *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* cujo título é “DIPHENYL DISELENIDE NANOCAPSULES: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL DISTRIBUTION”

DIPHENYL DISELENIDE NANOCAPSULES: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL DISTRIBUTION

Camila F. A. Giordani¹, Cristina W. Nogueira¹, Marina Prigol¹, Marta P. Alves², Oscar E. D. Rodrigues^{1*}

¹Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil

² Centro Universitário Franciscano – UNIFRA, Santa Maria, RS, Brazil

² Address reprint requests to:

¹ Departamento de Química Universidade Federal de Santa Maria 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

² Centro Universitário Franciscano – UNIFRA, Santa Maria, RS, Brazil

Phone: +55 55 3220 8761

FAX: +55 55 3220 8475

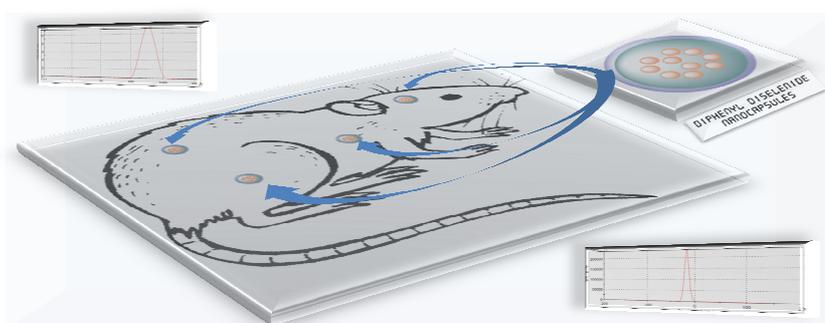
E-mail: rodriguesoed@smail.ufsm.br

Abstract

During the past years, organoselenium compounds have been aimed as targets of interest in organic synthesis. Diphenyl diselenide $[(\text{PhSe})_2]$ is an important example of this class, showing several pharmacological effects. However, the poor water-solubility and its low oral bioavailability can be an obstruction for the clinical utility of this compound. For this reason, the use of nanocapsules is a prominent approach to increase the bioavailability of lipophylic molecules. This study aims the preparation of diphenyl diselenide nanocapsules with two different concentrations, by interfacial deposition of the preformed polymer; in order to develop a system to improve its oral bioavailability. The nanocapsules showed a distribution size with a polydispersity index of 0.2, an average diameter of 323.4 nm, zeta potential of -19.3 mV and encapsulation efficiency of 99.9 %. The biological tests show a higher bioavailability of the $(\text{PhSe})_2$ nanocapsules compared with the free $(\text{PhSe})_2$, showing a prominent influence of the nanoparticle systems for biological properties of organochalcogenium compounds.

Keywords: diphenyl diselenide nanocapsules, excretion, distribution.

Graphical Abstract



1. Introduction

Drug Controlled Release has been an area of intense research in the past year (MORA-HUERTAS et al, 2010). In this context, nanotechnology drug delivery has some advantages over the current modalities of treatment, such as: lower drug toxicities, improved bioavailability and the protection of labile drugs from degradation in the gastrointestinal tract. These systems of drug delivery include nanoemulsions, nanospheres, nanocapsules, liposomes and lipid complexes. (SOPPIMATH et al., 2001; HEURTAULT et al., 2003)

Nanoparticles are based on biodegradable polymers of similar size to liposomes, which present some advantages over the newest terms of storage and *in vivo* stability, comparing to liposomes. Thereby, nanoparticles help to enhance the stability of drugs, proteins and have efficient properties of drug controlled release (SOPPIMATH et al., 2001). Due to their small size, nanocarriers such as nanoparticles can extravasate through the endothelium in inflammatory sites, tumors sites and at antigen sampling sites by virtue of the increase of the permeability and retention effect of the vasculature. (MORA-HUERTAS et al, 2010; SINGH AND LILLARD, 2009). Most particles are phagocytosed by antigen-presenting cells, while some nanoparticle can find their way into the portal circulation, and consequently to the liver. (BARRAT, 2000)

There are many studies about nanocapsules formulation and the advantages over the conventional drug that improve their pharmacokinetics: reduction in drug release due to less interaction with plasma proteins (ASSIS et al, 2008); the transport of drugs from the blood into the brain (WOHLFART et al, 2011); prolonged presence of the drug in the plasma after oral and/or intravenous administration (LAMPRECHT et al, 2004; LUO et al, 2011) and improved oral bioavailability in compounds that by a conventional formulation have this characteristic at an extremely low rate (PELTIER et al, 2006).

Nowadays, organochalcogen compounds have emerged as an interesting class of compounds, not only due to its applications as in intermediate in organic synthesis, but mainly concerning the biological potentialities of organochalcogen compounds. For instance, organoselenium compounds constitute a powerful cellular

defense system against oxidative stress. These substances are capable of imitating the enzymatic properties of glutathione peroxidase, enzyme inhibitors, antitumor and anti-infective agents, cytokine inducers and immunomodulators. Additionally, organoselenium compounds are also much less toxic compared to inorganic selenium species (NOGUEIRA et al., 2004; MUGESH et al., 2001). It thus becomes clear that diphenyl diselenide (PhSe)₂ appears as a prominent target for biological studies of organochalcogen compounds, showing a variety of pharmacologic effects, such as: antinociceptive (SAVEGNAGO et al, 2007), antidepressant and anxiolytic-like effect (ACKER et al, 2009; GHISLENI et al, 2008; PRIGOL et al, 2011; ROCHA et al, 2012; SAVEGNAGO et al, 2008;), antioxidant activity (SANTOS et al, 2005; ROSA et al, 2007; BORGES et al, 2006; FREITAS et al, 2009), antiulcer (SAVEGNAGO et al, 2006; INEU, 2008), neuroprotective (FREITAS and ROCHA, 2011; POSSER et al, 2008; SILVA et al, 2012) and anti-hyperglycemic (BARBOSA et al, 2006). Diphenyl diselenide is a highly lipophilic compound that has low aqueous solubility, high Log D values and high binding to plasmatic protein, explaining the low bioavailability of this compound (PRIGOL et al, 2012, UNDER REVISION a).

According to the interest of our group in the synthesis of new organochalcogen compounds and new delivery systems formulations for biological applications, we described here the preparation of a new diphenyl diselenide nanocapsules [NCS-(PhSe)₂] using the interfacial deposition of preformed polymer and the *in vivo* bioavailability and distribution studies.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

(PhSe)₂ was prepared in our laboratory according to previous publication (PAULMIER, 1986). Analysis of the ¹H NMR and ¹³C NMR spectra showed that (PhSe)₂ obtained the presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of this compound (99.9%) was

determined by GC/MS and it was stable under storage conditions at room temperature, humidity and light.

2.2. Preparation of nanocapsules

Nanocapsule suspensions were prepared (n=3) by the interfacial deposition of preformed polymer method as described by *Fessi et al, 1989*. Briefly, an organic solution consisted of the oily phase – canola oil (1.551 g), a low HBL (hydrophilic-lipophilic balance) surfactant – Span 80® (0.383 g), polymer (PCL-from 70.000 to 90.000) (0.5 g) and acetone (133.5 ml) at 40 °C was added under moderated magnetic stirring to an aqueous solution (266.5 ml of Milli-Q water) containing a high HBL surfactant – Tween 80® (0.383 g) at 35 °C. The magnetic stirring was maintained for 10 min. Then, the system was concentrated by evaporation under reduced pressure to a final volume of 50 ml at 40 °C. All formulations were stored and protected from the light.

Nanoparticles loaded with diphenyl diselenide were prepared at a final concentration of 1.56 mg.ml⁻¹ and 5mg.ml⁻¹, being dissolved (78 mg and 250 mg, respectively) in the organic solution during the nanocapsule preparation. For the biological tests were used nanocapsules with final concentration of 5mg.ml⁻¹ of diphenyl diselenide.

2.3. Characterization of nanocapsules

All the analytical data (including figures and graphics) are available at the supporting information file.

2.3.1 Particle size and polydispersity indices

Particle size and polydispersity indices ($n = 3$) were measured by photon correlation spectroscopy after adequate dilution of an aliquot of the suspension in purified water (Zetasizer Nano-ZS-Malvern[®])

2.3.2 Zeta potencial

Zeta potencial was determined after dilution of the samples in 10 mmol.L^{-1} NaCl aqueous solution using Zetasizer Nano Series (Malvern[®])

2.3.3 pH of suspensions

pH values of suspensions were determined, at room temperature, by immersion of the electrode directly in the suspension using a calibrated potentiometer (Digimed[®]).

2.3.4 Determination of drug content

Diphenyl diselenide content (mg.ml^{-1}) was determined ($n = 3$) after dissolution of nanocapsules in acetonitrile/acetone (1:1) and assayed by high performance liquid chromatography – HPLC. The chromatographic system consisted of a VertiSep GES C18 HPLC COLUMN (150mm x 4.6, $5\mu\text{m}$, Standard Female Fittings) and Shimatzu instrument (SCL-10 Avp). The mobile phase at a flow rate of 0.5 ml.min^{-1} consisted of methanol/acetonitrile (50:50% v/v). The volume injected was $10\mu\text{L}$ and diphenyl diselenide was detected at 243 nm. Validation of the HPLC assay demonstrated that the method was linear ($y = 107571x - 24493$, $r^2 = 0.999$, $n = 5$) in the range of 5 - $25\mu\text{g.ml}^{-1}$ and precise (RSD: 0.949% for repeatability and 1.1376% for intermediate

precision). The specificity was tested in presence of the nanocapsule adjuvants and it demonstrated that they did not alter the diphenyl diselenide assay.

2.3.5 Encapsulation efficiency

Free diphenyl diselenide was determined in the clear supernatant, followed by separation of the nanocapsule from aqueous medium by a combined ultrafiltration-centrifugation technique. Encapsulation efficiency (%) was calculated by the difference between the total and free diphenyl diselenide concentrations, which were determined in the nanocapsules (drug content) and in the ultrafiltrate, respectively, using the HPLC method described above.

2.4 Biological Assays

2.4.1 Animals

Male adult Swiss mice (25–30 g) were used. They were obtained from a local breeding colony. The animals were kept in a separate animal room, on a 12 h light/12 dark cycle, in an air conditioned room (22 ± 2 °C). Commercial diet (GUABI, RS, Brazil) and tap water were supplied *ad libitum*. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Santa Maria, Brazil.

2.4.2 Preparation of (PhSe)₂ solution

The solution was weekly prepared and the compound was dissolved in canola oil. The solution was stored at 2–8 °C and it was warmed up to room temperature before use. The choice of the (PhSe)₂ dosage (50 mg/kg) was based in previous publications (SAVEGNAGO ET AL, 2007). (PhSe)₂ solutions and nanocapsule were administered to animals in the morning between 8:00 a.m. and 9:30 a.m. at a dosing volume of 10 ml/kg (body weight). The feed was available *ad libitum* and animals were not fasted prior to dosing.

2.4.3 Experimental Design

Mice were treated by intragastric gavage of either canola oil or (PhSe)₂ (dose of 50 mg/kg body wt.). After administration of (PhSe)₂, three to five mice per group were housed in metabolic cages (1 animal per cage) and urine and faeces were collected at specific times after treatment. Group 1: after 30 minutes and Group 2: after 24 hours;

After this procedure, the whole blood of the samples was collected from anesthetized animals by cardiac puncture. Plasma and red blood cells (RBC) were separated by centrifugation. The organs: brain, liver, lungs, kidneys and adipose tissue were excised. All samples were stored at -20 °C until analysis of the selenium as described in the above section. The control group (animals treated only with unloaded nanocapsules) was used to estimate the amount of endogenous selenium.

2.5 Measurement of Selenium (Se) Levels

The determination of Se levels was performed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICPE-9000; Shimadzu Scientific Instruments). All samples were digested with concentrated nitric acid (1/1, w/v) at 60 °C for 12 hour, after that, they were diluted 10 times with deionized water and analyzed in ICPE. Sample solutions were fed with a peristaltic pump into a manifold. Then, into a reaction coil where the Se was vaporized as free Se and it swept by the inert carrier gas (argon). Se concentrations are expressed as $\mu\text{g Se/g}$ or ml of sample.

2.6 Statistical comparisons

Analysis of variance was performed using one-way ANOVA (levels of selenium in the sample) followed by the Duncan's multiple range. Data are expressed as means \pm S.D. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1 Physicochemical characterization of the nanocapsules

The drug-loaded nanocapsule with 1.56 and 5 mg.ml^{-1} and unloaded nanocapsule suspensions presented macroscopic homogeneous aspect, as well as submicronic sizes, low polydispersity, negative zeta potentials and slightly acid or neutral pH values, as depicted in Table 1.

3.2 Excretion patterns

Figures **1A** and **1B** depict the time course of selenium excretion in urine and faeces, respectively, after oral administration of 50 mg (PhSe)₂/kg body weight to the mice. In the mice treated with (PhSe)₂ free, 40 µg Se/ml were excreted in urine (Figure **1A**) and 9.6 µg Se/g were excreted in the faeces (Figure **1B**) in the first 30 minutes. Over the course of 24 hours, 40 µg Se/ml were excreted in urine and 77 µg Se/g were excreted in faeces. The group treated with diphenyl diselenide nanocapsules [NCS-(PhSe)₂], 240 µg Se/ml were excreted in urine (Figure **1A**) and 0 µg Se/g were excreted in the faeces (Figure **1B**) in the first 30 minutes. Over the course of 24 hours, 32 µg Se/ml were excreted in urine and 13 µg Se/g were excreted in faeces.

3.3 Tissue distribution

The content of selenium (µg/g tissue) in the adipose tissue (Figure **2**) was higher in mice treated with [NCS-(PhSe)₂] (16 ± 9) than those who are treated with free (PhSe)₂ (3.2 ± 0.48). Twenty four hours after, the adipose tissue had the highest selenium content (µg/g tissue), both in free (PhSe)₂ and in nanocapsules containing (PhSe)₂ (75 ± 5.2 and 85 ± 23 , respectively).

Figures **3A** and **3B** show the selenium concentration in plasma and RBC respectively. Plasma levels of selenium were (0.54 ± 0.055 and 0.68 ± 0.10) 30 minutes after administration and (0.74 ± 0.52 and 0.07 ± 0.06) 24 hours after administration of free and [NCS-(PhSe)₂], respectively (Figure **3A**). The content of selenium in the RBC increased (15 ± 1.4) 30 minutes after administration of free (PhSe)₂. The [NCS-(PhSe)₂] increased (9.5 ± 4.8) 30 minutes after administration and gradually decreasing thereafter (Figure **3B**).

The content of selenium was 3.17 ± 0.47 and 15.67 ± 9.03 in liver, 2.1 ± 1.2 and 3.6 ± 4.2 in kidneys, 0.33 ± 0.56 and 0.31 ± 0.37 in brain, 6.2 ± 5.1 and 4.7 ± 3.3 in lungs 30 minutes after administration with free and [NCS-(PhSe)₂], respectively. Over the course of 24 hours, the content was 75.17 ± 5.22 and 85.08 ± 22.85 in liver, 1.7 ± 1.6 and 2.8 ± 1.2 in kidneys, 1.56 ± 1.03 and 1.28 ± 0.73 in brain, 3.4 ± 3.7 and 1.6 ± 0.26 in lungs after administration with free and [NCS-(PhSe)₂](Figure **21S**).

4. Discussion

Recently, organoselenium compounds have been receiving attention in organic synthesis because of the discovery of synthetic application and their pharmacological properties. In special, diphenyl diselenide (PhSe)₂ is an organic compound of selenium that has several pharmacological effects; nevertheless, poor water-solubility and low oral bioavailability can be an obstruction for its clinical utility (PRIGOL et al, 2012, UNDER REVISION a). Therefore, this study aims the preparation of [NCS-(PhSe)₂] searching for an improvement in these parameters.

The nanocapsules physicochemical analysis can supply important information about the stability of this kind of nanoparticles (SCHAFFAZICK et al, 2003). For instance, the particle size can determine the *in vivo* distribution, toxicity and drug release (SINGH AND LILLARD, 2009). When the nanoprecipitation is the used method, the nature and the concentration of the polymer and the surfactant, the polarity of solvent, the nature between the internal and the external phases are important factors to determine the nanocapsule size (MORA-HUERTAS et al, 2010).

The prepared [NCS-PhSe)₂] suspensions of 1.56 mg.ml⁻¹ and 5 mg.ml⁻¹ showed a homogeneous shape with mean sizes around 323 nm and 266 respectively (figure 4). These values are in agreement with the diameters usually observed for nanocapsules prepared with interfacial deposition of preformed polymer methodology (SCHAFFAZICK et al, 2002; MORA-HUERTAS et al, 2010). The low polydispersity for both formulations indicates homogeneous particle distribution.

The zeta potential determines the superficial charge and it can be influenced by the changes in the interface with the environment dispersant. (SCHAFFAZICK et al, 2003; SINGH AND LILLARD, 2009). Generally, zeta potential values lower than -10 mV predict a good colloidal stability due to the high energy barrier between particles (MORA-HUERTAS et al, 2010) and consequently a large repulsive forces that tend to prevent the aggregation as a function of collisions that may occur with adjacent nanoparticles. (SCHAFFAZICK et al, 2003).

The zeta potentials from the [NCS-PhSe)₂] with 1.56 mg.ml⁻¹ showed a average value of -19 mV (figure 5A). For the nanocapsule loaded with 5 mg.ml⁻¹ the zeta potential had an average of -29.1 mV (figure 5B) indicating stable suspensions

for both formulations, as a result of the repulsion between particles avoiding their aggregation (SCHAFFAZICK et al, 2003). In this case, the negative value was obtained because the nanocapsules were prepared with polyester polymer using non-ionic stabilizing agents due to the presence of polymer terminal carboxylic groups (MORA-HUERTAS et al, 2010).

The incorporation charge value of the $(\text{PhSe})_2$ in the nanocapsules was quite effective, with an encapsulation efficiency of 99.9% for both formulations using 1.5 mg.ml^{-1} and 5 mg.ml^{-1} . These results could be explained by the high lipophilicity of $(\text{PhSe})_2$ and its low solubility in water. Based in the analysis described above, it was possible to observe the affinity of $(\text{PhSe})_2$ for the nanoencapsulation technique, allowing the preparation of nanoparticles with high efficiency.

Nanocapsules formulation has a lot of advantages over the conventional drugs in therapy, such as: to improve stability of active substances (KÜLKAMP et al, 2009) and to enhance their pharmacokinetics (ASSIS et al, 2008; WOHLFART et al, 2011; LAMPRECHT et al, 2004; LUO et al, 2011; PELTIER et al, 2006).

For the biological tests was used nanocapsules with the final concentration at 5 mg.ml^{-1} because their lower particle size and higher zeta potential where the tests were realized immediately after the physicochemical analysis.

In addition, our results show some interesting differences between the free and nanoencapsulated diphenyl diselenide. For instance, as depicted in the figure 1, the levels of selenium were more excreted in urine and less excreted in faeces 30 minutes after administration of $[\text{NCS}-(\text{PhSe})_2]$. This result indicate that this new formulation absorbed the drug more than the free compound who is more lipophilic and then it was more excreted in faeces without being metabolized, differently of the $[\text{NCS}-(\text{PhSe})_2]$ due to the entrapped of $(\text{PhSe})_2$ into nanocapsules who are more metabolized and then excreted in urine as depicted in the figure 1. It is in agreement with a previous publication who demonstrated that the compound $(\text{PhSe})_2$ is quickly absorbed by the gastrointestinal tract (PRIGOL et al, 2012, UNDER REVISION b). The difference between those formulations may be related to the polymer which surrounds the $(\text{PhSe})_2$ and covers it in a nanostructure, resulting in an enhanced absorption after oral administration.

This result can be related with previous publications which find that the nanoencapsulation improves the pharmacokinetics when compared with the conventional drug, increasing the efficacy when the same nanocapsule methodology

was applied and poli (ϵ -caprolactone) and polysorbate 80 was prepared according to our formulation (HAAS et al, 2009). It was found, in another study, a reduced excretion of the drug in faeces and increased excretion in urine, suggesting that the enhance of the absorption was after the drug was entrapped into nanoparticles (LUO et al, 2011).

Concerning the oral administration, a study demonstrated the therapeutic potential of non-specific colloidal drug carrier to enhance its bioavailability. It was described by protecting the drug from denaturation in the gastrointestinal lumen or for a prolonged period of time, increasing the drug concentration directly at the surface of the mucus membrane (PONCHEL AND IRACHE, 1998).

Additionally, our results found an equivalent amount of selenium in the brain for the free and nanoencapsulated $(\text{PhSe})_2$, showing that both formulations can pass the blood-brain-barrier. In terms of nanocapsules, these results are in connection with a previous publication, where the authors observe that polysorbate 80 influence in the passage of nanoparticles to the brain (SINGH AND LILLARD, 2009; SOPPIMATH et al, 2001).

With the objective to investigate the transport of drugs bound to nanoparticles into the brain some work absorbed apolipoproteins in nanoparticles using polysorbate 80 as a surfactant and dalargin as a drug. The results show that apo E in the nanostructure prolonged antinociception even in comparison to polysorbate 80 alone. The authors suggest the importance of apo E in mediating the delivery of drug through the blood-brain barrier concluding that polysorbates can act as a holder for the apo E who can facilitate the interaction with the endothelial cells where this endocytotic uptake seems to play an important role. Following this uptake the drug can be released and be able to achieve the inside of the brain by diffusion (KREUTER et al, 2002).

Also was found no significant difference in content of selenium in the plasma 30 minutes after administration. This observation could be related due to the $[\text{NCS}-(\text{PhSe})_2]$ that may be absorbed more effective than the free $(\text{PhSe})_2$. This result could be corroborated due to the significant difference of selenium in urine observed in the excretion tests (figure 1).

In addition, it was possible to observe a large quantity of selenium in RBC, probably because of the passage of bloodstream to RBC, showing agreement with others studies (PRIGOL et al, 2012, UNDER REVISION b).

In conclusion, we described here for the first time the feasibility to prepare [NCS-(PhSe)₂] for oral administration. The nanocapsules prepared by the nanoprecipitation method presented nanometric size range, negative zeta potencial and the great encapsulation efficiency, explained by the very high lipophilicity and the low solubility in water of the (PhSe)₂. The results of *in vivo* studies show a significant reduced excretion of the drug in faeces and increased excretion in urine in mice treated with [NCS-(PhSe)₂] suggesting an enhanced absorption after the drug entrapped into nanoparticles and indicating that nanoencapsulation improves the pharmacokinetics.

5. References

ACKER, C.I., LUCHESE, C., PRIGOL, M., NOGUEIRA, C.W. Antidepressant-like effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion: Involvement of Na⁺K⁺ATPase activity. **Neuroscience Letters**. 455, 168-172, 2009.

ASSIS, D.N., MOSQUEIRA, V.C.F., VILELA, J.M.C., ANDRADE, M.S., CARDOSO, V.N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of ^{99m}Tc Technetium-fluconazole nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**. 349, 152-160, 2008.

BARBOSA, N.B.V., ROCHA, J.B.T., WONDRAČEK, D.C., PEROTTONI, J., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**. 163, 230-238, 2006.

BARRAT, G. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**. 3, 163-171, 2000.

BORGES, L.P., NOGUEIRA, C.W., PANATIERI, R.B., ROCHA, J.B.T., ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chemico-Biological Interactions**. 160, 99-107, 2006.

FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSANGUET, J-Ph., AMMOURY, N., BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**. 55, R1-R4, 1989.

FREITAS, A.S., FUNCK, V.R., ROTTA, M.S., BOHRER, D., MÖRSCHBÄCHER, V., PUNTEL, R.L., NOGUEIRA, C.W., FARINA, M., ASCHNER, M., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. **Brain Research Bulletin**. 79, 77-84, 2009.

FREITAS, A.S., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and analogs are substrates of cerebral rat thioredoxin reductase: a pathway for their neuroprotective effects. **Neuroscience Letters**. 503, 1-5, 2011.

GHISLENI, G., KAZLAUCKAS, V., BOTH, F.L., PAGNUSSAT, N., MIORRANZZA, S., ROCHA, J.B.T., SOUZA, D.O., PORCIÚNCULA, L.O. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: Putative roles of GABAA and 5HT receptors. **Progress in Neuro-psycho-pharmacology & Biological Psychiatry**. 32, 1508-1515, 2008.

HAAS, S.E., BETTONI, C.C., OLIVEIRA, L.K., GUTERRES, S.S., COSTA, T.D. Nanoencapsulation increase quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 34,156-161, 2009.

HEURTAULT, B., SAULNIER, P., PECH, B., PROUST, J., BENOIT, J. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**. 24, 4283-4300, 2003.

INEU, R.P., PEREIRA, M.E., ASCHNER, M., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**. 46, 3023-3029, 2008.

KREUTER, J., SHAMENKOV, D., PETROV, V., RAMGE, P., CYCHUTEK, K., KOCH-BRANDT, C., ALYAUDIN, R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. **Journal of drug targeting**. 10, 317-325, 2002.

KÜLKAMP, I.C., PAESE, K., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**. 32, 2078-2084, 2009.

LAMPRECHT, A., SAUMET, J-L., ROUX, J., BENOIT, J-P. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. **International Journal of Pharmaceutics**. 278, 407-414, 2004.

LUO C-F., WUAN, M., CHEN, M-S., LIU S-M., ZHU, L., HUANG, B-Y. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of puerarin solid nanoparticles following oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**. 410, 138-144, 2011.

MORA-HUERTAS, C.E., FESSI, H., ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Pharmaceutical Nanotechnology**. 385, 113-142, 2010.

MUGESH, G., MONT, W-W., SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chemical Reviews**. 101, 2125-2179, 2001.

NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**. 104, 6255-6285, 2004.

PAULMIER, C. Selenoorganic functional groups, In: Paulmier, C. (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, 1 ed. **Pergamon Press, Oxford**, pp. 25-51.

PELTIER, S., OGER, J-M., LAGARCE, F., COUET, W., BENOÎT, J-P. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. **Pharmaceutical Research**. 23, 1243-1250, 2006.

PONCHEL, G., IRACHE, J-M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 34, 191-219, 1998.

POSSER, T., FRANCO, J.L., SANTOS, D.A., RIGON, A.P., FARINA, M., DAFRÉB, A.L., ROCHA, J.B.T, LEAL, R.B. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. **Brain research**. 1199, 138-147, 2008.

PRIGOL, M., LUCHESE, C., PINTON, S., FERREIRA. M., SANTOS, J.P.A., KARKOW, A.K., MORTARI, .A.C., NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide induces anxiolytic-like and sedative effects on the chick social separation-stress behavior. **Neuroscience Letters**. 495, 140-143, 2011.

PRIGOL, M. NOGUEIRA, C.W. ZENI, G. BRONZE, M.R., CONSTANTINO, L. Physicochemical and biochemical profiling of diphenyl diselenide. **Toxicology in Vitro**. 2012, under revision. a

PRIGOL, M. BRÜNING, C.A., MARTINI, F., NOGUEIRA, C.W. Comparative excretion and tissue distribution of selenium in mice and rats following treatment with diphenyl diselenide. 2012, under revision. B

ROCHA, J.T., GAI, B.M., PINTON, S., SAMPAIO, T.B., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Effects of diphenyl diselenide on depressive-like behavior in ovariectomized mice submitted to subchronic stress: involvement of the serotonergic system. **Psychopharmacology**. Vol 221. 2012. On line. DOI 10.1007/s00213-012-2675-3.

ROSA, R.M., MOURA, D.J., SILVA, A.C.R., SAFFI, J. HENRIQUES, J.A.P. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. **Mutation Research**. 631, 44-54, 2007.

SANTOS, F.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., WEIS, S.N., FACHINETTO, J.M., FAVERO, A.M., NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chemico-Biological Interactions**. 151, 159-165, 2005.

SAVEGNAGO, L., JESSE, C.R., PINTO, L.G., ROCHA, J.B.T., BARANCELLI, D.A., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: Involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 88, 418-426, 2008.

SAVEGNAGO, L., PINTO, L.G., JESSE, C.R., ALVES, D., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**. 555, 129-138, 2007.

SAVEGNAGO, L., TREVISAN, M., ALVES, D., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 21, 86-92, 2006.

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

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

SILVA, M.H., ROSA, E.J.F., CARVALHO, N.R., DOBRACHINSKI, F. ROCHA, J.B.T., MAURIZ, J.L., GALLEGGO, J.G., SOARES, F.A.A. Acute brain damage induced by acetaminophen in mice: effect of diphenyl diselenide on oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Neurotoxicity Research**. 21, 334-344, 2012.

SINGH, R., LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**. 86, 215-223, 2009.

SOPPIMATH, K.S., AMINABHAVI, T.M., KYLKARNI, A.R., RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**. 70, 1-20, 2001.

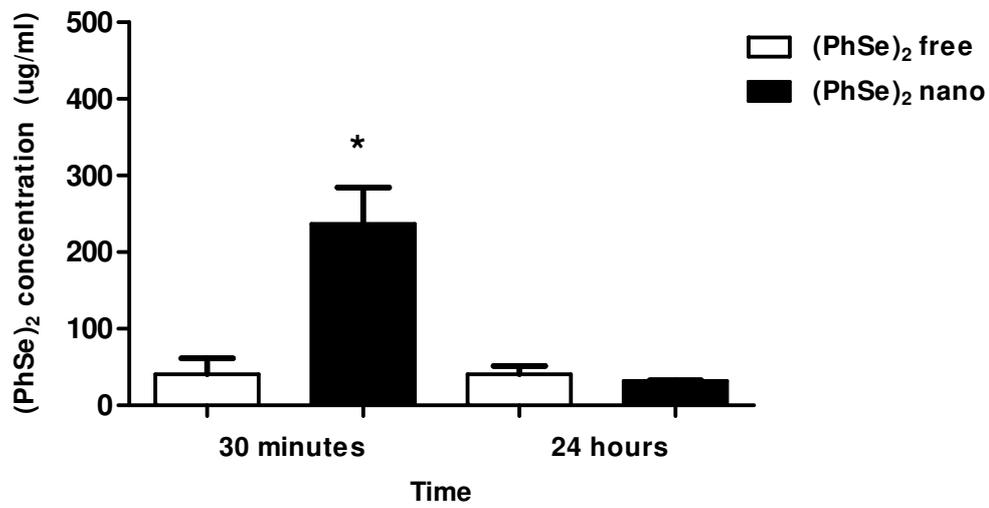
WOHLFART, S., KHALANSKY, A.S., GELPERINA, S., BEGLEY, D., KREUTER, J. Kinetics of transport of doxorubicin bound to nanoparticles across the blood-brain barrier. **Journal of Controlled Release**. 154, 103-107, 2011.

Table 1

Physicochemical parameters of diphenyl diselenide loaded and unloaded nanocapsules (n=3, mean \pm S.D.)

	Diphenyl diselenide loaded nanocapsules* (1.56 mg.ml ⁻¹)	Diphenyl diselenide unloaded nanocapsules*	Diphenyl diselenide loaded nanocapsules (5 mg.ml ⁻¹)
Particle size [nm]	323.4 \pm 6.9	325 \pm 21.34	266.7 \pm 24
Polydispersity index	0.2 \pm 0.01	0.2 \pm 0.04	0.18 \pm 0.02
Surface charge [mV]	-19.3 \pm 2.9	-25.1 \pm 11.56	-29.1 \pm 2.7
pH	6.32 \pm 0.5	6 \pm 0.22	5.67 \pm 1.17
Encapsulation efficiency [%]	99.97 \pm 0.00		99.93 \pm 0.04

A



B

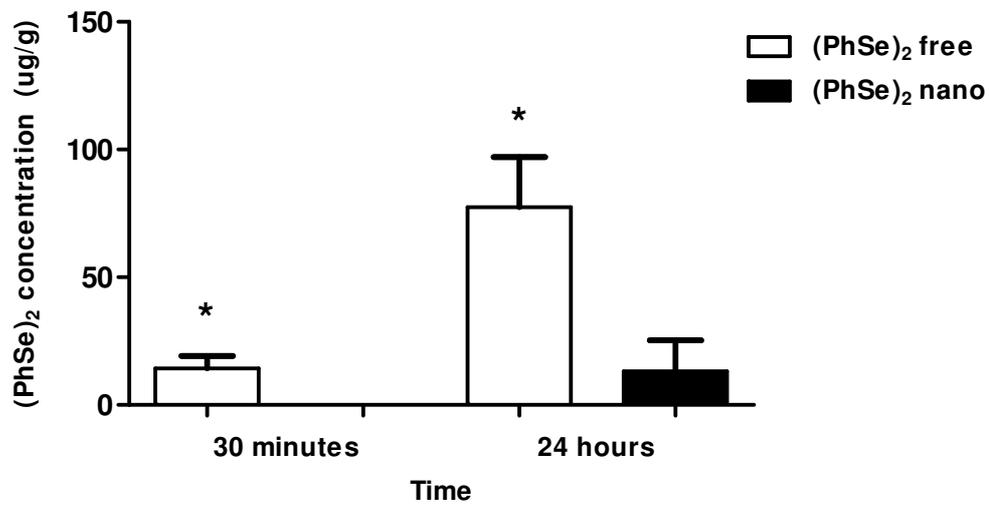


Figure 1: Excretion of selenium following administration of 50 mg/kg (PhSe)₂ free and nano to mice by gavage. For urine (A) and faeces (B), each time point represents the average of three to five individual mice.

Figure 2

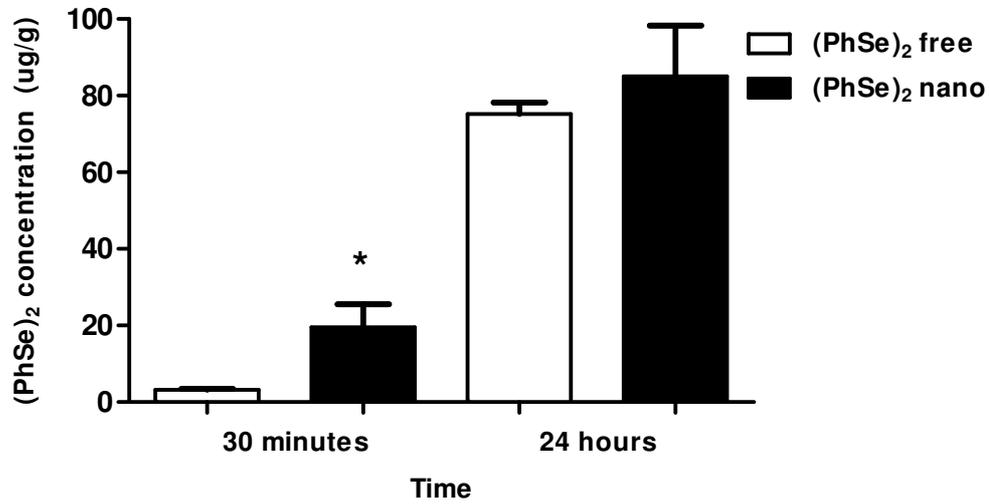
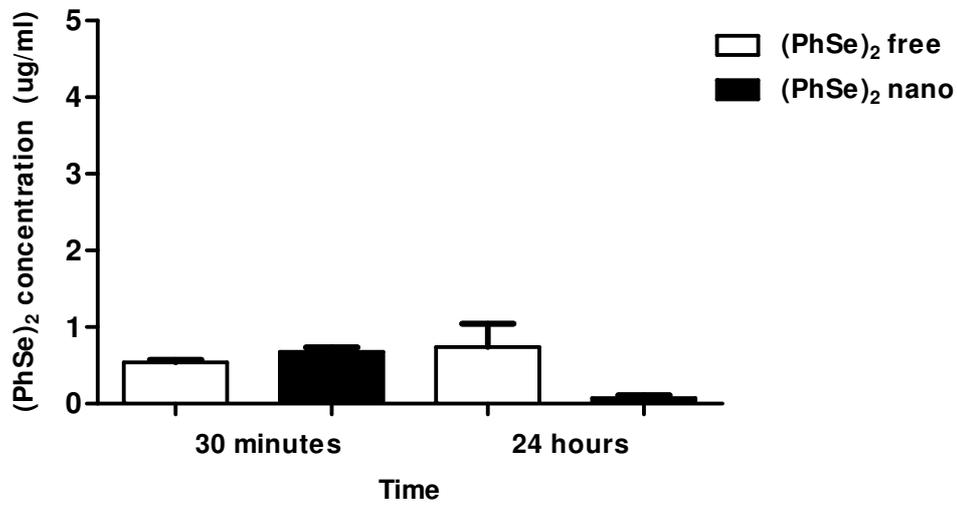


Figure 2: Amount of selenium in the adipose tissue after administration of 50 mg/kg (PhSe)₂ free and nano to animals by gavage. Each time point represents the average of three to five individual mice.

A



B

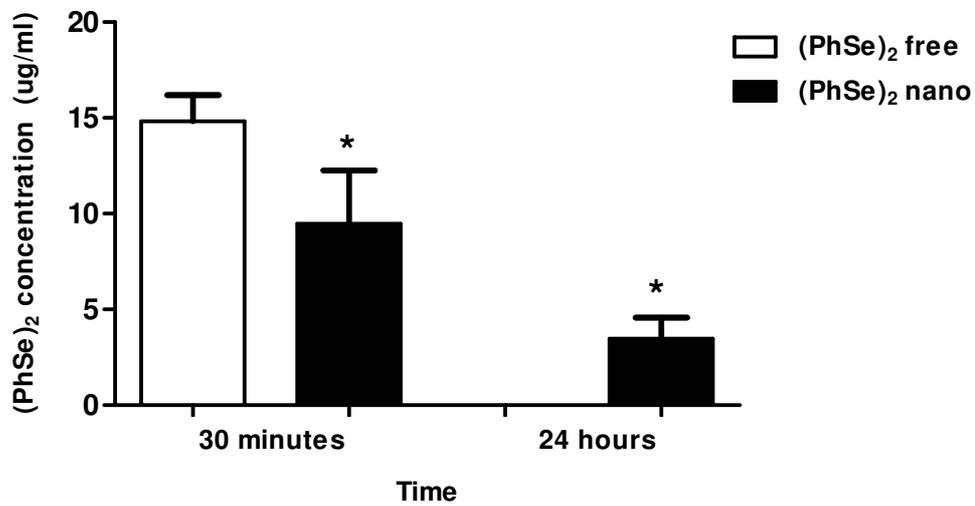


Figure 3: Amount of selenium in (A) plasma and (B) RBC after administration of 50 mg/kg (PhSe)₂ free and nano to animals by gavage. Each time point represents the average of three to five individual mice.

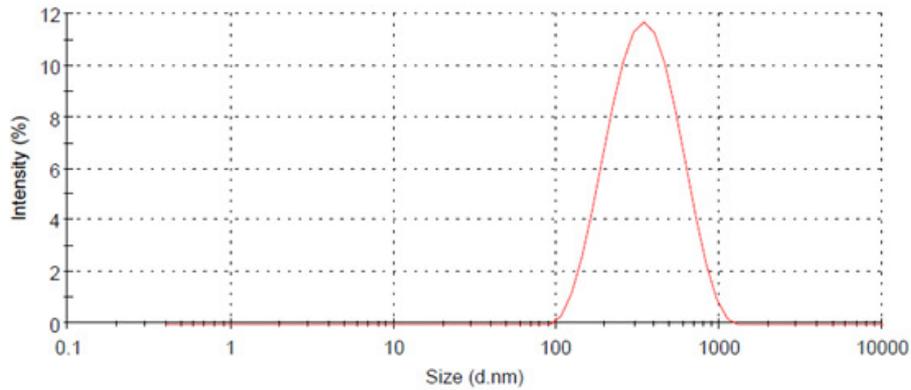
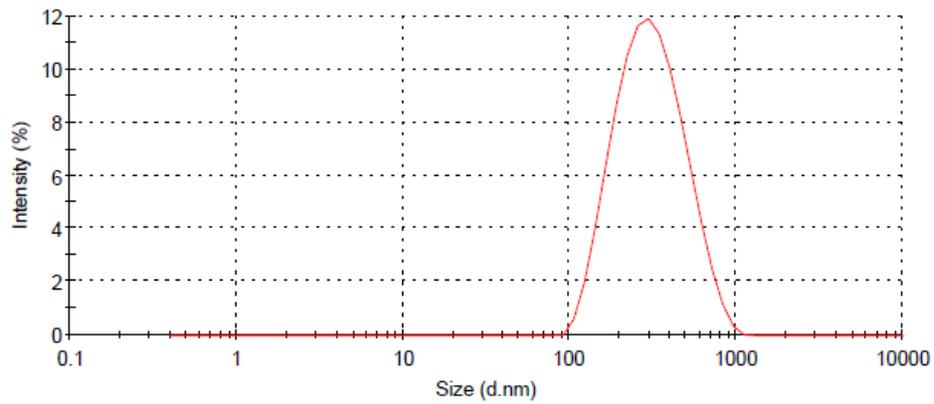
A**B**

Figure 4 – Representative particle size distribution for the formulation of nanocapsule of $(\text{PhSe})_2$. (A) nanocapsules containing 1.56 mg.ml^{-1} of diphenyl diselenide; (B) correspond the nanocapsules containing 5 mg.ml^{-1} of diphenyl diselenide.

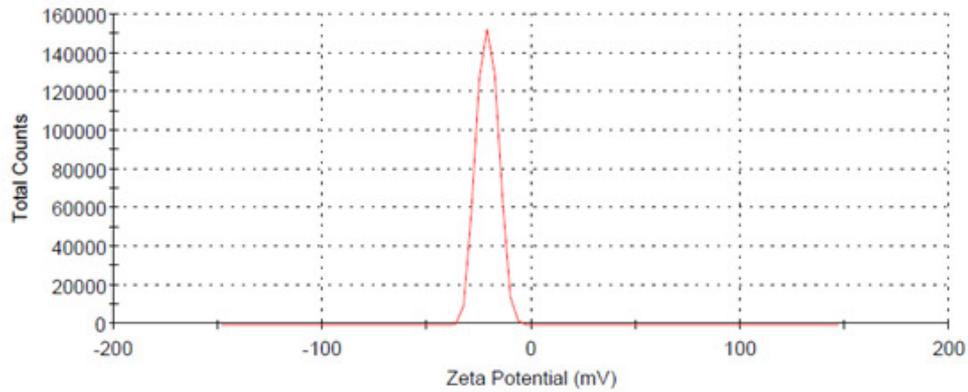
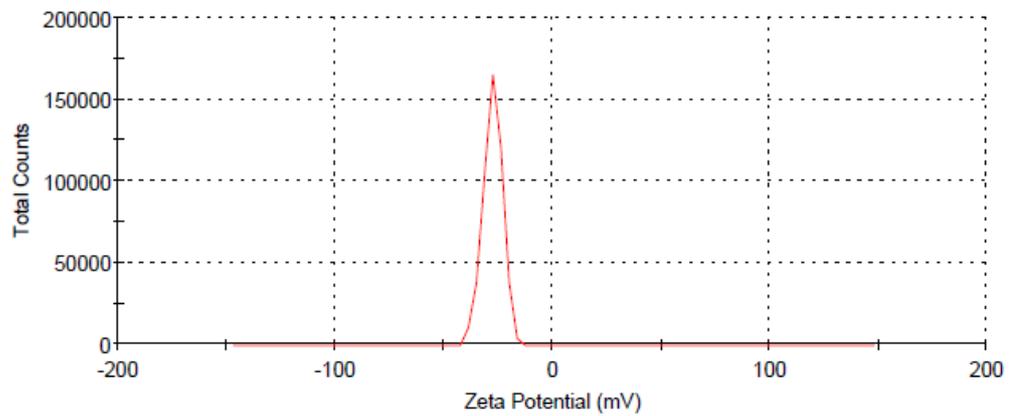
A**B**

Figure 5 – Representative zeta potential for the formulation of nanocapsule of $(\text{PhSe})_2$. (A) nanocapsules containing 1.56 mg.ml^{-1} of diphenyl diselenide; (B) correspond the nanocapsules containing 5 mg.ml^{-1} of diphenyl diselenide.

Supplemental Materials

for

DIPHENYL DISELENIDE NANOCAPSULES: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL DISTRIBUTION

Materials and Methods

Method validation

The analytical validation criteria followed by the Guide for Validation of Analytical and bioanalytical ANVISA and the parameters evaluated were linearity, intermediate precision, repeatability and accuracy

Linearity and calibration curve

Concentration µg/mL	Areas			Mean ± DP	DPR (%)
5 µg/mL	537163	513216	564531	538303 ± 25676	4.77
10 µg/mL	1012586	1042299	1083513	1046132 ± 35618	3.4
15 µg/mL	1567178	1547839	1527290	1547435 ± 19947	1.29
20 µg/mL	2076089	2196961	2104055	2125701 ± 63276	2.98
25 µg/mL	2603925	2655240	2804231	2687798 ± 104046	3.87

Table 1S – Mean of areas relating to different concentrations of (PhSe)₂ to prepare the calibration curve by HPLC.

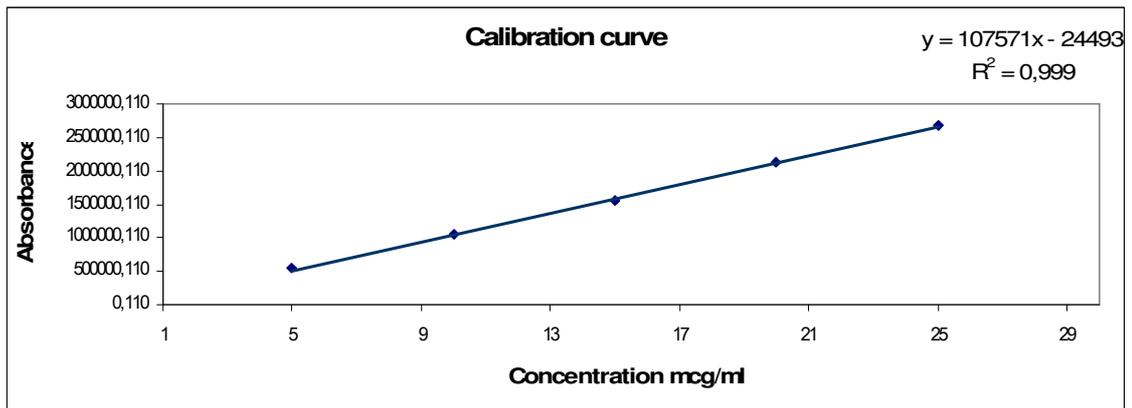


Figure 1S – Calibration curve was obtained through studies of linear regression between the concentration of $(\text{PhSe})_2$ and its respective area, obtaining a correlation coefficient of 0.999.

Selectivity/Specificity

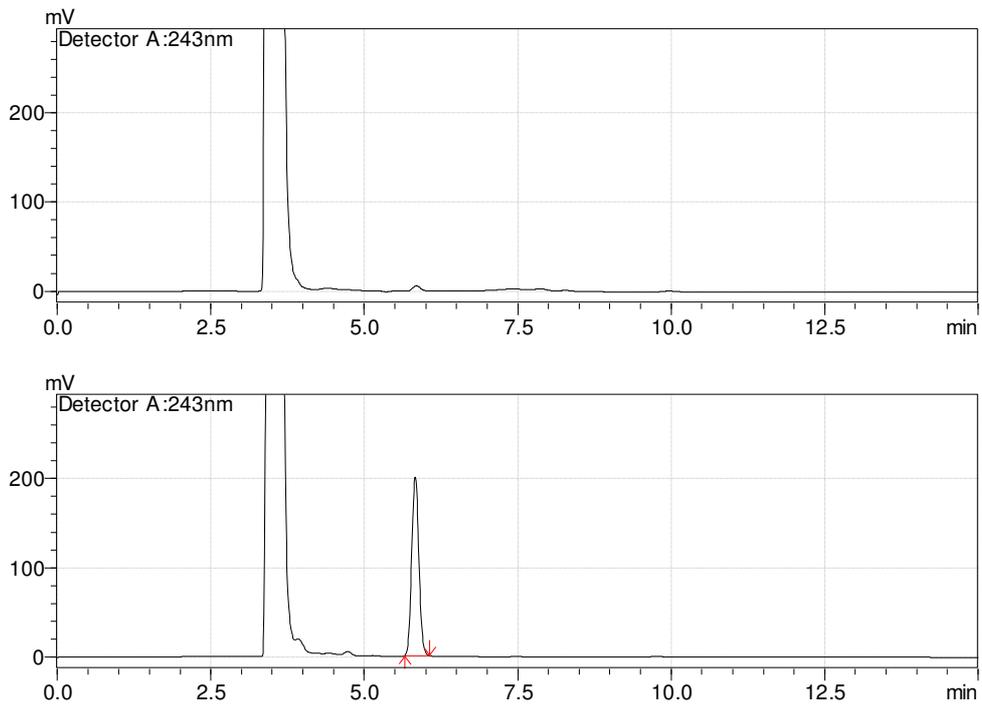


Figure 2S – Chromatogram of uncoated nanocapsules (a) and coated nanocapsules of $(\text{PhSe})_2$.

Repeatability

Repetitions	Content (%)	Mean \pm DP	DPR (%)
N1	101.87		
N2	101.78		
N3	100.88		
N4	99.64	101.3 \pm 0.9616	0.9493
N5	101.23		
N6	102.37		

Table 2S – Experimental values obtained for the test of repeatability for the quantification of (PhSe)₂ in nanocapsules suspensions.

Intermediate precision

Dia	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Analyst 1		Analyst 2		Mean of the day \pm DP (%)	DPR of the day (%)
		Content of the sample ($\mu\text{g/mL}$) (%)					
1 ^o dia	15.6 ($\mu\text{g/mL}$)	16.0	102.38	15.5	99.64	100.5 \pm 1.7	1.7
		15.9	101.92	15.7	100.79		
		15.2	97.70	15.7	100.54		
2 ^o dia	15.6 ($\mu\text{g/mL}$)	15.7	100.54	15.5	99.37	101.2 \pm 1.2	1.1
		16.0	102.66	15.8	101.17		
		15.9	101.69	15.9	101.99		

Table 3S – Experimental values obtained for the testing of intermediate precision by different analysts for the quantification of $(\text{PhSe})_2$ in nanocapsules

Accuracy

Theoretical concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Concentration recovered ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
7.8		
11.7	11.5	98.6
15.6	15.5	99.7
19.5	19.5	99.8
23.4	23.0	98.3

Table 4S – Experimental values obtained for the test of accuracy of $(\text{PhSe})_2$ in nanocapsules.

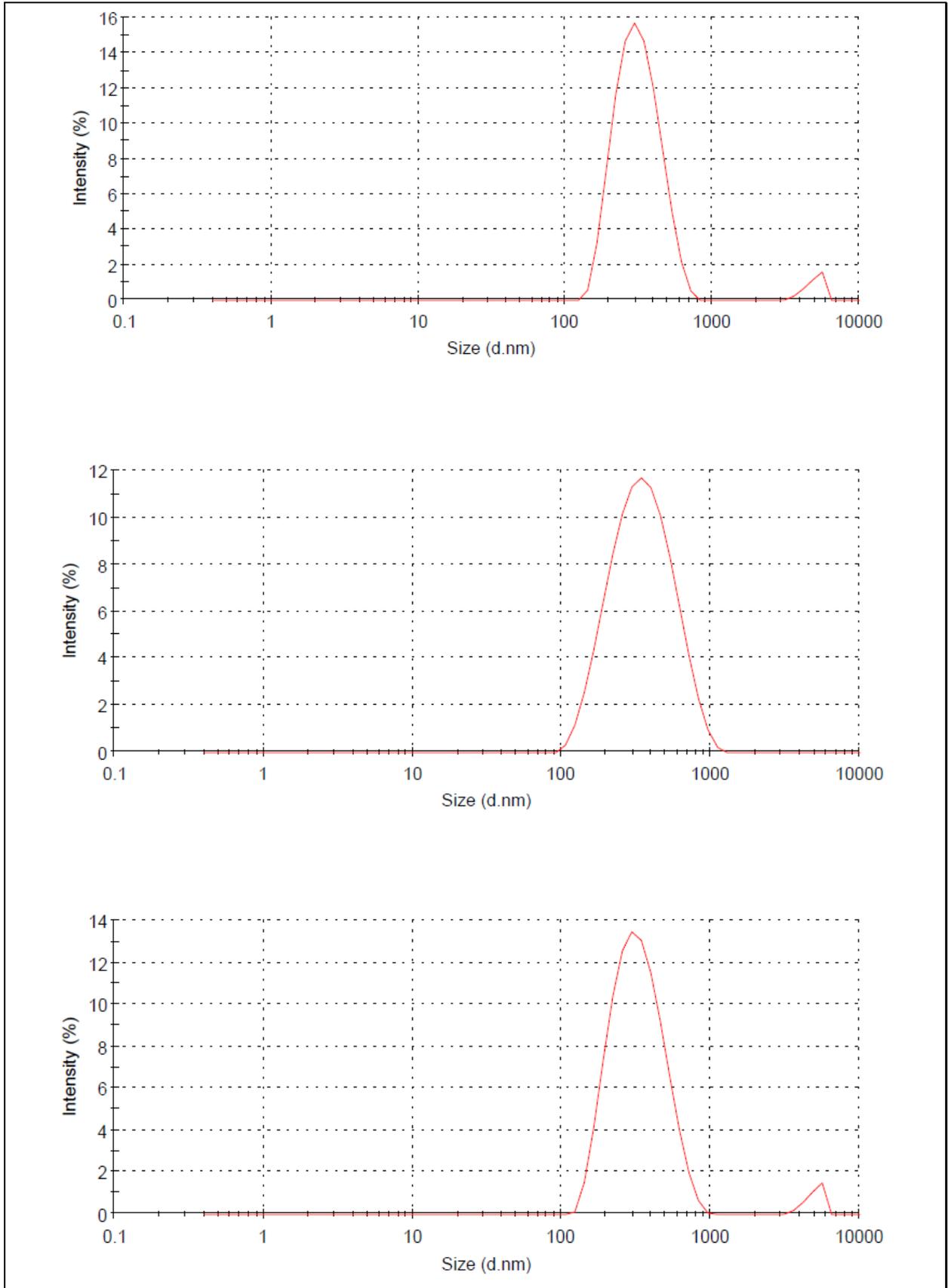


Figure 3S – Particle size distribution in triplicate for the first formulation of nanocapsule containing 1.56 mg.ml^{-1} of $(\text{PhSe})_2$.

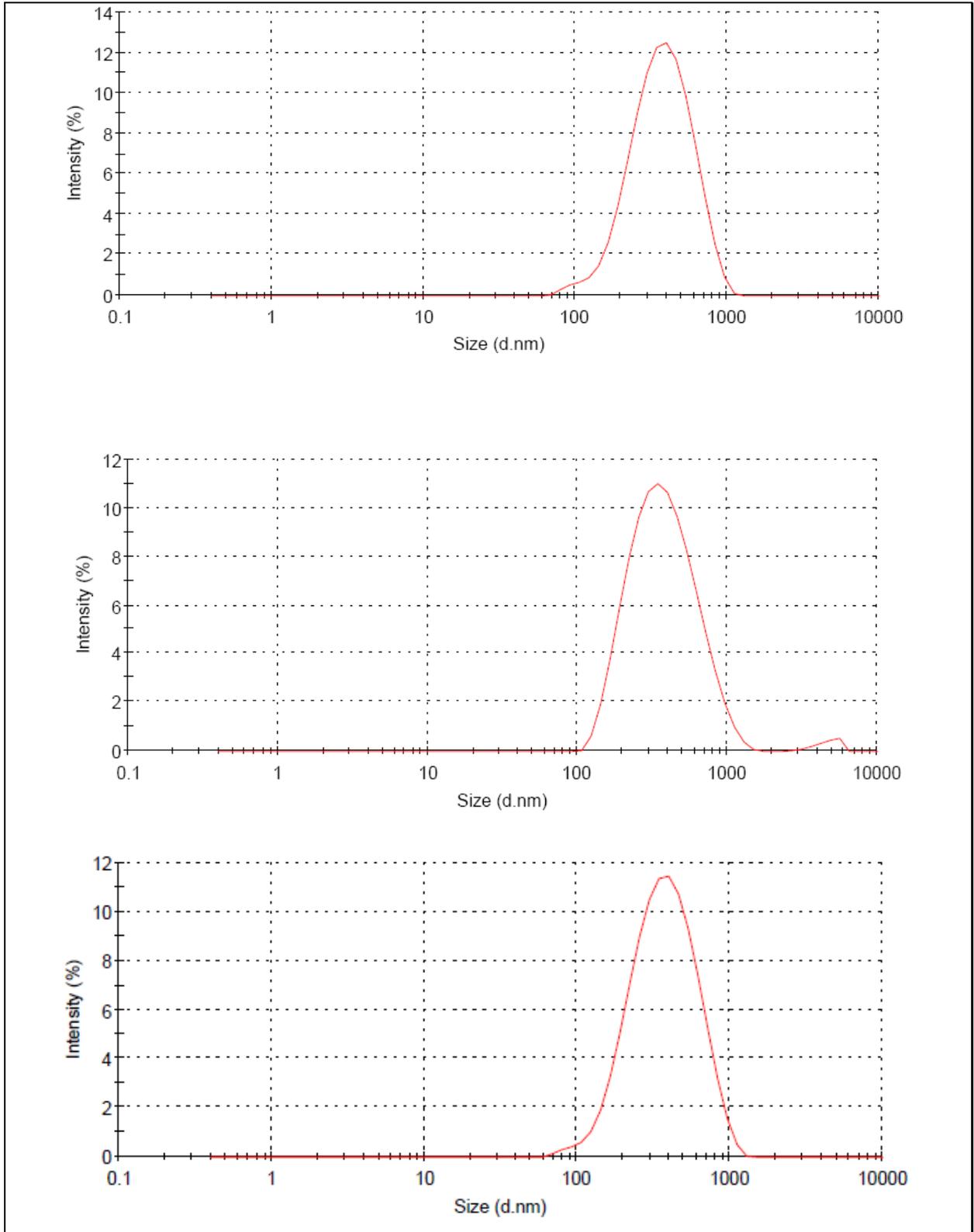


Figure 4S – Particle size distribution in triplicate for the second formulation of nanocapsule containing 1.56 mg.ml^{-1} of $(\text{PhSe})_2$.

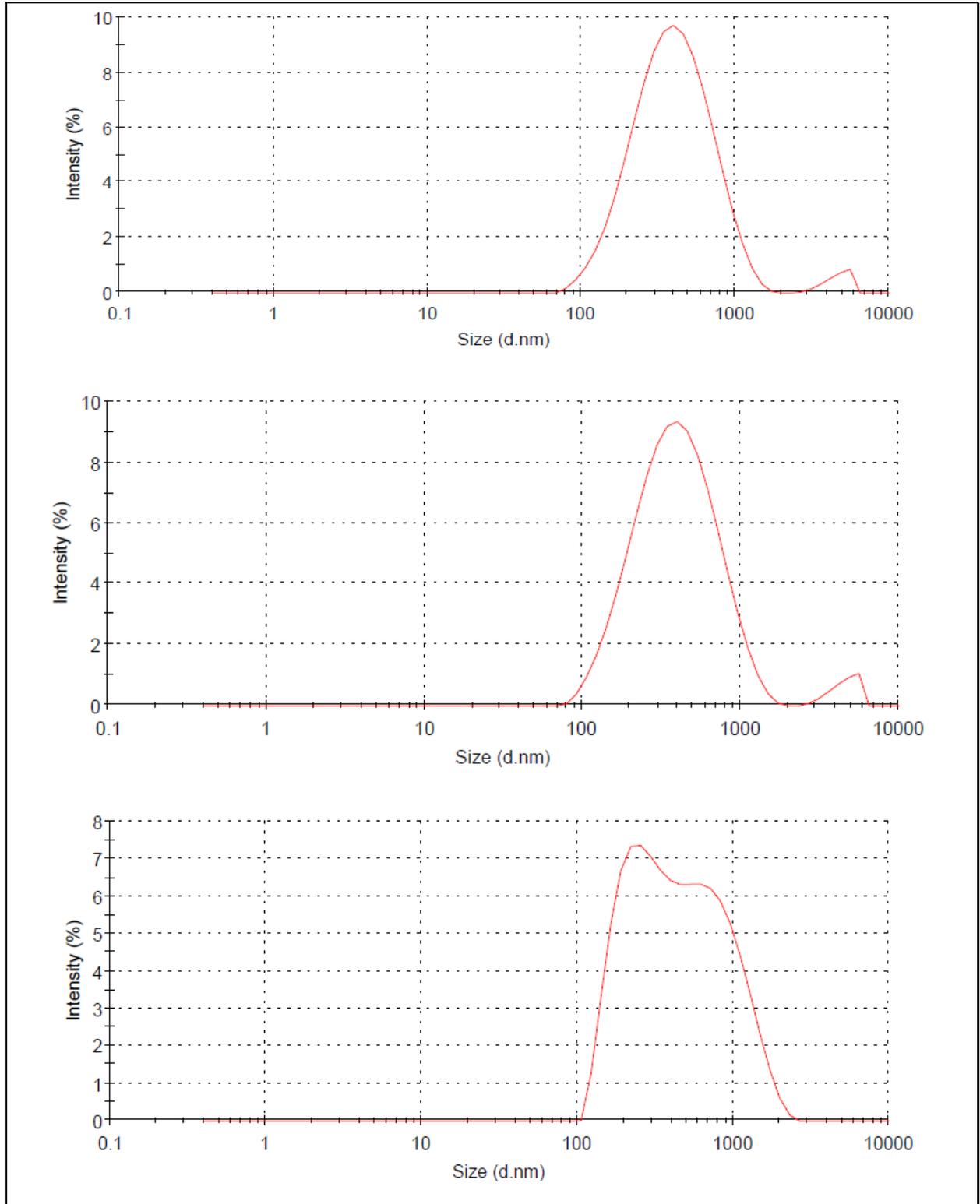


Figure 5S – Particle size distribution in triplicate for the third formulation of nanocapsule containing 1.56 mg.ml^{-1} of $(\text{PhSe})_2$.

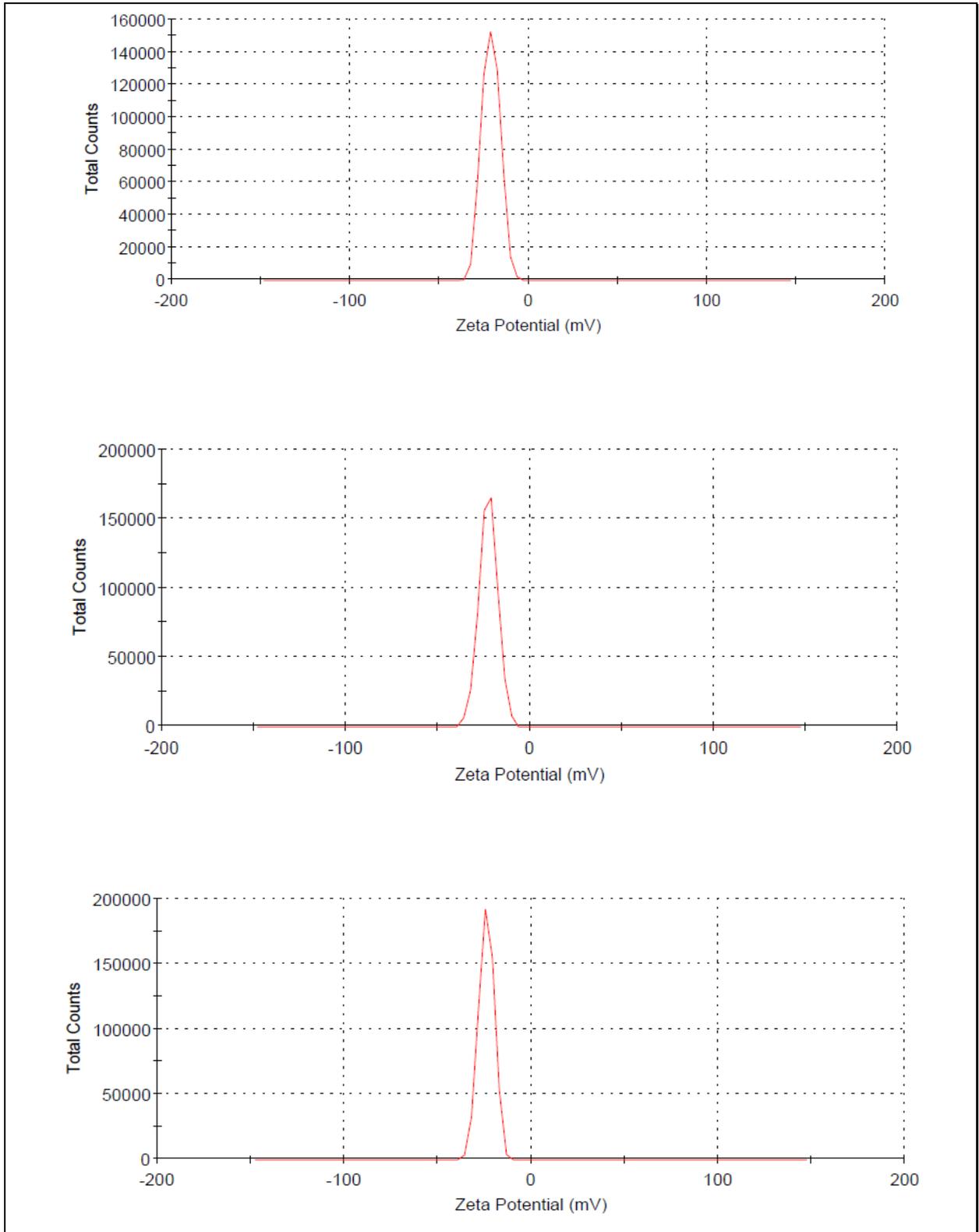


Figure 6S – The zeta potential in triplicate for the first formulation of nanocapsule containing 1.56 mg.ml^{-1} of $(\text{PhSe})_2$.

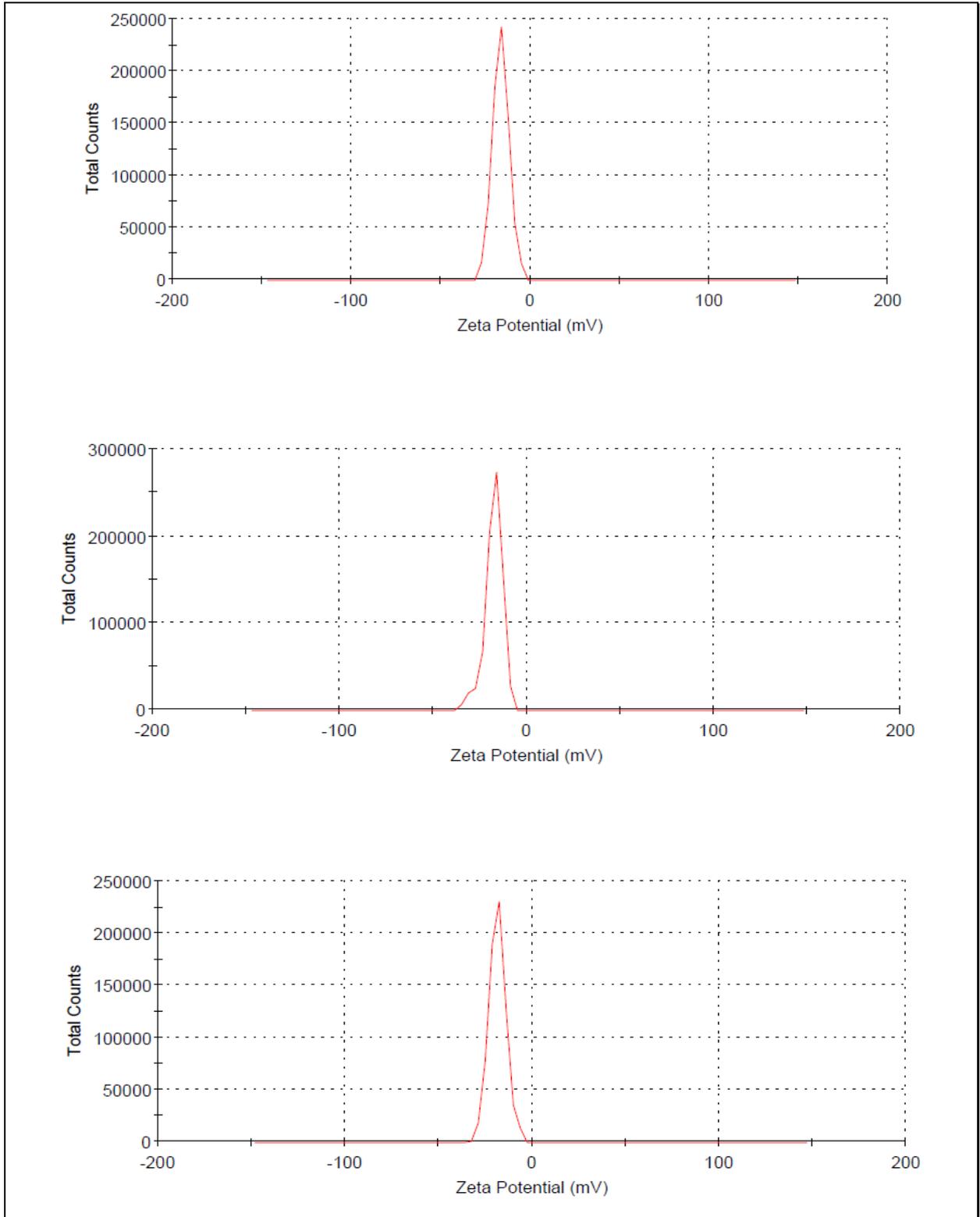


Figure 7S – The zeta potential in triplicate for the second formulation of nanocapsule containing $1.56 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ of $(\text{PhSe})_2$.

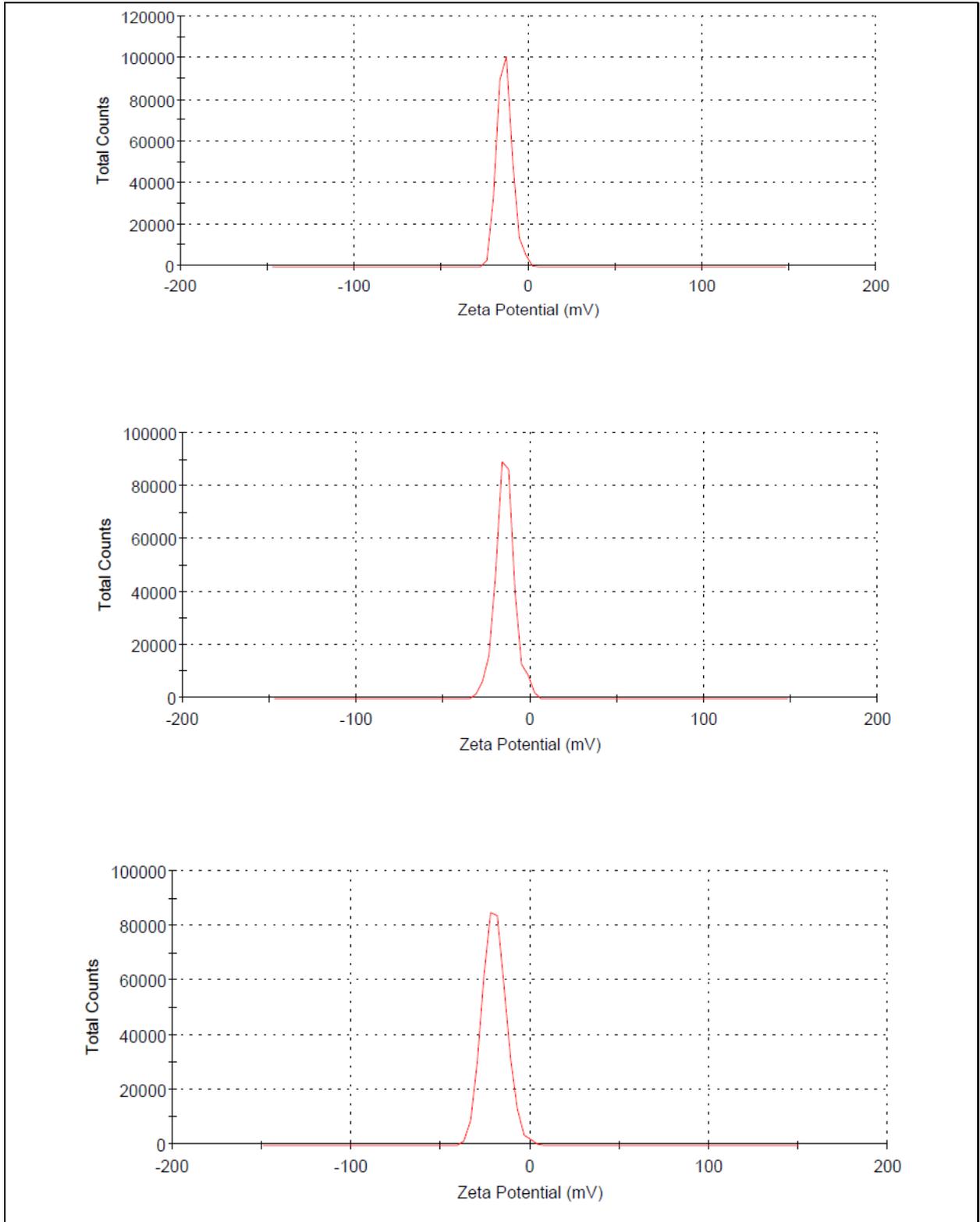


Figure 8S – The zeta potential in triplicate for the third formulation of nanocapsule containing 1.56 mg.ml^{-1} of $(\text{PhSe})_2$.

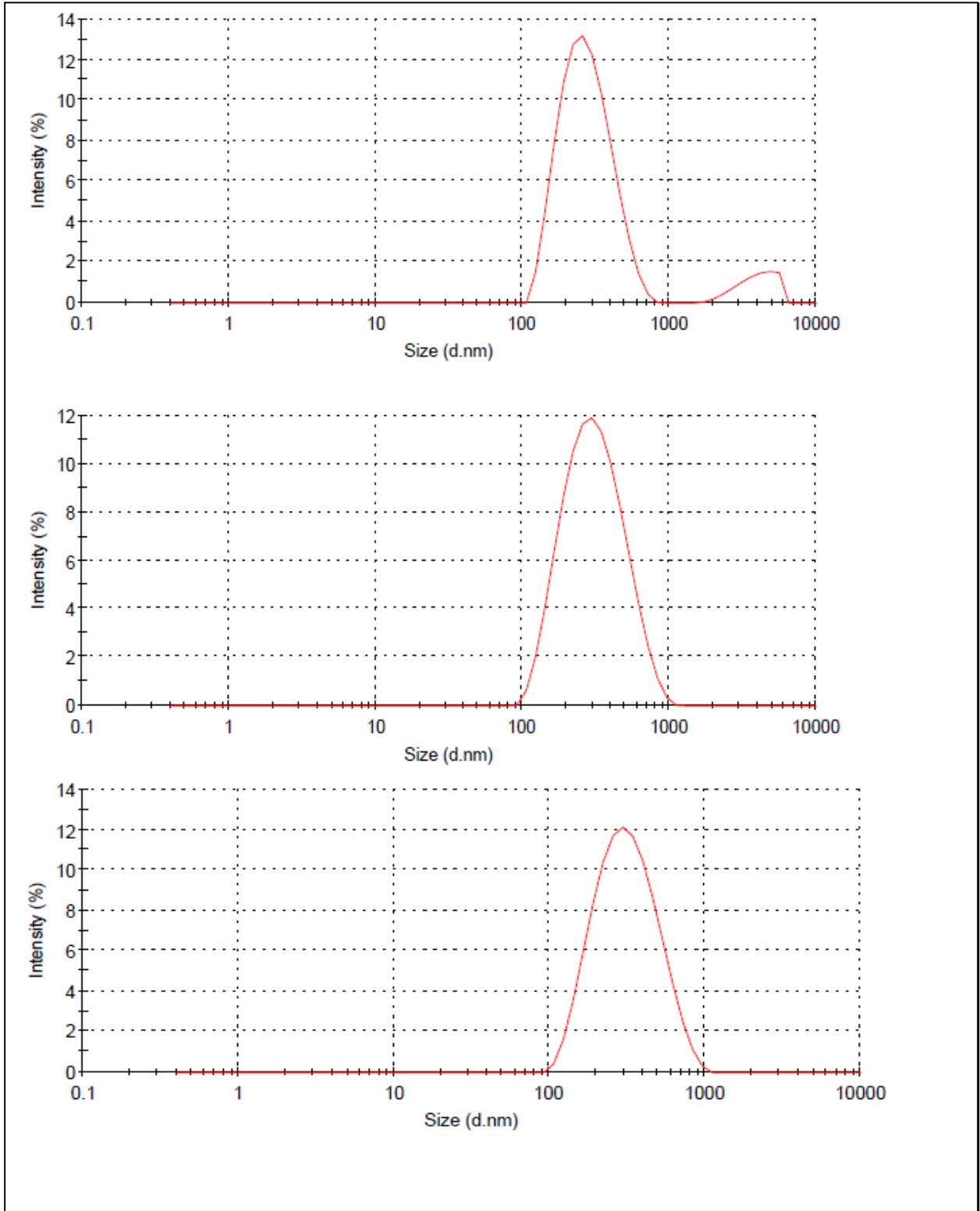


Figure 9S – The particle size for the first formulation of nanocapsule containing $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ of $(\text{PhSe})_2$.

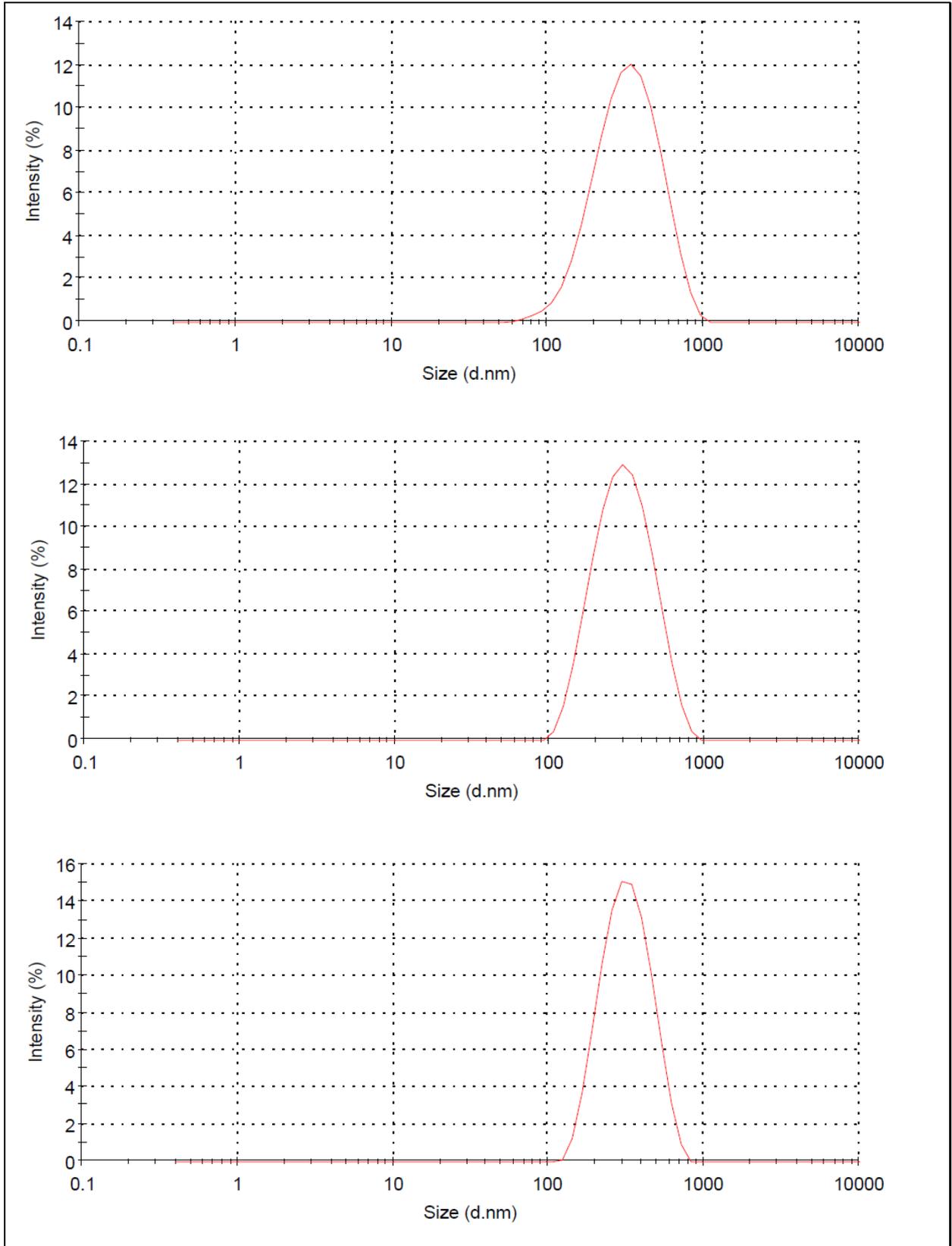


Figure 10S – The particle size for the second formulation of nanocapsule containing 5mg.ml^{-1} of $(\text{PhSe})_2$.

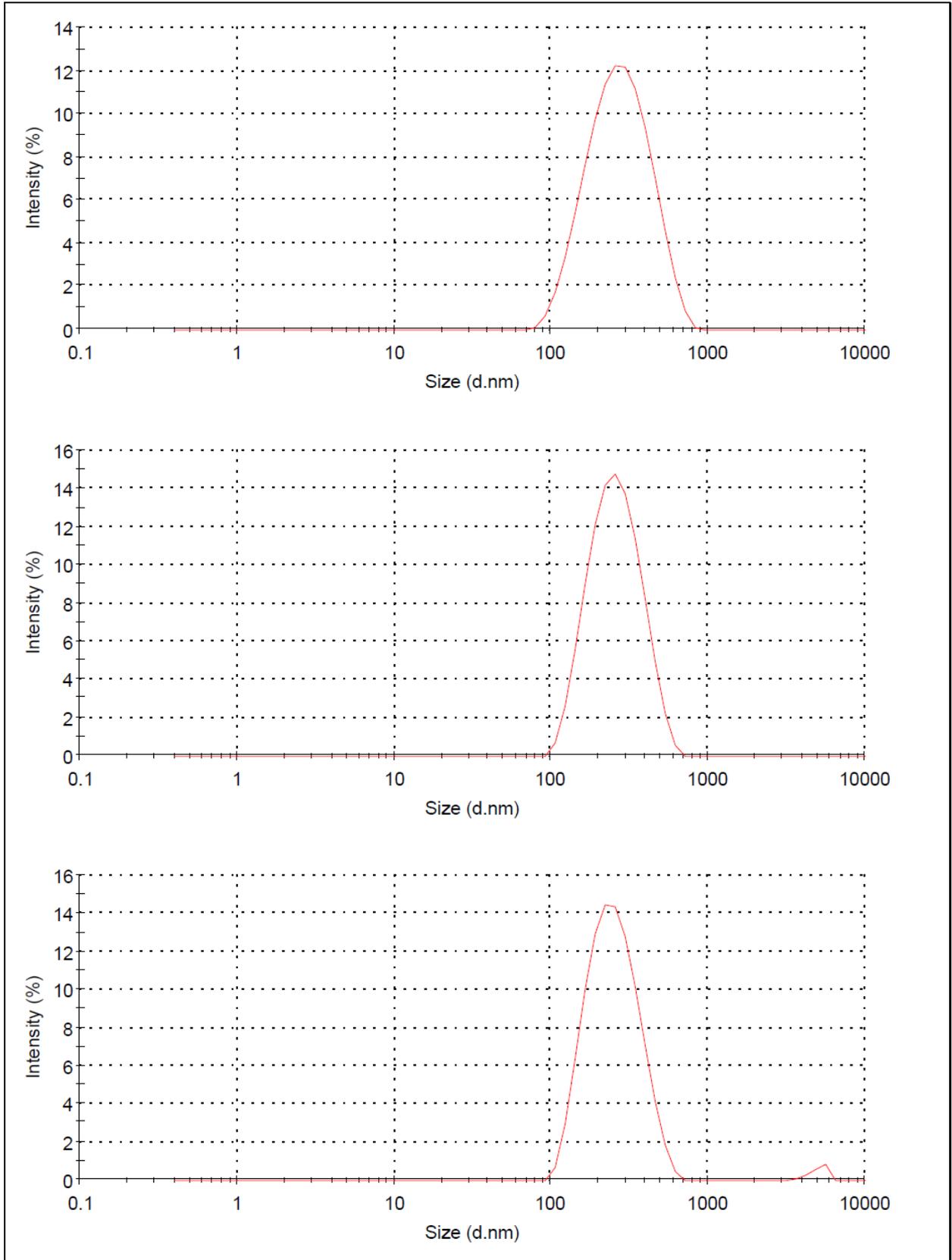


Figure 11S – The particle size for the third formulation of nanocapsule containing $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ of $(\text{PhSe})_2$.

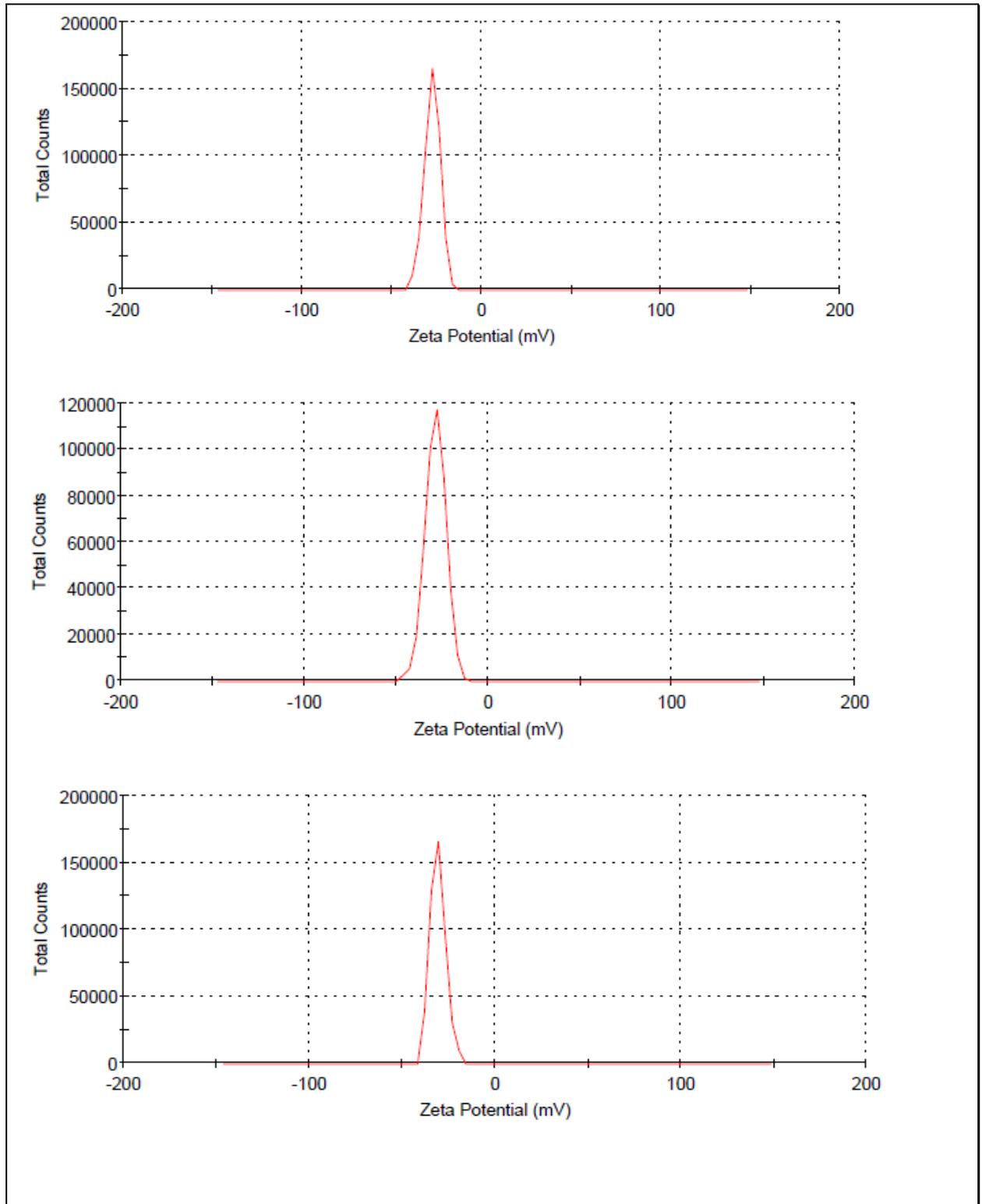


Figure 12S – The zeta potential for the first formulation of nanocapsule containing $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ of $(\text{PhSe})_2$.

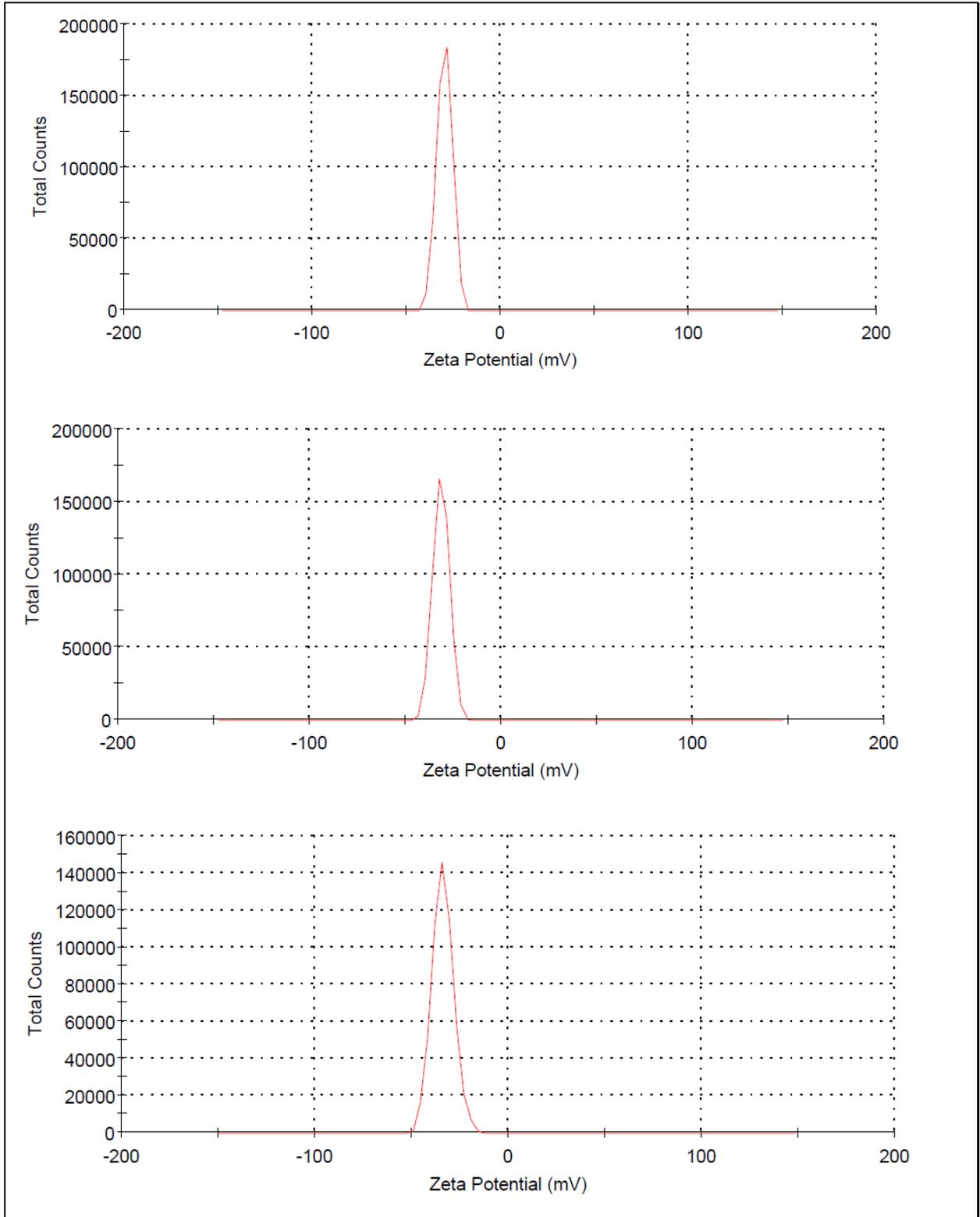


Figure 13S – The zeta potential for the second formulation of nanocapsule containing $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ of $(\text{PhSe})_2$.

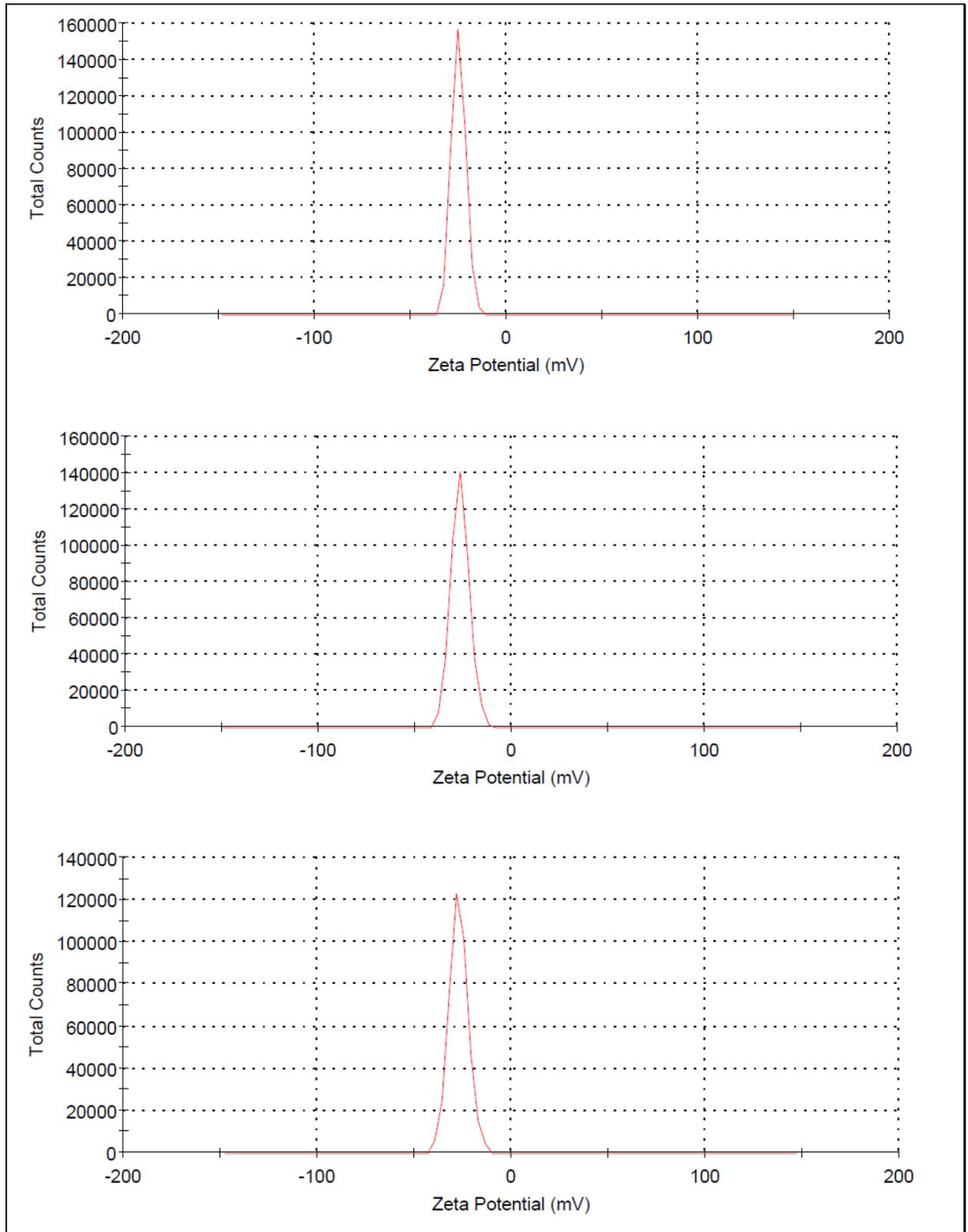


Figure 14S – The zeta potential for the third formulation of nanocapsule containing $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ of $(\text{PhSe})_2$.

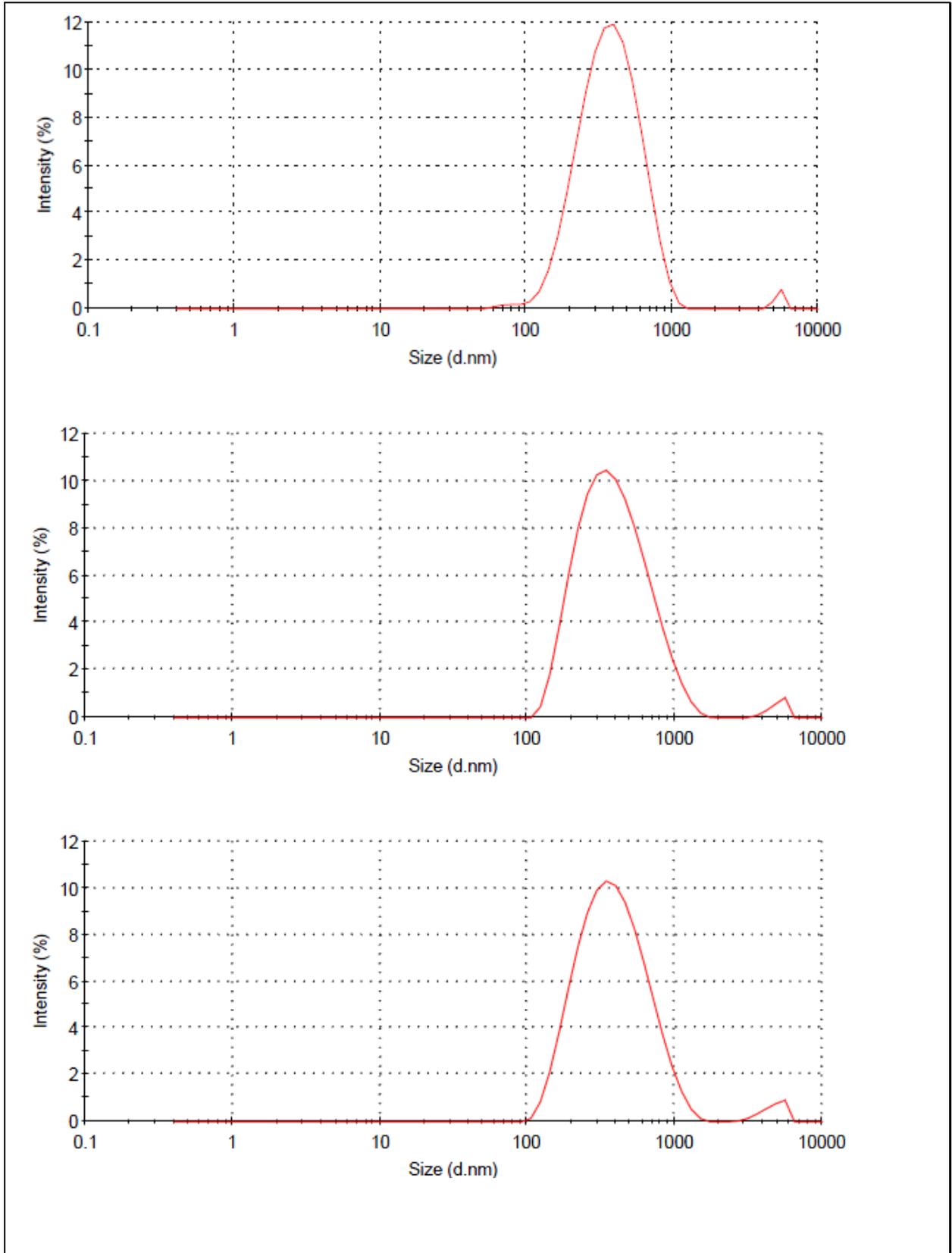


Figure 15S – The particle size for the first formulation of unloaded nanocapsule.

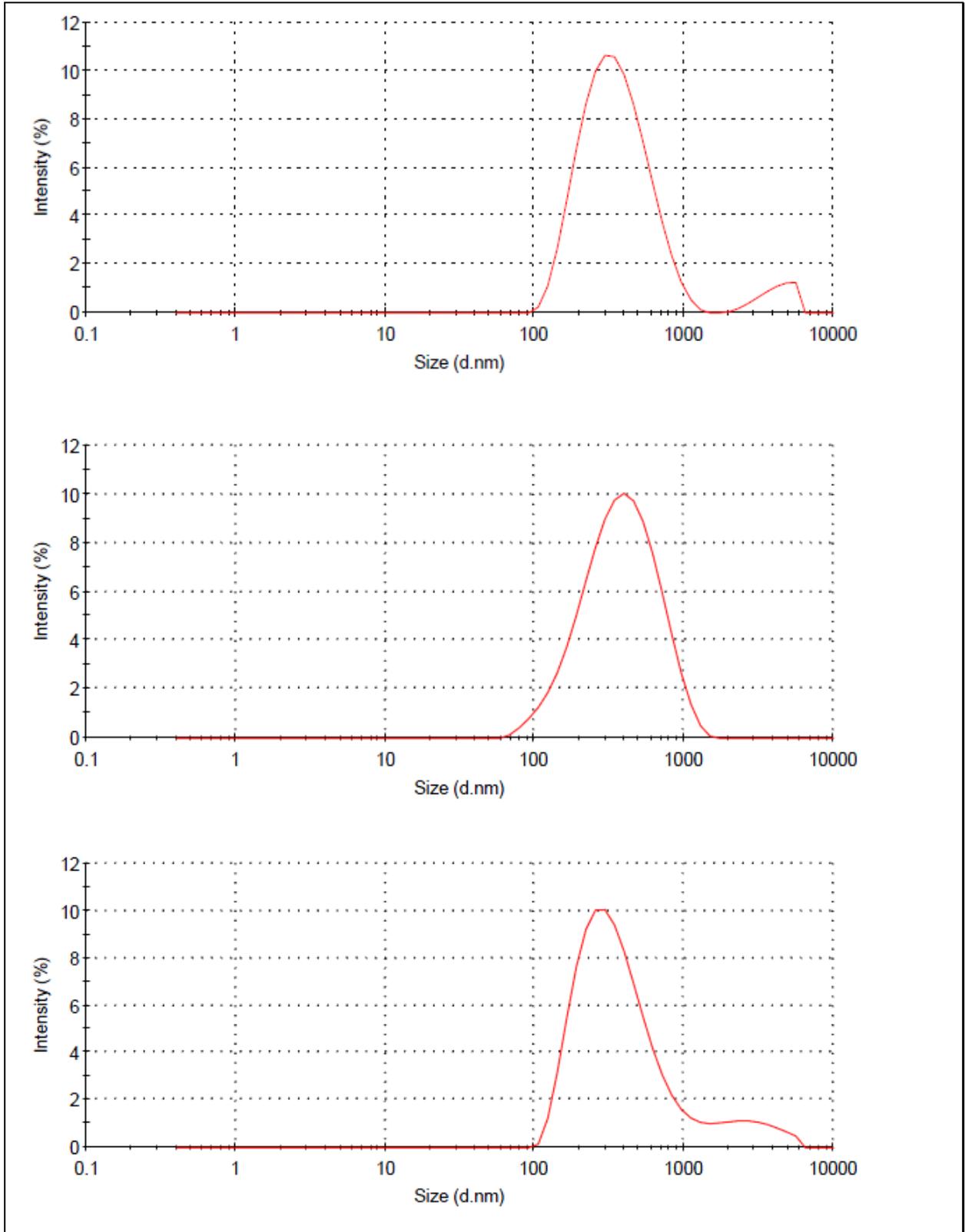


Figure 16S – The particle size for the second formulation of unloaded nanocapsule.

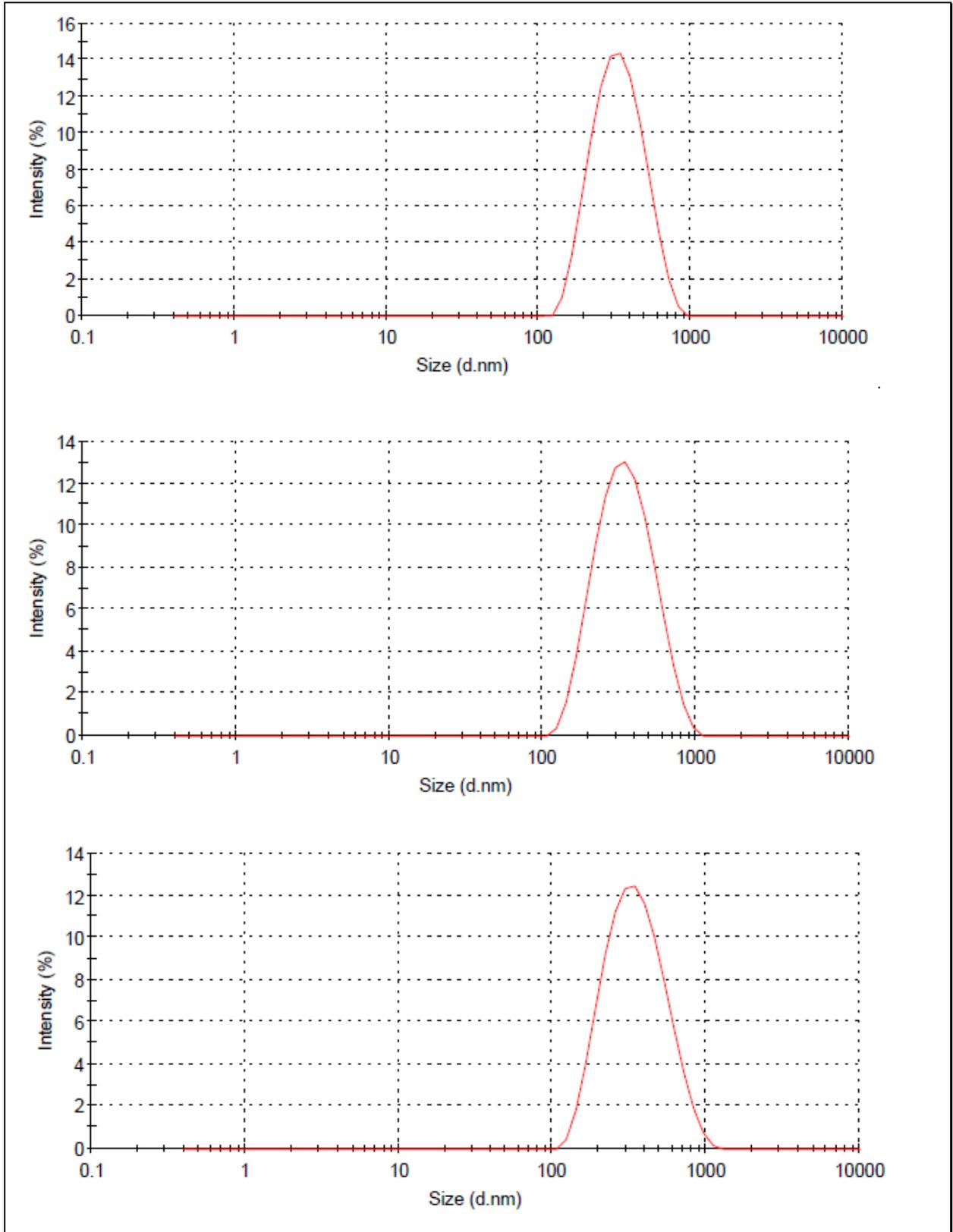


Figure 17S – The particle size for the third formulation of unloaded nanocapsule.

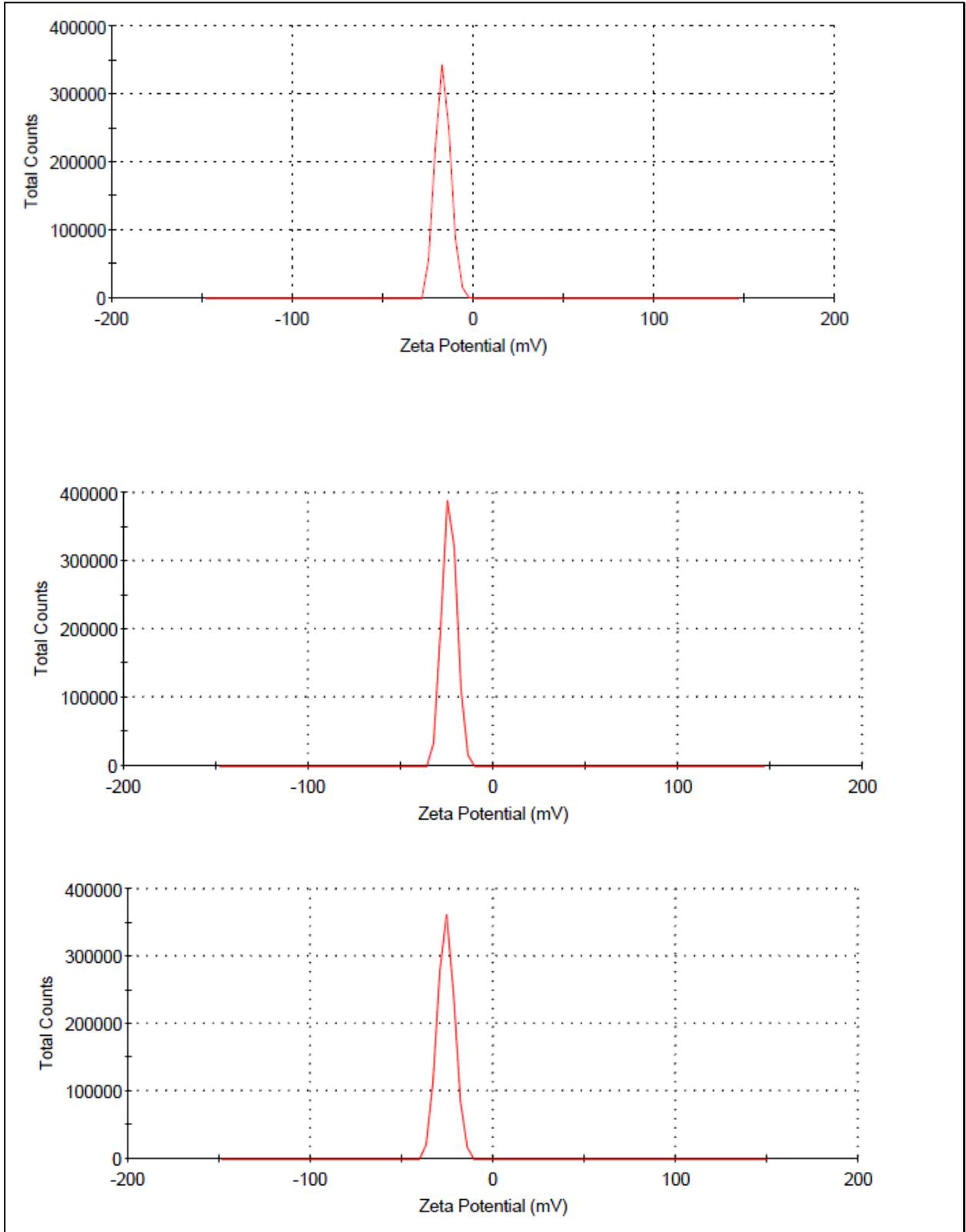


Figure 18S – The zeta potential for the first formulation of unloaded nanocapsule.

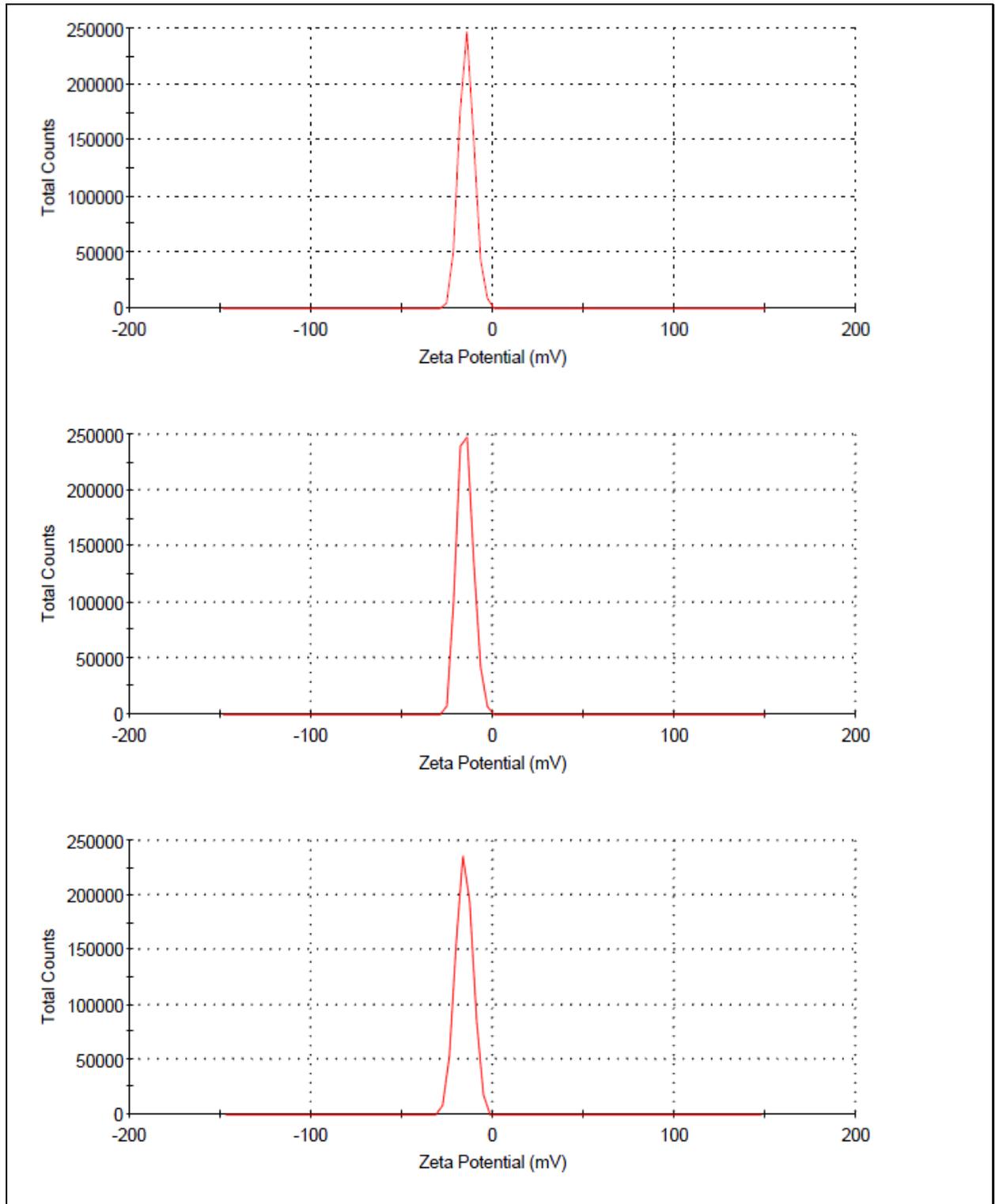


Figure 19S – The zeta potential for the second formulation of unloaded nanocapsule.

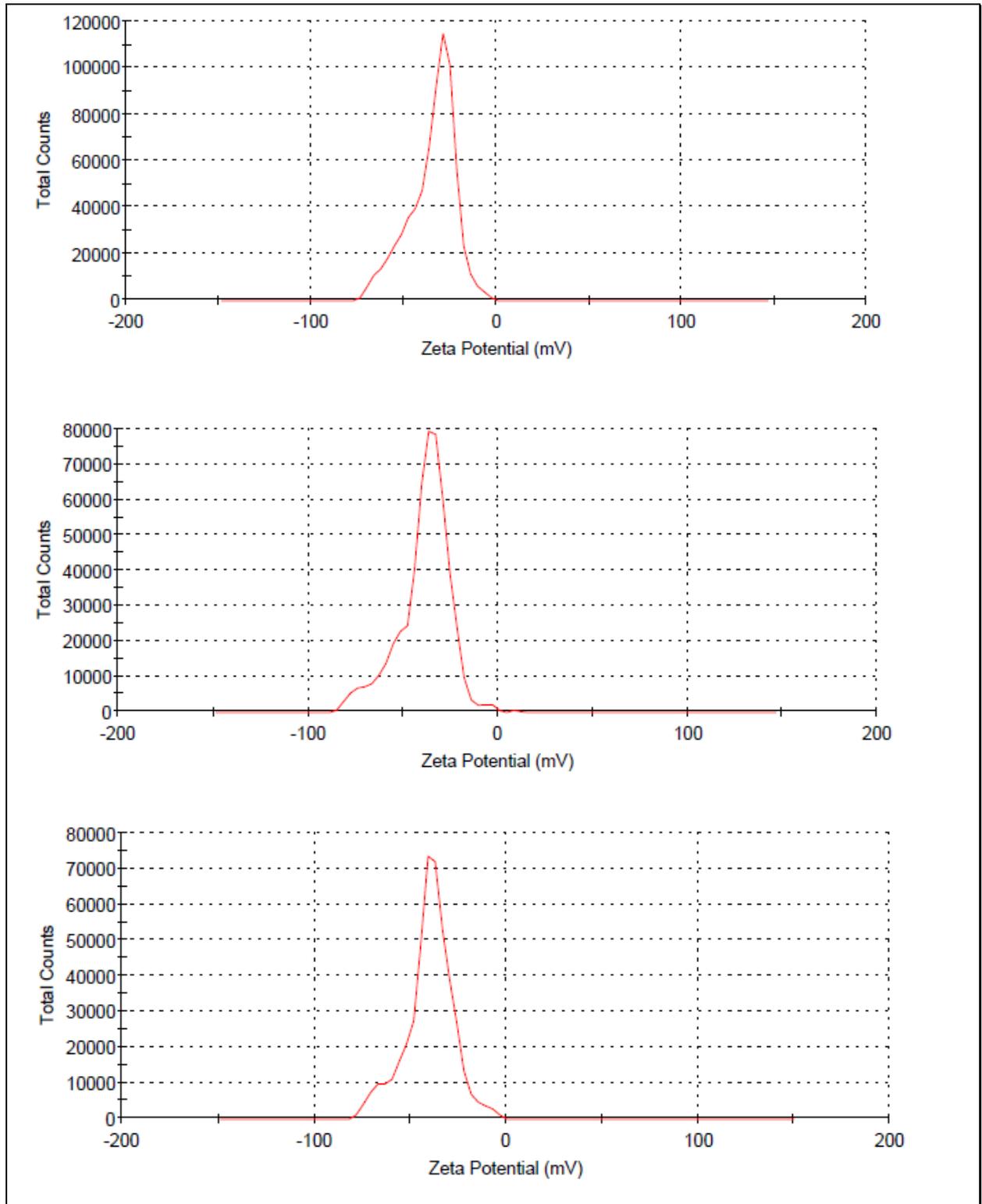
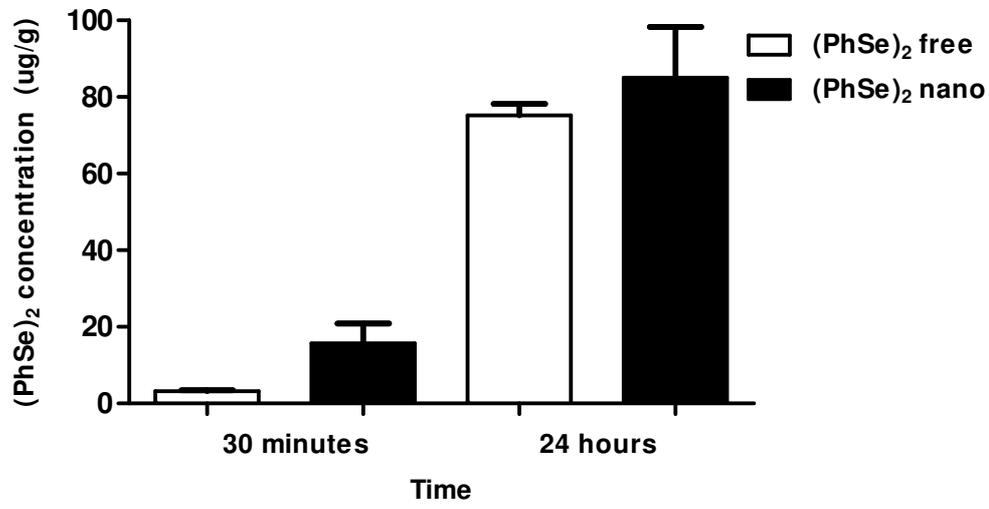
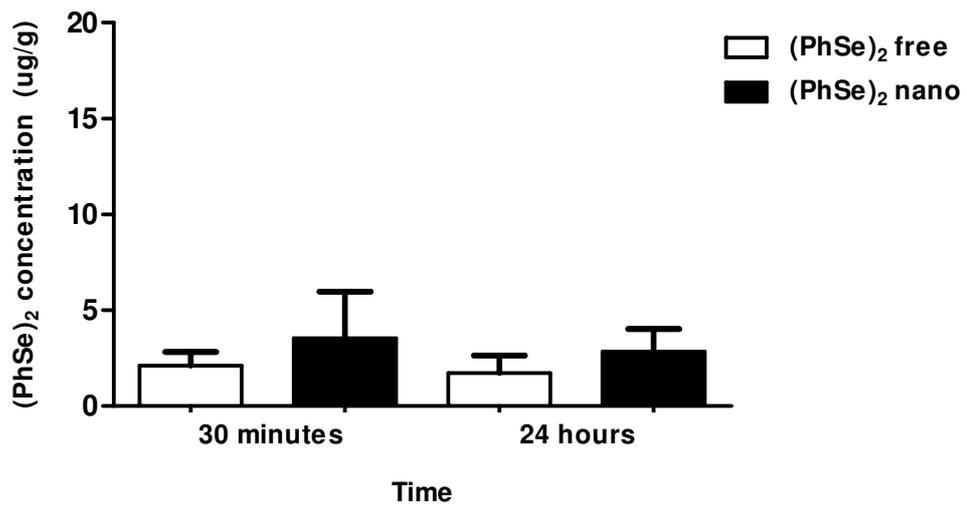


Figure 20S – The zeta potential for the third formulation of unloaded nanocapsule.

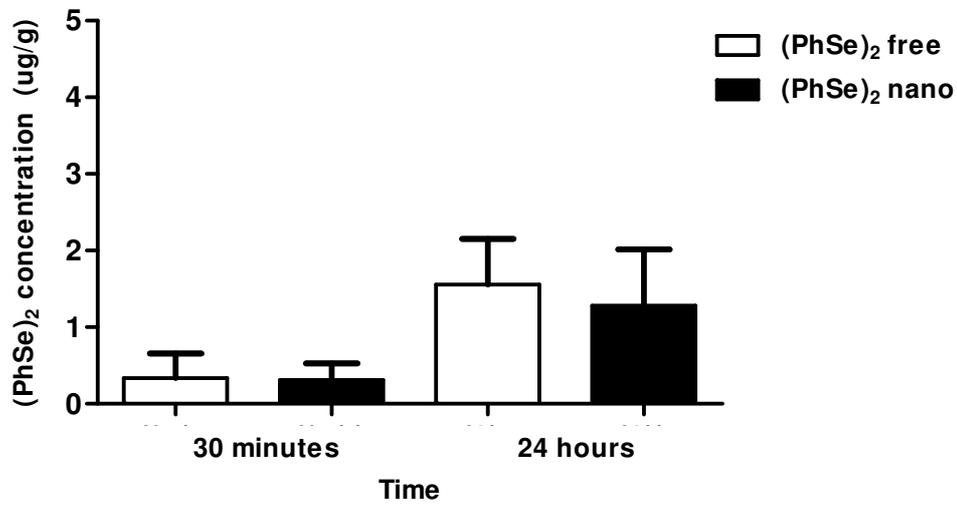
A



B



C



D

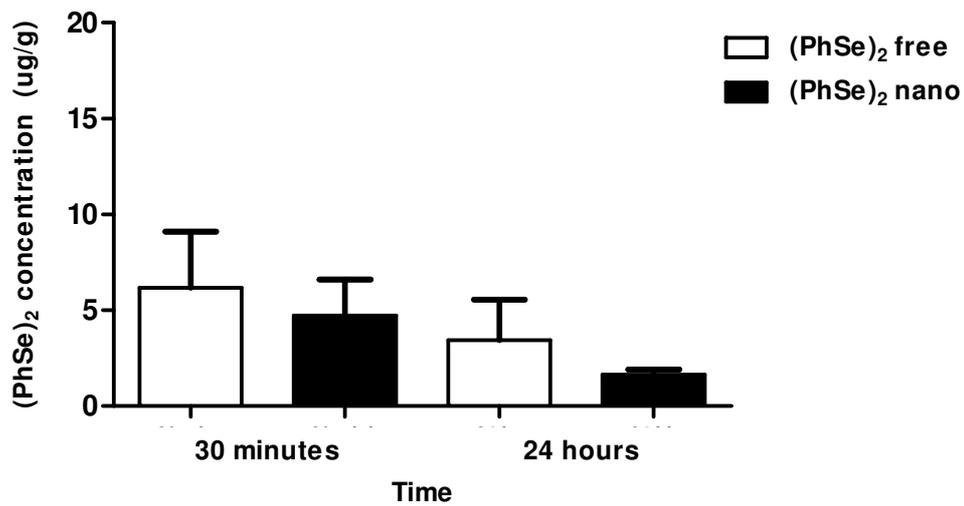


Figure 21S: Amount of selenium in (A) liver, (B) kidneys, (C) brain and (D) lungs after administration of 50 mg/kg (PhSe)₂ free and nano to animals by gavage. Each time point represents the average of three to five individual mice.

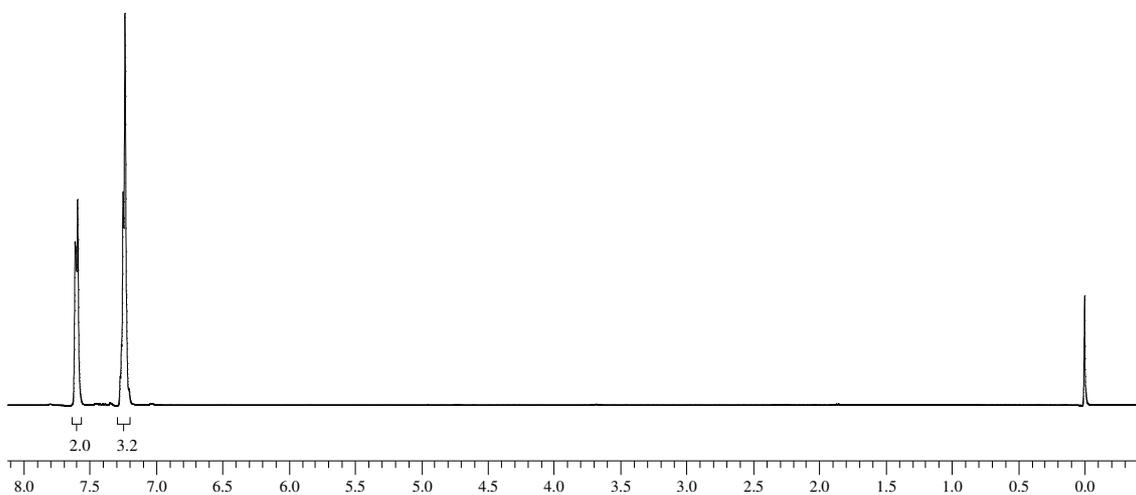


Figure 22S: RMN ^1H spectra of diphenyl diselenide in CDCl_3 at 400 MHz

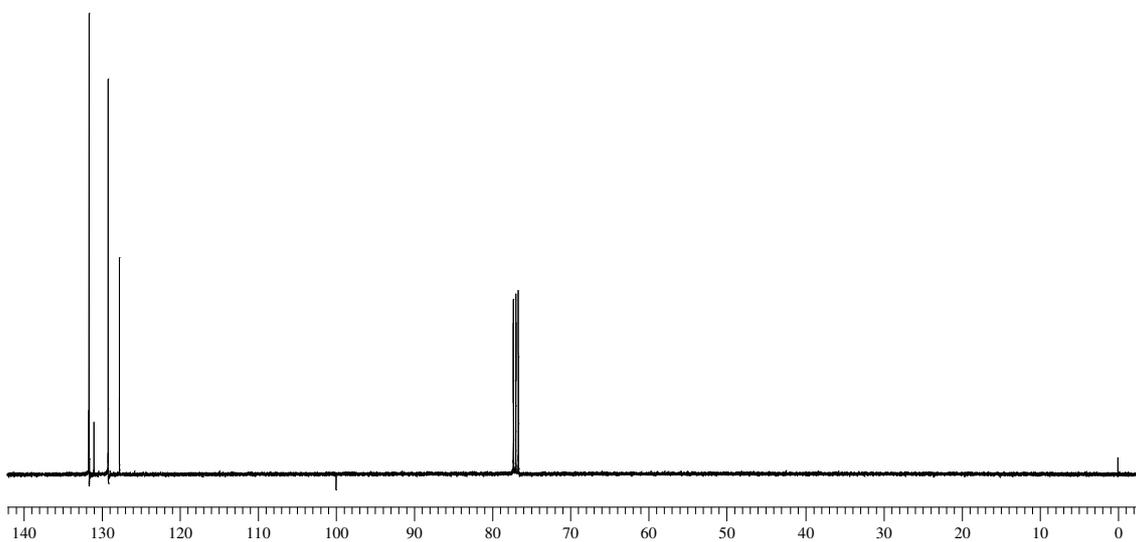


Figure 23S: RMN ^{13}C spectra of diphenyl diselenide in CDCl_3 at 400 MHz

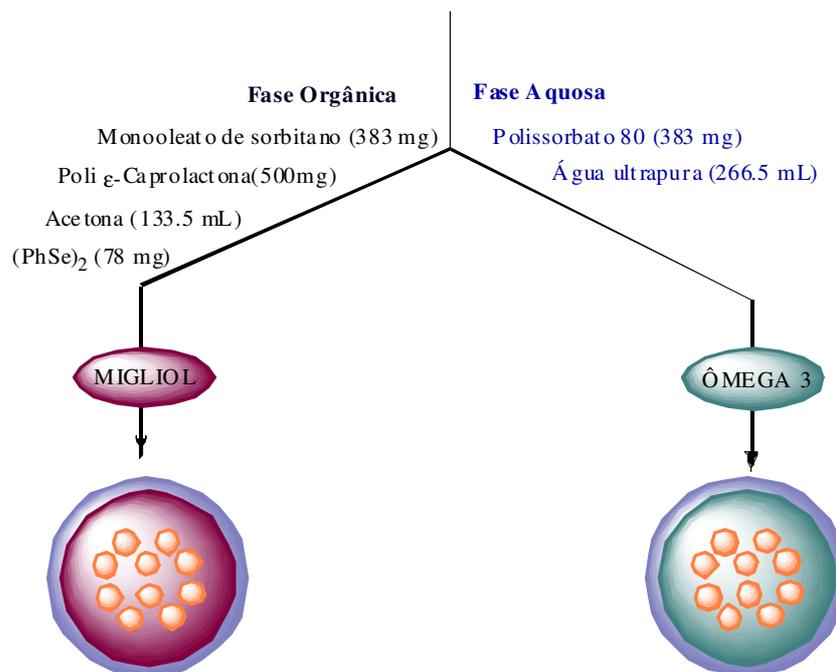
4.2. Capítulo 2: Resultados Complementares

4.2.1 Materiais e Métodos

O $(\text{PhSe})_2$ foi sintetizado de acordo com procedimentos descritos na literatura (Paulmier, 1986).

Preparação das suspensões de nanocápsulas e nanoesferas:

As suspensões de nanocápsulas e nanoesferas contendo $(\text{PhSe})_2$ foram preparadas segundo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (Fessi et al,1989) empregando-se a composição das suspensões que está descrita nos esquemas 1 e 2.



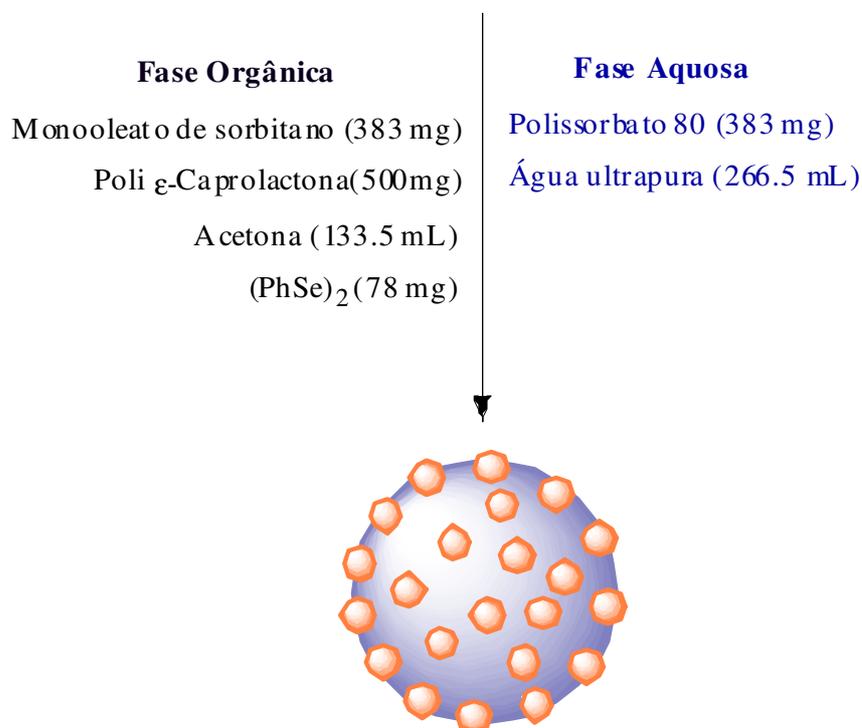
Esquema 1: Preparação das suspensões de nanocápsulas.

Os componentes da fase orgânica foram mantidos sob agitação magnética à temperatura de 40°C até completa dissolução de todos os componentes. A fase orgânica foi então adicionada, com auxílio de um funil, na fase aquosa, também

mantida sob agitação magnética, contendo o tensoativo de alto EHL (polissorbato 80).

Após, a suspensão foi mantida sob agitação moderada durante 10 minutos e então, concentrada a um volume de 50 mL, em evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e ajuste da concentração final de $(\text{PhSe})_2$. Foram preparadas, para fins comparativos, suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) sem conter o $(\text{PhSe})_2$.

Foi executado o mesmo procedimento para a preparação da nanoesfera, porém o óleo não foi utilizado na fase orgânica da formulação.



Esquema 2: Preparação das suspensões de nanoesferas.

4.2.2. Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas e nanoesferas

4.2.2.1 Doseamento do $(\text{PhSe})_2$ nas suspensões coloidais (taxa de recuperação)

As suspensões coloidais foram tratadas com acetonitrila e acetona (1:1) ocasionando a dissolução parcial do polímero e a liberação e dissolução do ativo contido no interior das nanocápsulas.

O doseamento do $(\text{PhSe})_2$ foi realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo da Shimadzu, utilizando detector UV/VIS 243nm, fase móvel isocrática de metanol e acetonitrila (1:1), volume de injeção 10 μL e fluxo de 0,5mL/min.

4.2.2.2 Determinação das taxas de associação

A concentração do ativo associados às nanocápsulas foi determinada por CLAE, levando em consideração a diferença entre a concentração total de $(\text{PhSe})_2$ na formulação e a concentração presente na fase aquosa da suspensão.

A concentração total foi determinada segundo o item 4.2.2.1. A determinação do ativo livre, presente na fase aquosa da suspensão, foi realizada através de ultrafiltração-centrifugação das suspensões.

4.2.2.3 Determinação de pH

A determinação de pH foi realizada em potenciômetro (Digimed[®]) previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0 e as medidas foram realizadas diretamente nas suspensões.

4.2.2.4 Determinação do diâmetro de partícula e polidispersão

As determinações do diâmetro e da polidispersão das nanopartículas em suspensão foram feitas através de espalhamento de luz dinâmico. As amostras

foram diluídas 500 vezes (v:v) em água de Milli-Q[®], no equipamento Zetasizer[®], Nano-ZS da Malvern. Os resultados foram determinados através da média de três repetições.

4.2.2.5 Potencial zeta

O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas e nanoesferas foi obtido através da técnica de mobilidade eletroforética no equipamento Zetasizer[®], Nano-ZS da Malvern. As amostras foram previamente diluídas 500 vezes (v:v) em cloreto de sódio 10mM. Os resultados foram expressos em milivolts (mV) a partir de uma média de três determinações.

4.2.3 Resultados

Os resultados das formulações de nanocápsulas contendo diferentes núcleos oleosos (miglyol e ômega-3) estão de acordo com os valores encontrados em estudos anteriores que compreendem a faixa entre 250-500 nm (Külkamp et al, 2009; Mora-Huertas et al, 2010) e com os encontrados para o óleo de canola. O índice de polidispersão obtido mostra que as formulações apresentam homogeneidade na distribuição do tamanho de partícula (Schaffazick et al., 2003).

Os valores negativos de potencial zeta predispõem que as formulações tanto de nanocápsulas como de nanoesferas desenvolvidas são estáveis e apresentam resultados interessantes para dar seqüência a mais testes de estabilidade (Mora-Huertas et al, 2010; Schaffazick et al., 2003).

Outro trabalho utilizando o mesmo polímero e polissorbato 80 na formulação também encontrou resultados negativos nos valores de potencial zeta indicando que esses valores são devidos às características estruturais dos componentes da interface das partículas sendo que o mecanismo de estabilização é por impedimento estérico (Külkamp et al, 2009).

Com relação aos valores de pH encontrados nesta pesquisa, as formulações de nanopartículas apresentam resultados semelhantes aos encontrados em outros estudos onde foi empregado o mesmo método e polímero (Schaffazick et al., 2002; Kulkamp et al, 2009).

A alta taxa de encapsulamento do ativo encontrada está em concordância com as características do $(\text{PhSe})_2$, pois este composto é altamente lipofílico apresentando maior solubilidade com o óleo da formulação. Além disso, o $(\text{PhSe})_2$ apresenta alto Log D, tendo afinidade pela fase orgânica, corroborando com o ótimo resultado das formulações de nanoesfera e não somente com as formulações de nanocápsulas desenvolvidas (Prigol, 2010; Schaffazick et al., 2003).

Nas tabelas abaixo, estão descritos os dados físico-químicos das nanopartículas e nanoesferas preparadas.

Tabela 1 – Valores referentes aos testes físico-químicos das suspensões coloidais contendo $(\text{PhSe})_2$.

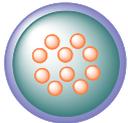
	Nanocápsula de $(\text{PhSe})_2$ /Miglyol	Nanocápsula de $(\text{PhSe})_2$ /Ômega-3	Nanoesfera de $(\text{PhSe})_2$
Tamanho de partícula	269,5 ± 29,22	249,8 ± 31,9	150,1 ± 5,06
Índice de polidispersão	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,05	0,1 ± 0,04
Potencial zeta	-22,5 ± 3,37	-19,4 ± 3,7	-16,1 ± 1,85
pH da suspensão	6,4 ± 0,12	5,71 ± 0,87	6,6 ± 0,29
Taxa de encapsulamento	99,99 ± 0,01	99,99 ± 0,01	99,98 ± 0,01

Tabela 2 – Valores referentes aos testes físico-químicos das suspensões coloidais na ausência do $(\text{PhSe})_2$.

	Nanocápsula sem $(\text{PhSe})_2$ /Miglyol	Nanocápsula sem $(\text{PhSe})_2$ /Ômega-3	Nanoesfera sem $(\text{PhSe})_2$
Tamanho de partícula	314,2 ± 39,80	291,5 ± 19,21	166,1 ± 9,38
Índice de polidispersão	0,18 ± 0,05	0,14 ± 0,01	0,1 ± 0,02
Potencial zeta	-18,8 ± 0,75	-25,6 ± 6,4	-20,3 ± 1,41
pH da suspensão	6,4 ± 0,53	6,3 ± 0,41	6,4 ± 0,14

5 DISCUSSÃO

5.1. Parâmetros físico-químicos

Os resultados da caracterização físico-química são de fundamental importância para compreender possíveis problemas de estabilidade química tanto do polímero quanto das demais matérias - primas presentes na formulação, relacionadas com o tempo de armazenamento e na formação de agregados no meio formando precipitados (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As formulações das nanocápsulas contendo óleo de canola como núcleo oleoso e preparadas a partir do método de polimerização interfacial do polímero pré-formado apresentaram diâmetro médio próximos de 320nm e 266nm para as respectivas concentrações finais de 1,56 mg.ml⁻¹ e 5 mg.ml⁻¹, estando de acordo com os valores de diâmetros encontrados em outras referências (SCHAFFAZICK et al, 2002; MORA-HUERTAS et al, 2010). O menor valor do tamanho de partícula referente à formulação contendo 5 mg.ml⁻¹ de (PhSe)₂ poderia estar relacionado com uma maior quantidade deste composto presente no núcleo e conseqüentemente uma diminuição na quantidade de óleo durante a formação do núcleo oleoso ocorreria, promovendo essa diminuição no tamanho das partículas. Os índices de polidispersão em torno de 0,2 indicam homogeneidade na distribuição do tamanho de partícula das formulações.

As nanocápsulas contendo miglyol e ômega-3 como óleos constituintes da formulação apresentaram diâmetro médio de 269nm e 249nm, respectivamente e um índice de polidispersão de 0,2. Já a nanoesfera teve um diâmetro médio inferior com relação às nanocápsulas, onde o valor encontrado foi de 150nm mostrando que a presença do óleo na formulação influencia nos valores do tamanho de partícula assim como dados descritos em literatura (SCHAFFAZICK et al, 2002).

Estes resultados mostraram que as demais formulações desenvolvidas na concentração final de 1,56 mg.ml⁻¹ também apresentaram valores semelhantes aos encontrados nas nanocápsulas que continham óleo de canola como núcleo oleoso nas diferentes concentrações de (PhSe)₂.

As nanoesferas apresentaram potencial zeta de -16 mV, para as nanocápsulas contendo miglyol e ômega-3 o valor encontrado foi de -22 mV e -19 mV, respectivamente.

As amostras contendo óleo de canola nas concentrações finais de 1,56 mg.ml⁻¹ e 5 mg.ml⁻¹ tiveram valores encontrados de - 19 mV e - 29 mV, respectivamente, mostrando que todas as formulações de nanocápsulas e nanoesferas desenvolvidas neste trabalho, apresentaram potencial zeta negativo.

Este resultado está diretamente relacionado à presença dos grupos carboxilas terminal do polímero, já que este é um poliéster (MORA-HUERTAS et al, 2010).

Sabendo-se que os estudos mostram que valores de potencial zeta menores que - 10 mV predizem boa estabilidade coloidal devido à alta barreira energética entre as partículas. Os resultados de potencial zeta obtidos a partir da formulação desenvolvida se mostram viáveis e com características desejáveis para não apresentarem formação de precipitados, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões que possam ocorrer de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS et al, 2010).

O pH encontrado para as formulações é em torno de 5,7 a 6,6 onde a literatura relata que suspensões de nanocápsulas preparadas pelo método de polimerização interfacial do polímero pré-formado e com poliésteres apresentam valores aproximado ao encontrado neste estudo (SCHAFFAZICK et al., 2002; KÜLKAMP et al, 2009).

A taxa de encapsulamento que determina o quanto de fármaco foi encapsulado pelo polímero foi de 99,9 % para todas as formulações desenvolvidas, nanocápsulas e nanoesferas, sendo considerado excelente para o encapsulamento de ativos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O valor encontrado mostra que o fármaco apresenta alta solubilidade no óleo da formulação, visto que o (PhSe)₂ é altamente lipofílico e também apresenta alto Log D, tendo afinidade pela fase orgânica.

De acordo com os resultados obtidos através da caracterização físico-química, pode-se prever que as suspensões são capazes de apresentarem certa estabilidade em função do tempo de armazenamento. Porém há necessidade da realização de testes mais específicos para confirmação destes resultados.

Aliado a isso, as formulações de nanocápsulas e nanoesferas apresentam diversas vantagens com relação aos fármacos convencionais na melhora da

estabilidade (KÜLKAMP et al., 2009) e farmacocinética (LAMPRECHT et al., 2004; PELTIER et al., 2006; ASSIS et al., 2008; LUO et al., 2011; WOHLFART et al., 2011).

5.2. Avaliação biológica

Foram utilizadas nanocápsulas de óleo de canola como núcleo oleoso, pois este óleo é frequentemente utilizado como veículo para a realização de testes biológicos utilizando o disseleneto de difenila e em razão de ser menos tóxico que outros veículos (Prigol, 2010).

Optou-se por utilizar as nanocápsulas na concentração final de 5 mg.ml⁻¹ em razão da facilidade nos cálculos para a administração e também por ser a formulação que apresentou melhores resultados com relação a caracterização físico-química.

Os resultados obtidos referente aos testes biológicos mostraram diferença significativa entre os compostos livre e nanoencapsulado. Os níveis de selênio foram mais excretados na urina e menos excretados nas fezes 30 minutos após a administração do composto nanoencapsulado indicando que esta formulação desenvolvida apresenta melhor absorção do ativo em comparação ao composto livre. Estes resultados estão de acordo com outro trabalho que demonstrou que o Se é rapidamente absorvido pelo trato gastrintestinal (PRIGOL et al., 2012, SOB REVISÃO).

A diferença nesses resultados poderia ser racionalizado pela presença do polímero que circunda e encobre o (PhSe)₂ nessa nanoestrutura, podendo ter melhorado a absorção após a administração oral.

Diversos estudos mostram que o nanoencapsulamento melhora a farmacocinética quando comparado com fármaco convencional utilizando a mesma metodologia, poli (ε-caprolactona) e polissorbato 80 como este trabalho (HAAS ET AL., 2009). Outro estudo mostrou que a redução da excreção do ativo nas fezes e o aumento na excreção na urina sugerem que a melhora na absorção ocorreu após o encapsulamento em nanopartículas (LUO et al., 2011).

Com relação à administração oral, outro trabalho demonstrou que o potencial terapêutico de carreadores coloidais não específicos em melhorar a biodisponibilidade ocorreu pela proteção do fármaco da denaturação no lúmen

gastrointestinal ou por prolongar o tempo em aumentar a concentração do ativo diretamente na superfície da membrana mucosa (PONCHEL e IRACHE, 1998).

Adicionalmente, este trabalho encontrou quantidade equivalente de selênio no cérebro dos camundongos tratados tanto com o composto livre quanto nanoencapsulado mostrando que ambas as formulações podem atravessar a barreira hemato-encefálica. Com relação às nanocápsulas, este resultado está de acordo com publicações anteriores onde pesquisadores observam que a presença de polissorbato 80 nas formulações exerce influência na passagem das nanopartículas para o cérebro (SOPPIMATH et al., 2001; SINGH e LILLARD, 2009).

Também não foi encontrada nenhuma diferença significativa no teor de selênio no plasma 30 minutos após a administração dos compostos. Isto pode estar relacionado ao fato de que a absorção das nanocápsulas seria mais eficaz que aquelas contendo apenas $(\text{PhSe})_2$. Este resultado pode ser corroborado com a diferença significativa de selênio na urina observada nos testes de excreção.

Além disso, pode-se observar uma grande quantidade de selênio nos eritrócitos provavelmente pela passagem destes da corrente sanguínea mostrando concordância com outras pesquisas (PRIGOL et al., 2012, SOB REVISÃO).

6 CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos neste trabalho e a partir da análise dos resultados obtidos foi possível perceber que o nanoencapsulamento do disseleneto de difenila a partir do método de deposição interfacial do polímero pré-formado mostrou-se viável empregando-se poli (ϵ -caprolactona) como polímero e utilizando diferentes óleos como núcleo oleoso bem como o desenvolvimento de nanoesferas.

As formulações desenvolvidas apresentaram pH ácido, diâmetro de partícula inferior a 330 nm, índice de polidispersão de aproximadamente 0,2 e potencial zeta negativo.

A taxa de encapsulamento acima de 99% mostra que o fármaco apresenta alta solubilidade no óleo da formulação, pois se sabe que o ativo em questão é altamente lipofílico.

Estas observações direcionam que estas nanocápsulas podem apresentar uma eficiente forma para nanoencapsulamento do disseleneto de difenila e outros compostos organocalcogênios, podendo fazer com que as nanopartículas deste composto possam vir a ser uma nova abordagem para os estudos das atividades farmacológicas do disseleneto de difenila.

Os resultados dos testes *in vivo* mostraram significativa redução na excreção pelas fezes e aumento da excreção pela urina sugerindo melhora da absorção do fármaco após o encapsulamento indicando que o nanoencapsulamento melhora a farmacocinética. Adicionalmente, a detecção do disseleneto de difenila no cérebro em quantidades similares ao livre, sugere que as nanocápsulas não interferem na passagem pela barreira hemato-encefálica (BHE), podendo ser uma promissora possibilidade para este tipo de alvo, pois combina a permeabilidade pela BHE juntamente com as vantagens dos sistemas nanoparticulados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.S., JEZUR, L., FONTANA, M.C., PAESE, K., SILVA, C.B., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S., BECK, R.C.R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**. 28, 165-172, 2009.

ASSIS, D.N., MOSQUEIRA, V.C.F., VILELA, J.M.C., ANDRADE, M.S., CARDOSO, V.N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of ^{99m}Tc Technetium-fluconazole nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**. 349, 152-160, 2008.

BARBOSA, N.B.V., ROCHA, J.B.T., WONDRAČEK, D.C., PEROTTONI, J., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**. 163, 230-238, 2006.

BARRAT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 60, 21-37, 2003.

BARRAT, G. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**. 3, 163-171, 2000.

BATISTA, C.M., CARVALHO, C.M.B. MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 43, 167- 179, 2007.

BÉDUNEAU, A., HINDRÉ, F., CLAVREUL, A., LEROUX, J-C., SAULNIER, P., BENOIT, J-P. Brain targeting using novel lipid nanovectors. **Journal of Controlled release**. 126, 44-49, 2008.

BEM, A.F., PORTELLA, R.L., PEROTTONI, J., BECKER, E., BOHRER, D., PAIXÃO, M. W., NOGUEIRA, C. W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. **Chemico-Biological Interactions**. 162, 1-10, 2006.

CALVO, P., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 85, 530-536, 1996.

CHAWLA, J.S., AMIJI, M.M. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor targeted delivery of tamoxifen. **International Journal of Pharmaceutics**. 249, 127-138, 2002.

DOMINGUES, G.S., GUTERRES, S.S., BECK, R.C.R., POHLMANN, A.R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**. 31, 1966-1972, 2008.

FRÉZARD, F., SCHETTINI, D.A., ROCHA, O.G.F., DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**. 28, 511-518, 2005.

FUKUSHIMA, K., ABBATE, C., TABUANI, D., GENNARI, M., RIZZARELLI, P., CAMINO, G. Biodegradation trend of poly(ϵ -caprolactone) and nanocomposites. **Materials Science and Engineering**. 30, 566-574, 2010.

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

HAAS, S.E., BETTONI, C.C., OLIVEIRA, L.K., GUTERRES, S.S., COSTA, T.D. Nanoencapsulation increase quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 34, 156-161, 2009.

KADE, I. J., BORGES, V.C., SAVEGNAGO, L., IBUKUN, E.O., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T. Effect of oral administration of diphenyl diselenide on antioxidant status, and activity of delta aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase, in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biology and Toxicology**. 25, 415-424, 2009.

KHAN D.R., CUKIERMAN, E. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**. 80, 762-770, 2010.

KHUDA-BUKHSH, A.R., BHATTACHARYYA, S.S., PAUL, S., BOUJEDAINI, N. Polymeric nanoparticle encapsulation of a naturally occurring plant scopoletin and its effects on human melanoma cell A375. **Journal of Chinese Integrative Medicine**. 8, 853-862, 2010.

KÜLKAMP, I.C., PAESE, K., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**. 32, 2078-2084, 2009.

LAMPRECHT, A., SAUMET, J-L., ROUX, J., BENOIT, J-P. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. **International Journal of Pharmaceutics**. 278, 407-414, 2004.

LOSA, C., ALONSO, M.J., VILA, J.L., ORALLO, F., MARTINEZ, J., SAAVEDRA, J.A., PASTOR, J.C. Reduction of cardiovascular side effects associated with ocular administration of metipranolol by inclusion in polymeric nanocapsules. **Journal of ocular pharmacology**. 8, 191-198, 1992.

LUO C-F., WUAN, M., CHEN, M-S., LIU S-M., ZHU, L., HUANG, B-Y. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of puerarin solid nanoparticles following oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**. 410, 138-144, 2011.

MACIEL, E.N., FLORES, E.M.M., ROCHA, J.B.T., FOLMER, V. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 70, 470-476, 2003.

MORA-HUERTAS, C.E., FESSI, H., ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. 385, 113-142, 2010.

MORILLE, M. PASSIRANI, C. LETROU-BONNEVAL, E. BENOIT, J-P, PITARD, B. Galactosylated DNA lipid nanocapsules for efficient hepatocyte targeting. **International Journal of Pharmaceutics**. 379, 293-300. 2009.

NGUYEN, T. H. A., NGUYEN, V.C. Formation of nanoparticles in aqueous solution from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone). **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**. 1, 1-5, 2010.

NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T. Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. **Journal of Brazilian Chemical Society**. 21, 2055-2071, 2010.

PARVEEN, R., BABOOTA, S., ALI, J., AHUJA, A., VASUDEVA, S.S., SAYEED, A. Oil based nanocarrier for improved oral delivery of silymarin: In vitro and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**. 413, 245-253, 2011.

PELTIER, S., OGER, J-M., LAGARCE, F., COUET, W., BENOÎT, J-P. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. **Pharmaceutical Research**. 23, 1243-1250, 2006.

PONCHEL, G., IRACHE, J-M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 34, 191-219, 1998.

PRIGOL, M. Ação convulsivante do disseleneto de difenila em ratos: estudo dos mecanismos neuroquímicos e da toxicocinética. 2010. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica)** – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010. a

PRIGOL, M. SCHUMACHER, R.F. NOGUEIRA, C.W. ZENI, G. Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. **Toxicology Letters**. 189, 35-39, 2009. b

PRIGOL, M., LUCHESE, C., NOGUEIRA, C. W. Antioxidante effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. **Cell Biochemistry and Function**. 27, 216-222, 2009. c

QUINTANAR-GUERRERO, D., ALLÉMANN, E., DOELKER, E., FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**. 15, 1056-1062, 1998.

RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**. 356, 233-241, 2000.

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

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

SHAN, L., CUI, S., DU, C., WAN, S., QIAN, Z., ACHILEFU, S., GU, Y. A paclitaxel-conjugated adenovirus vector for targeted drug delivery for tumor therapy. **Biomaterials**. 33, 146-162, 2012.

SINGH, R., LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**. 86, 215-223, 2009.

SINHA, V.R., BANSAL, K., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., TREHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**. 278, 1-23, 2004.

SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T.M., KULKARNI, A.R., RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**. 70, 1-20, 2001.

TADROS, T., IZQUIERDO, P., SOLAN, E.C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**. 108-109, 303-318, 2004.

VELDE, K.V., KIEKENS, P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. **Polymer Testing**. 21, 433-442, 2002.

VILLANOVA, J.C.O., ORÉFICE, R.L., CUNHA, A.S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. 20, 51-64, 2010.

YOO, J-W., DOSHI, N., MITRAGOTRI, S. Adaptive micro and nanoparticles: Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 63, 1247-1256, 2011.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 – Validação da metodologia analítica para doseamento do disseleneto de difenila em suspensões de nanocápsulas e nanoesferas

A validação analítica seguiu critérios estabelecidos pelo Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA e os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão intermediária, repetibilidade e exatidão.

A quantificação do disseleneto de difenila nas suspensões de nanocápsulas e nanoesferas foi realizada utilizando CLAE e as condições cromatográficas usadas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Condições cromatográficas usadas para quantificação do $(\text{PhSe})_2$ em CLAE.

Característica	Descrição
Coluna	Coluna cromatográfica – VertiSep GES C18 – 150 mm, 4,6 mm, 5 μm – Vertical Chromatography [®]
Pré-coluna	SecurityGuard Cartridges C18 – 4 mm, 3,0 mm – Phenomenex [®]
Fluxo	0,5 mL/min
Volume de injeção	10 μL
Deteccção	243 λ
Fase móvel	Metanol: acetonitrila (1:1, v/v)
Equipamento	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE – Shimadzu, SCL – 10 Avp

Tabela 4 - Média das áreas referente às diferentes concentrações de $(\text{PhSe})_2$ para elaboração da curva de calibração por CLAE.

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Áreas			Média \pm DP	DPR (%)
5 $\mu\text{g/mL}$	537163	513216	564531	538303 \pm 25676	4,77
10 $\mu\text{g/mL}$	1012586	1042299	1083513	1046132 \pm 35618	3,4
15 $\mu\text{g/mL}$	1567178	1547839	1527290	1547435 \pm 19947	1,29
20 $\mu\text{g/mL}$	2076089	2196961	2104055	2125701 \pm 63276	2,98
25 $\mu\text{g/mL}$	2603925	2655240	2804231	2687798 \pm 104046	3,87

A equação da reta foi obtida através de estudos de regressão linear, entre a concentração de $(\text{PhSe})_2$ e sua respectiva área, obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,999, mostrando-se dessa forma linear.

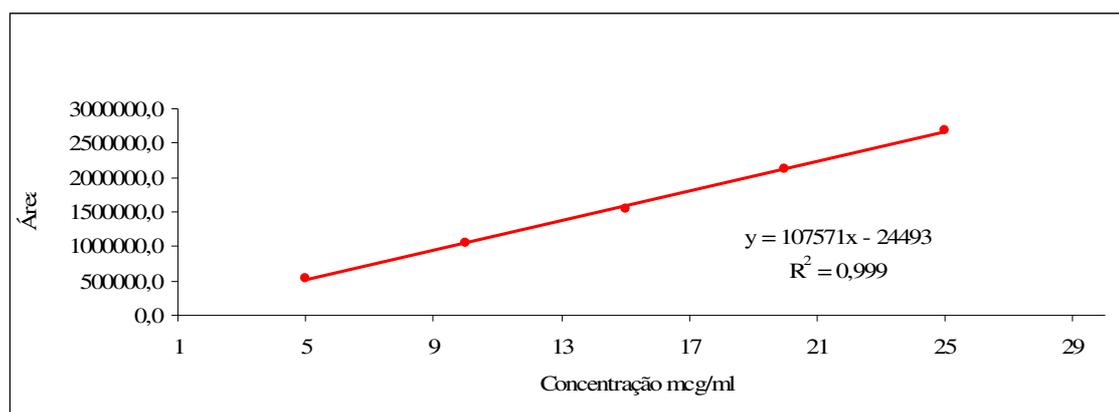


Figura 13 – curva de calibração do $(\text{PhSe})_2$ obtida por CLAE

8.1.1 Ensaios de especificidade, reprodutibilidade, precisão intermediária e exatidão para nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ contendo óleo de canola como núcleo oleoso

8.1.1.1 Ensaio de especificidade

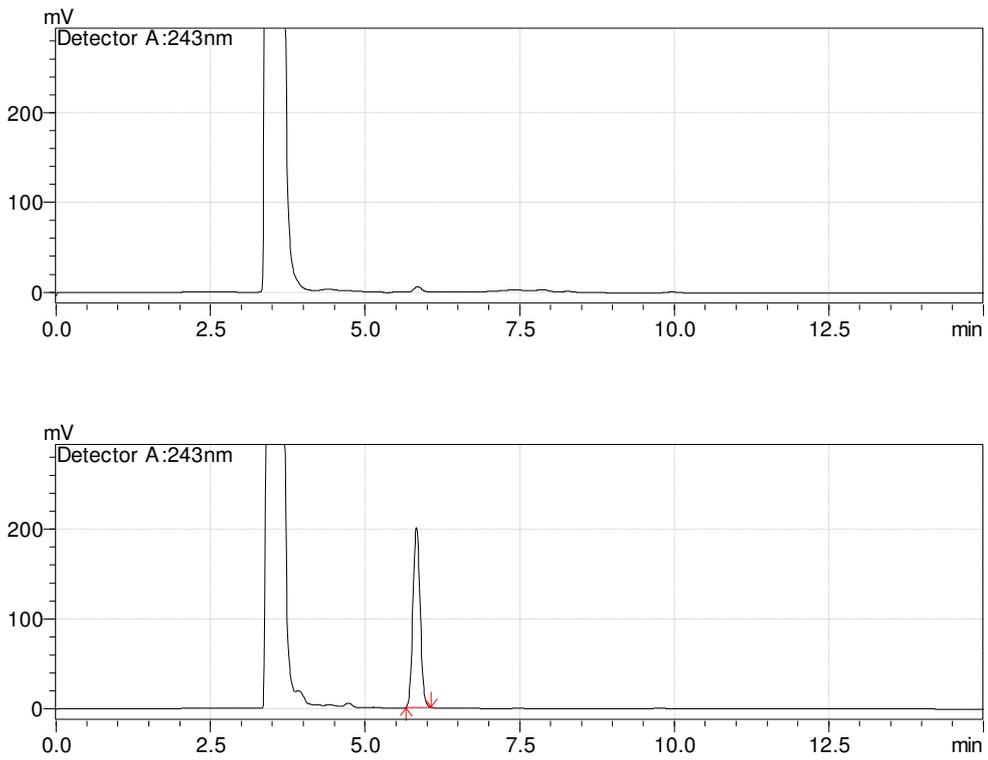


Figura 14 – Cromatograma da suspensão branca (a) e da suspensão de nanocápsula de $(\text{PhSe})_2$ contendo óleo de canola como núcleo oleoso.

8.1.1.2 Ensaio de repetibilidade

Tabela 5 – valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade para a quantificação do (PhSe)₂ em nancápsulas contendo óleo de canola como núcleo oleoso em CLAE (n = 6)

Repetições	Teor (%)	Média ± DP	DPR (%)
N1	101,87		
N2	101,78		
N3	100,88	101,3 ± 0,9616	0,9493
N4	99,64		
N5	101,23		
N6	102,37		

8.1.1.3 Ensaio de precisão intermediária

Tabela 6 – valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária obtidos por analistas diferentes para a quantificação do (PhSe)₂ em nancápsulas contendo óleo de canola como núcleo oleoso em CLAE (n = 3)

Dia	Concentração de Trabalho (µg/mL)	Analista 1		Analista 2		Média do dia ± DP (%)	DPR do dia (%)
		Teor da amostra (µg/mL)	(%)	Teor da amostra (µg/mL)	(%)		
1º dia	15,6 (µg/mL)	16,0	102,38	15,5	99,64	100,5 ± 1,7	1,7
		15,9	101,92	15,7	100,79		
		15,2	97,70	15,7	100,54		
2º dia	15,6 (µg/mL)	15,7	100,54	15,5	99,37	101,2 ± 1,2	1,1
		16,0	102,66	15,8	101,17		
		15,9	101,69	15,9	101,99		

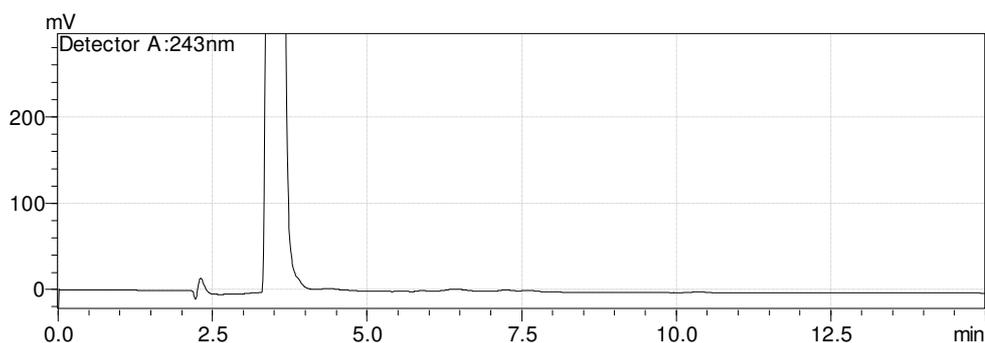
8.1.1.4 Ensaio de exatidão

Tabela 7 – Valores experimentais obtidos para o teste de exatidão do $(\text{PhSe})_2$ em nancápsulas contendo óleo de canola como núcleo oleoso em CLAE

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
7,8		
11,7	11,5	98,6
15,6	15,5	99,7
19,5	19,5	99,8
23,4	23,0	98,3

8.1.2 Ensaios de especificidade, reprodutibilidade, precisão intermediária e exatidão para nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ contendo ômega-3 como núcleo oleoso

8.1.2.1 Ensaio de especificidade



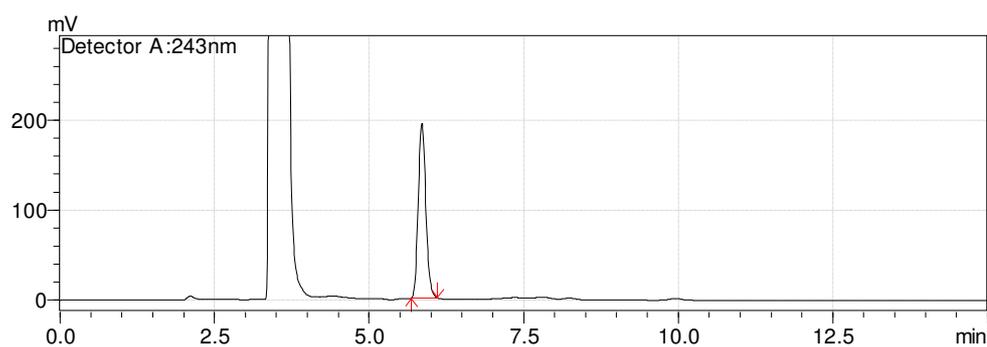


Figura 15 – Cromatograma da suspensão branca (a) e da suspensão de nanocápsula de $(\text{PhSe})_2$ contendo ômega-3 como núcleo oleoso.

8.1.2.2 Ensaio de reprodutibilidade

Tabela 8 – valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade para a quantificação do $(\text{PhSe})_2$ em nanocápsulas contendo ômega-3 como núcleo oleoso em CLAE (n = 6)

Repetições	Teor (%)	Média \pm DP	DPR (%)
N1	100,66		
N2	101,66		
N3	101,66	101,44 \pm 0,6650	0,6556
N4	101,90		
N5	100,57		
N6	102,18		

8.1.2.3 Ensaio de precisão intermediária

Tabela 9 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária obtidos por analistas diferentes para a quantificação do (PhSe)₂ em nancápsulas contendo ômega-3 como núcleo oleoso em CLAE (n = 3)

Dia	Concentração	Analista 1		Analista 2		Média	DPR
	o de Trabalho (µg/mL)	Teor da amostra (µg/mL)	(%)	Teor da amostra (µg/mL)	(%)	do dia ± DP (%)	do dia (%)
1º dia	15,6 (µg/mL)	15,3	98,07	15,8	101,35	99,69 ± 1,17	1,17
		15,4	98,68	15,6	100,25		
		15,6	99,89	15,6	99,88		
2º dia	15,6 (µg/mL)	15,7	100,51	15,8	101,31	100,77 ± 0,82	0,81
		15,8	101,48	15,6	100,28		
		15,8	101,55	15,5	99,49		

8.1.2.4 Ensaio de exatidão

Tabela 10 – Valores experimentais obtidos para o teste de exatidão do (PhSe)₂ em nancápsulas contendo ômega-3 como núcleo oleoso em CLAE

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração recuperada (µg/mL)	Recuperação (%)
7,8		
11,7	11,5	98,1
15,6	15,3	98,0
19,5	19,6	100,6
23,4	23,7	101,2

8.1.3 Ensaios de especificidade, reprodutibilidade, precisão intermediária e exatidão para nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ contendo miglyol como núcleo oleoso

8.1.3.1 Ensaio de especificidade

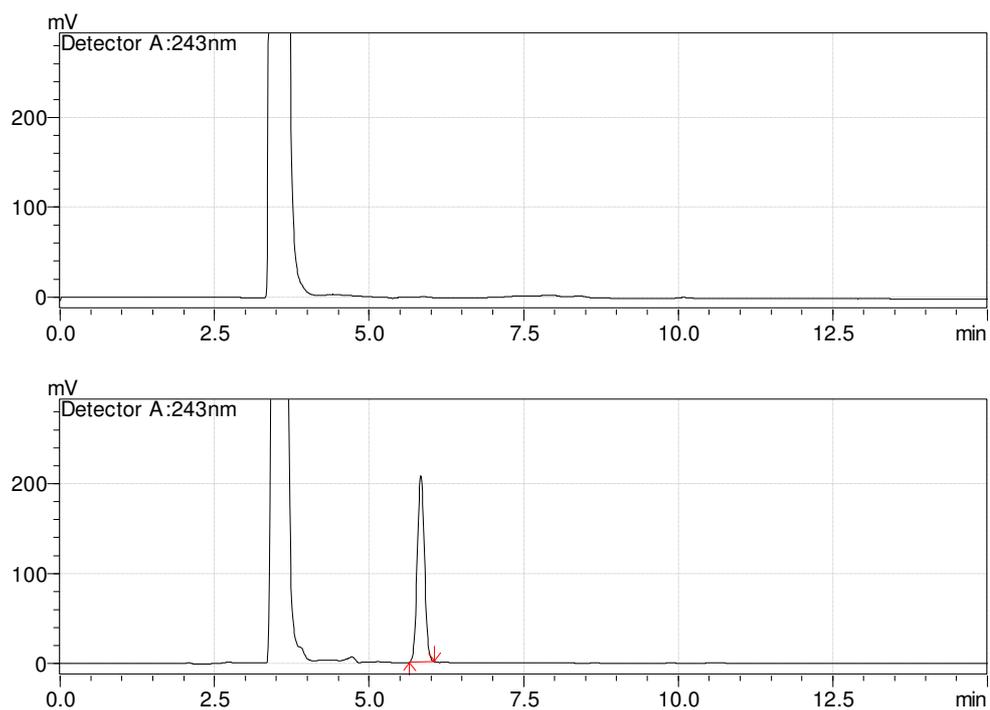


Figura 16 – Cromatograma da suspensão branca (a) e da suspensão de nanocápsula de $(\text{PhSe})_2$ contendo miglyol como núcleo oleoso.

8.1.3.2 Ensaio de reprodutibilidade

Tabela 11 – valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade para a quantificação do $(\text{PhSe})_2$ em nancápsulas contendo miglyol como núcleo oleoso em CLAE (n = 6)

Repetições	Teor (%)	Média \pm DP	DPR (%)
N1	98,00		
N2	103,21		
N3	100,59	100,19 \pm 1,9434	1,9398
N4	99,90		
N5	98,25		
N6	101,18		

8.1.3.3 Ensaio de precisão intermediária

Tabela 12 – valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária obtidos por analistas diferentes para a quantificação do $(\text{PhSe})_2$ em nancápsulas contendo miglyol como núcleo oleoso em CLAE (n = 3)

Dia	Concentração de Trabalho ($\mu\text{g/mL}$)	Analista 1		Analista 2		Média do dia \pm DP (%)	DPR do dia (%)
		Teor da amostra ($\mu\text{g/mL}$) (%)	103,40	Teor da amostra ($\mu\text{g/mL}$) (%)	99,97		
1º dia	15,6 ($\mu\text{g/mL}$)	16,1	103,40	15,6	99,97	101,47 \pm 1,97	1,94
		16,0	102,54	16,1	103,20		
		15,8	101,27	15,4	98,44		
2º dia	15,6 ($\mu\text{g/mL}$)	15,8	101,13	15,9	101,83	100,93 \pm 1,77	1,76
		16,0	102,50	15,3	98,08		
		16,0	102,49	15,5	99,56		

8.1.3.4 Ensaio de exatidão

Tabela 13 – Valores experimentais obtidos para o teste de exatidão do $(\text{PhSe})_2$ em nancápsulas contendo miglyol como núcleo oleoso em CLAE

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
7,8		
11,7	11,6	98,8
15,6	15,6	100,3
19,5	19,1	98,1
23,4	23,2	99,1

8.1.4 Ensaios de especificidade, reprodutibilidade, precisão intermediária e exatidão para nanoesferas de $(\text{PhSe})_2$

8.1.4.1 Ensaio de especificidade

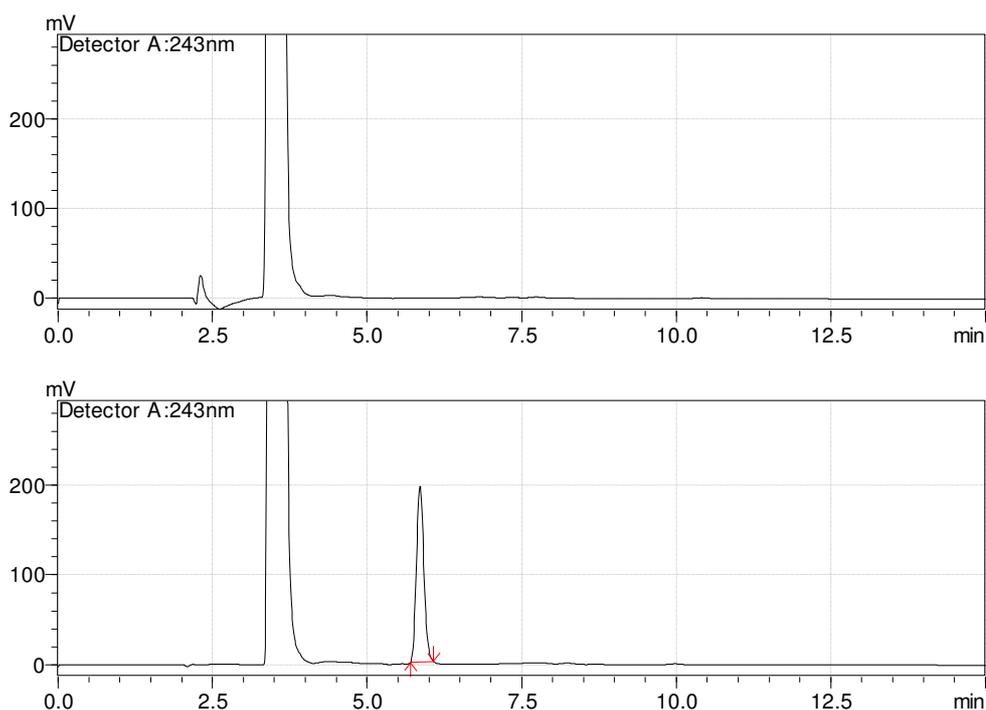


Figura 17 – Cromatograma da suspensão branca (a) e da suspensão de nanoesfera de $(\text{PhSe})_2$.

8.1.4.2 Ensaio de reprodutibilidade

Tabela 14 – valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade para a quantificação do $(\text{PhSe})_2$ em nanoesferas em CLAE (n = 6)

Repetições	Teor (%)	Média ± DP	DPR (%)
N1	99,29		
N2	102,19		
N3	99,75	100,39 ± 1,0718	1,0677
N4	100,83		
N5	99,60		
N6	100,68		

8.1.4.3 Ensaio de precisão intermediária

Tabela 15 – valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária obtidos por analistas diferentes para a quantificação do $(\text{PhSe})_2$ em nanoesferas em CLAE (n = 3)

Dia	Concentração de Trabalho (µg/mL)	Analista 1		Analista 2		Média do dia ± DP (%)	DPR do dia (%)
		Teor da amostra (µg/mL)	Teor da amostra (%)	Teor da amostra (µg/mL)	Teor da amostra (%)		
1º dia	15,6 (µg/mL)	15,6	100,02	16,0	99,99	100,20 ± 0,93	0,93
		15,9	101,72	15,8	99,95		
		15,7	100,63	15,6	98,91		
2º dia	15,6 (µg/mL)	15,8	101,04	15,8	102,51	101,14 ± 0,80	0,79
		15,8	100,97	15,6	101,42		
		15,7	100,77	15,8	100,10		

8.1.4.4 Ensaio de exatidão

Tabela 16 – Valores experimentais obtidos para o teste de exatidão do (PhSe)₂ em nanoesfera em CLAE

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração recuperada (µg/mL)	Recuperação (%)
7,8		
11,7	11,5	98,0
15,6	15,6	100,2
19,5	19,2	98,6
23,4	23,4	100,2

8.1.5 Análise de variância dos valores obtidos da curva analítica do (PhSe)₂

Tabela 17 – Análise de variância dos valores correspondente às áreas obtidas na determinação da curva analítica do (PhSe)₂ para validação.

Fonte de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F _{.calculado}	F _{.tabelado}
Entre amostras	4	8687409545834,2700	2171852386458,5700	379,79479	4,53
Regressão linear	1	8678671226368,0300	8678671226368,0300	1517,6511	5,99
Desvio de linearidade	3	8738319466,23242	2912773155,41081	0,50936**	4,76
Resíduo	6	34310935045,33590	5718489174,22266		
Total	14	8,72172E+12			

* Significativo ($p < 0,05$);

** Não significativo ($p > 0,05$).

8.2 Anexo 2 – Cromatogramas referente ao potencial zeta e tamanho de partícula em suspensões de nanocápsulas e nanoesferas

Nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ contendo ômega-3 como núcleo oleoso

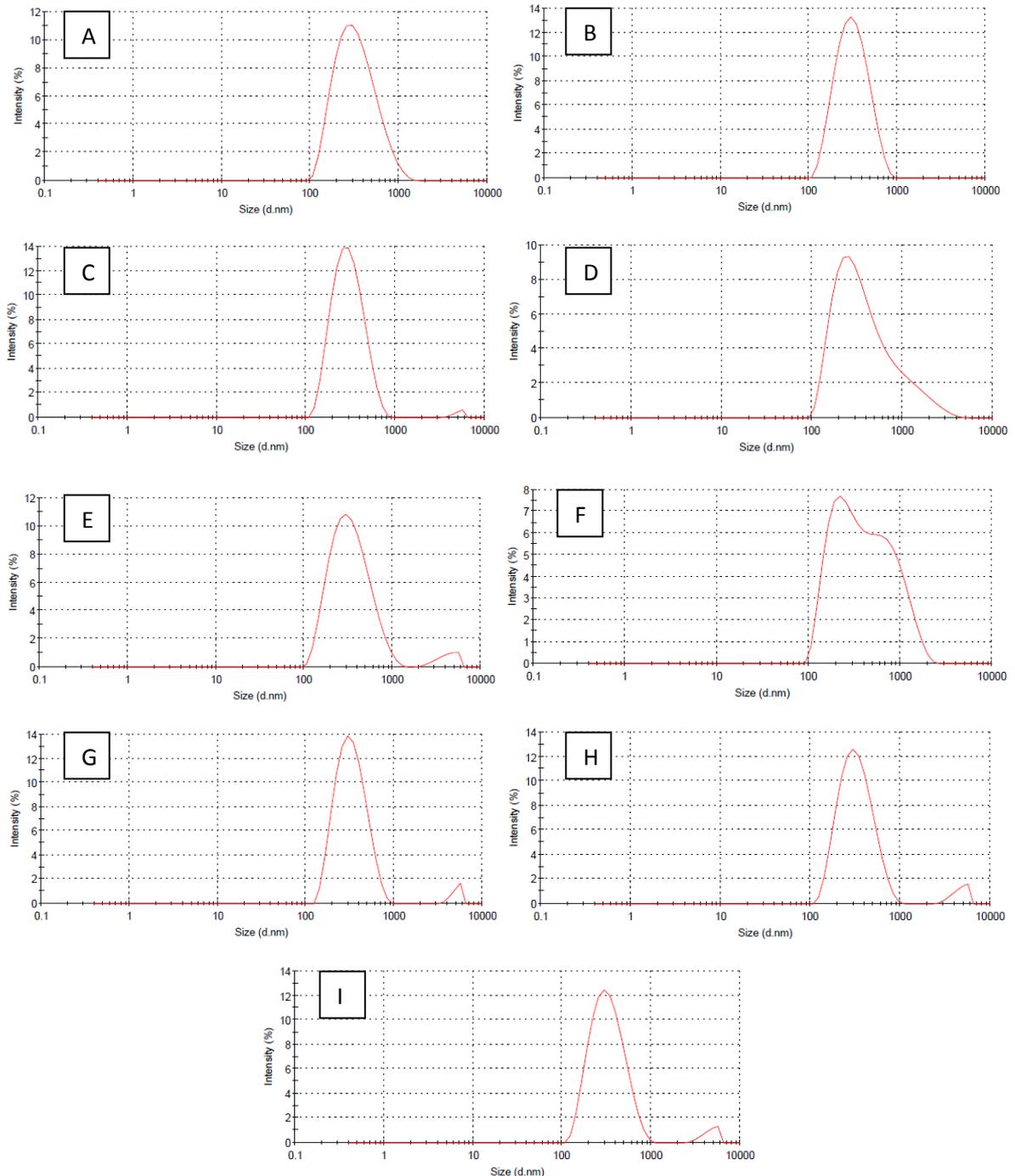


Figura 18 – Cromatograma do tamanho de partícula em suspensão de nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ contendo ômega-3 como núcleo oleoso. A, B e C representam os resultados em triplicata referente à primeira formulação; D, E e F representam os resultados em triplicata referente à segunda formulação; G, H e I representam os resultados em triplicata referente à terceira formulação desenvolvida.

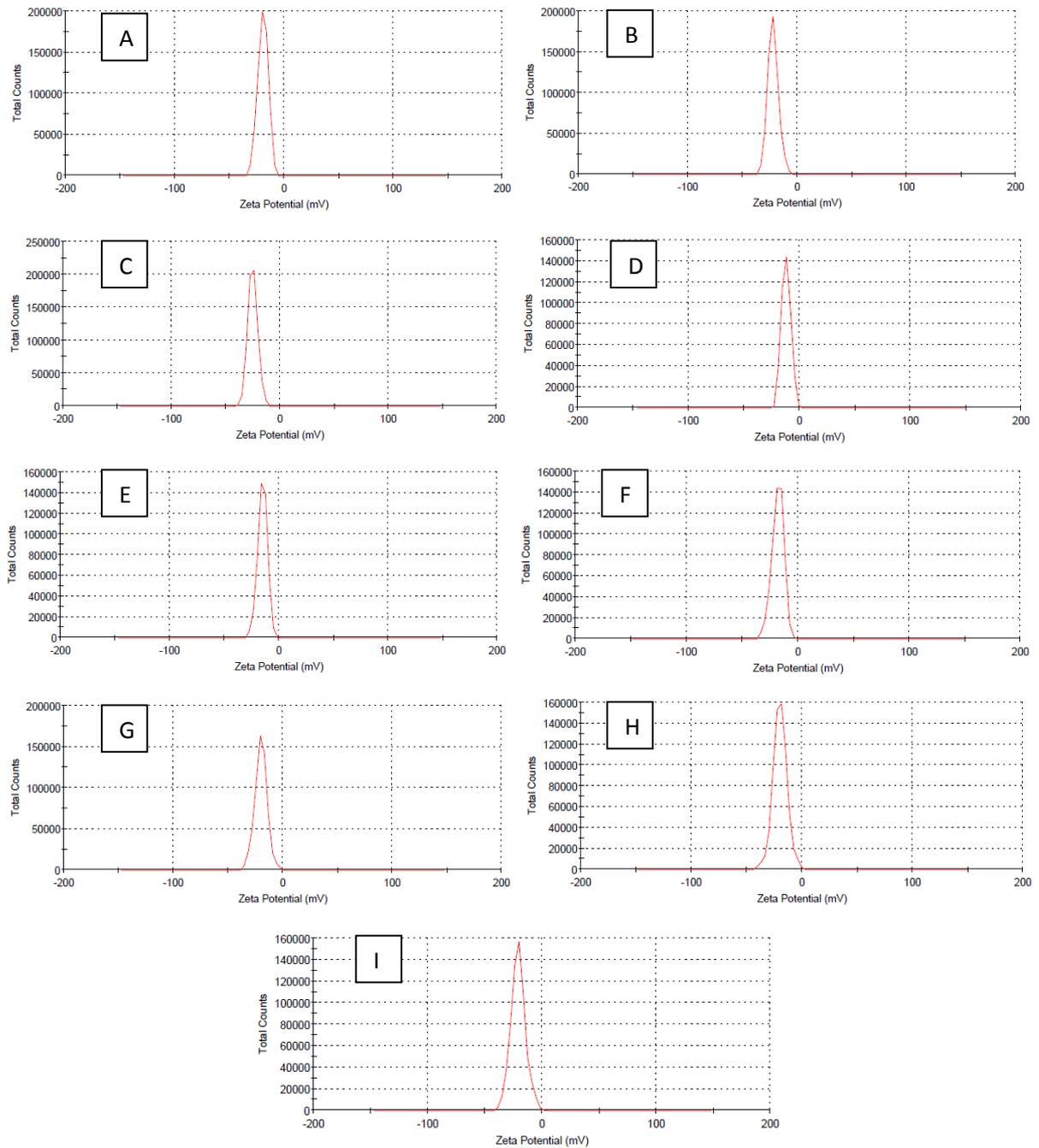


Figura 19 – Cromatograma do potencial zeta em suspensão de nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ contendo ômega-3 como núcleo oleoso. A, B e C representam os resultados em triplicata referente à primeira formulação; D, E e F representam os resultados em triplicata referente à segunda formulação; G, H e I representam os resultados em triplicata referente à terceira formulação desenvolvida.

Nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ contendo miglyol como núcleo oleoso

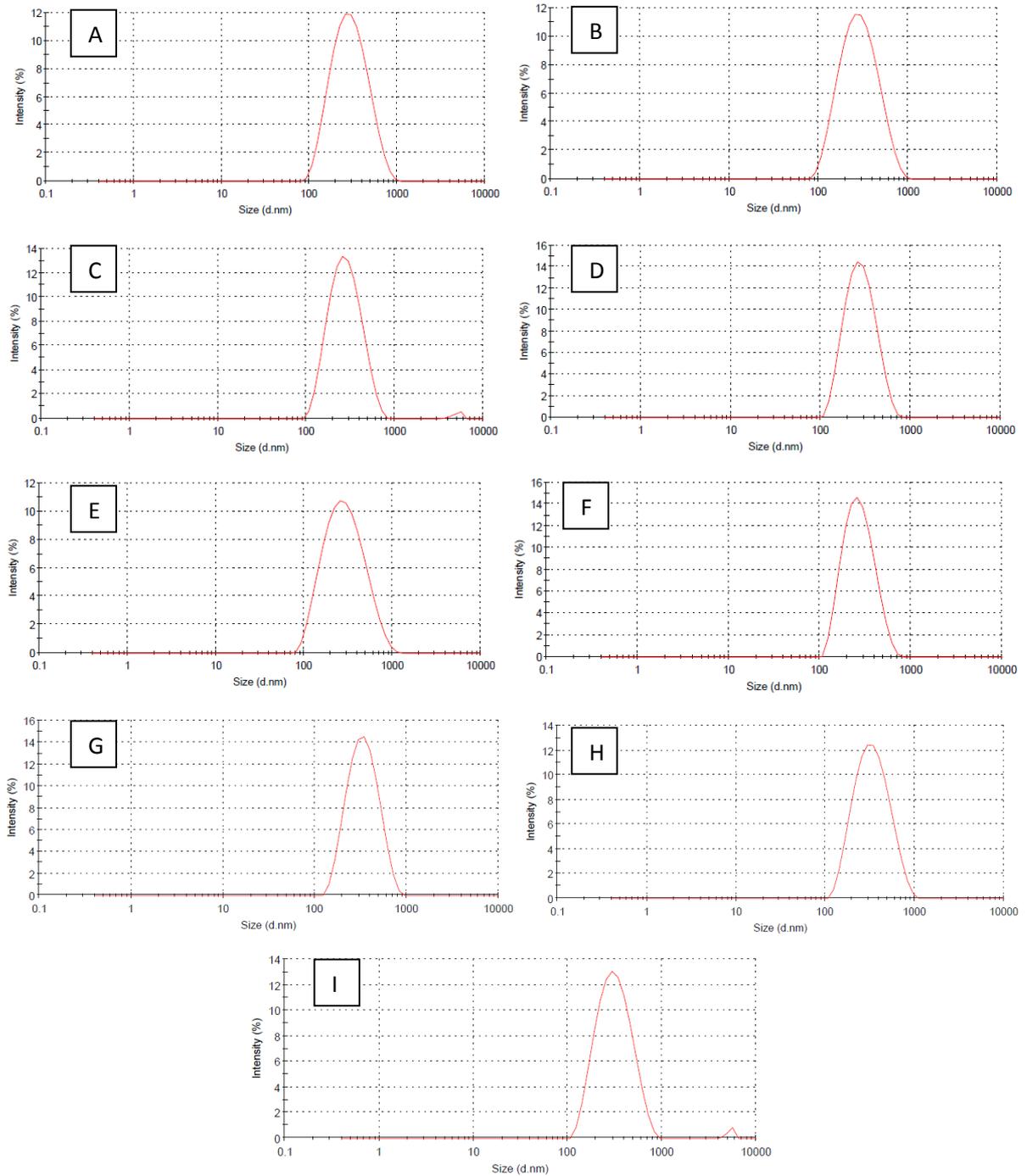


Figura 20 – Cromatograma do tamanho de partícula em suspensão de nanocápsulas de $(\text{PhSe})_2$ contendo miglyol como núcleo oleoso. A, B e C representam os resultados em triplicata referente à primeira formulação; D, E e F representam os resultados em triplicata referente à segunda formulação; G, H e I representam os resultados em triplicata referente à terceira formulação desenvolvida.

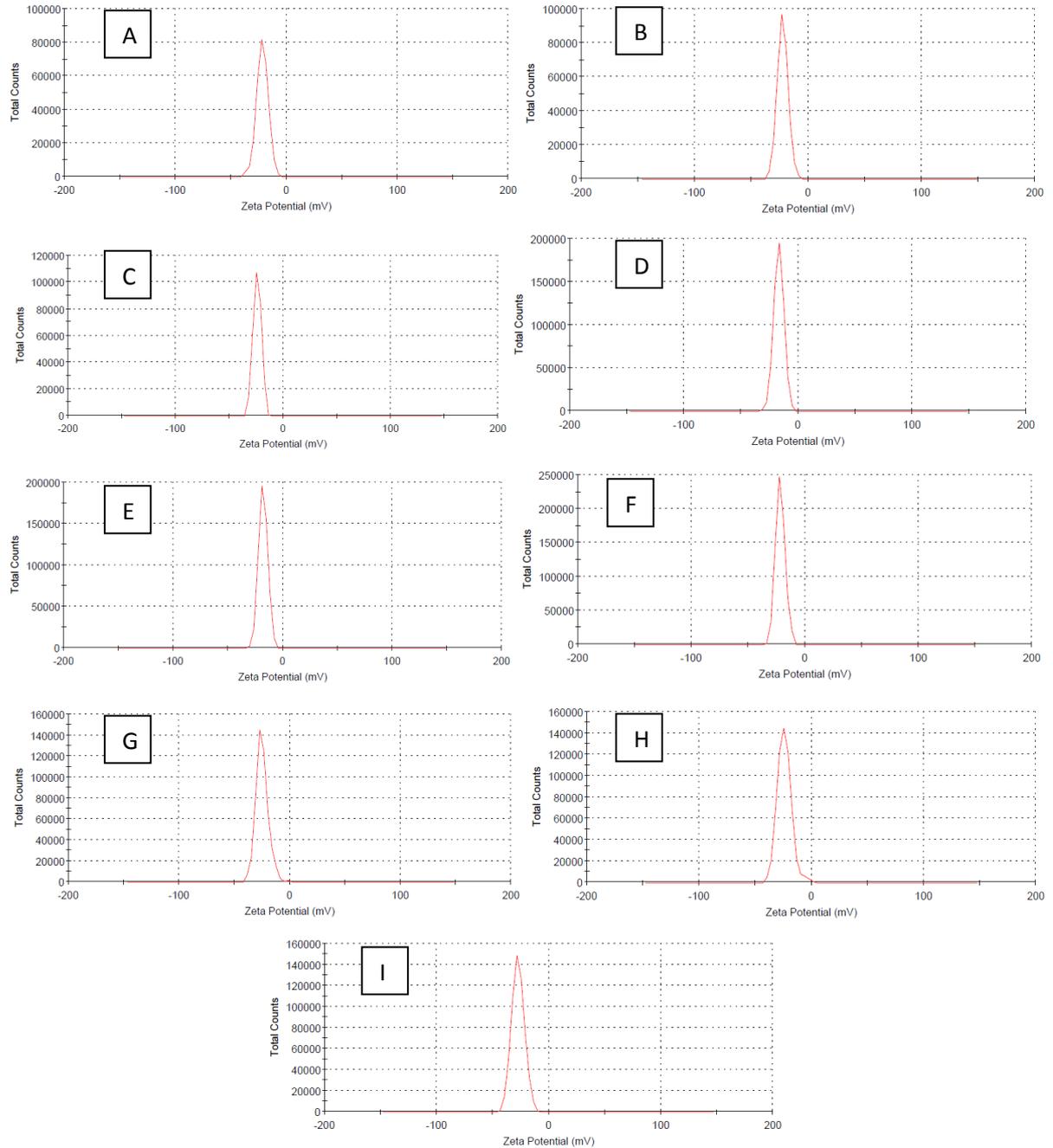


Figura 21 – Cromatograma do potencial zeta em suspensão de nanocápsulas de (PhSe)₂ contendo miglyol como núcleo oleoso. A, B e C representam os resultados em triplicata referente à primeira formulação; D, E e F representam os resultados em triplicata referente à segunda formulação; G, H e I representam os resultados em triplicata referente à terceira formulação desenvolvida.

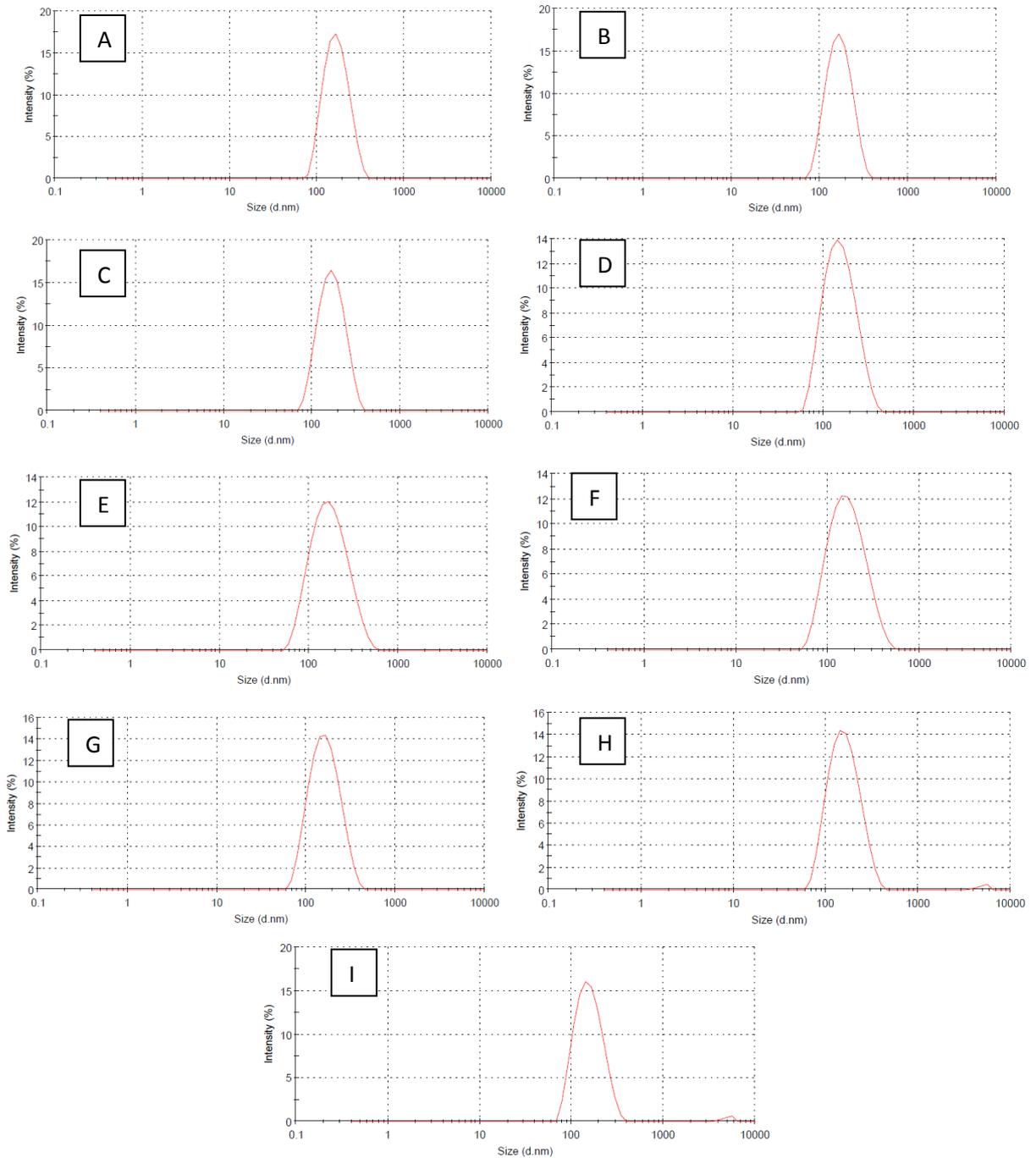
Nanoesfera de $(\text{PhSe})_2$ 

Figura 22 – Cromatograma do tamanho de partícula em suspensão de nanoesfera de $(\text{PhSe})_2$. A, B e C representam os resultados em triplicata referente à primeira formulação; D, E e F representam os resultados em triplicata referente à segunda formulação; G, H e I representam os resultados em triplicata referente à terceira formulação desenvolvida.

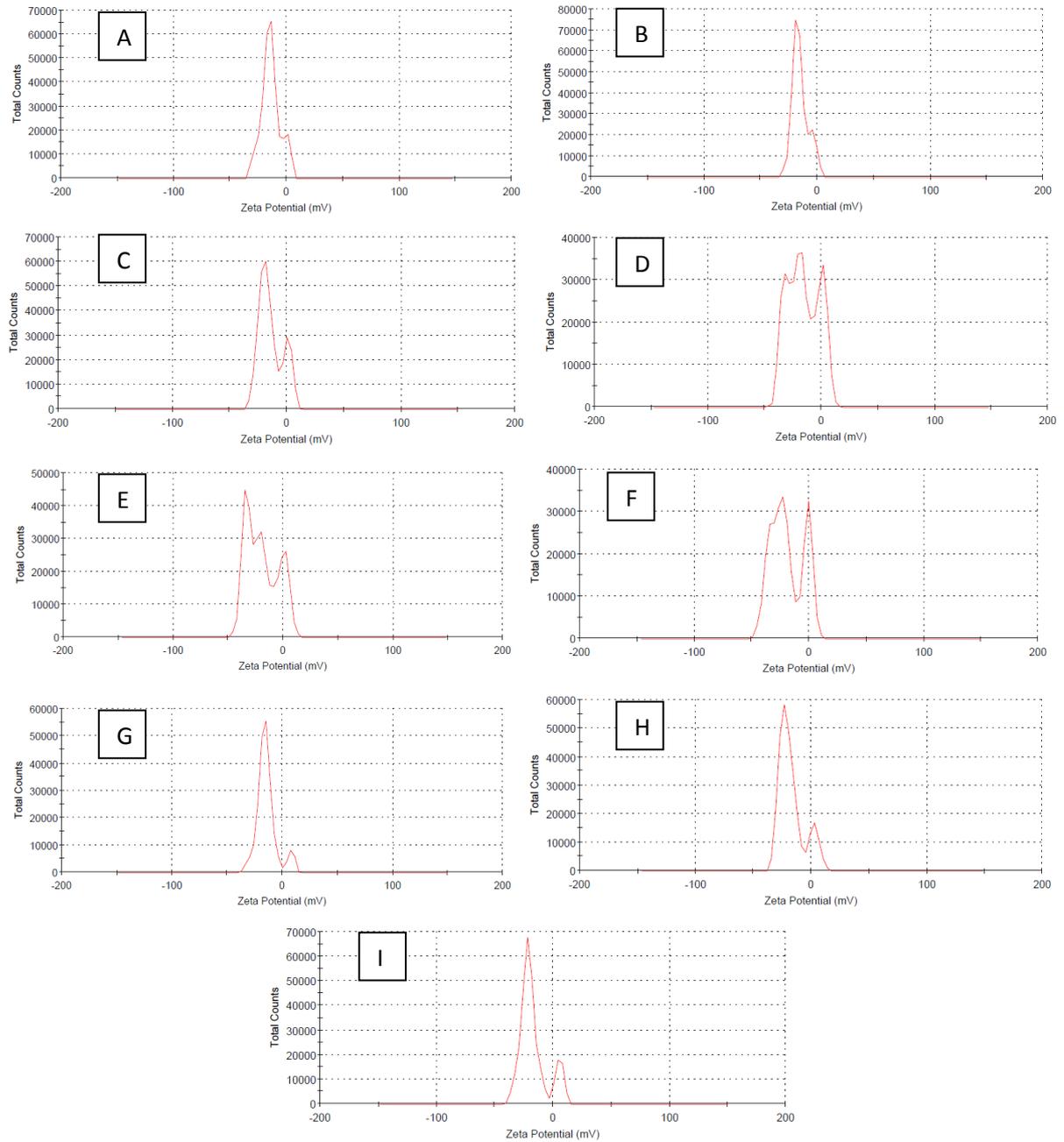


Figura 23 – Cromatograma do potencial zeta em suspensão de nanoesfera de $(\text{PhSe})_2$. A, B e C representam os resultados em triplicata referente à primeira formulação; D, E e F representam os resultados em triplicata referente à segunda formulação; G, H e I representam os resultados em triplicata referente à terceira formulação desenvolvida.

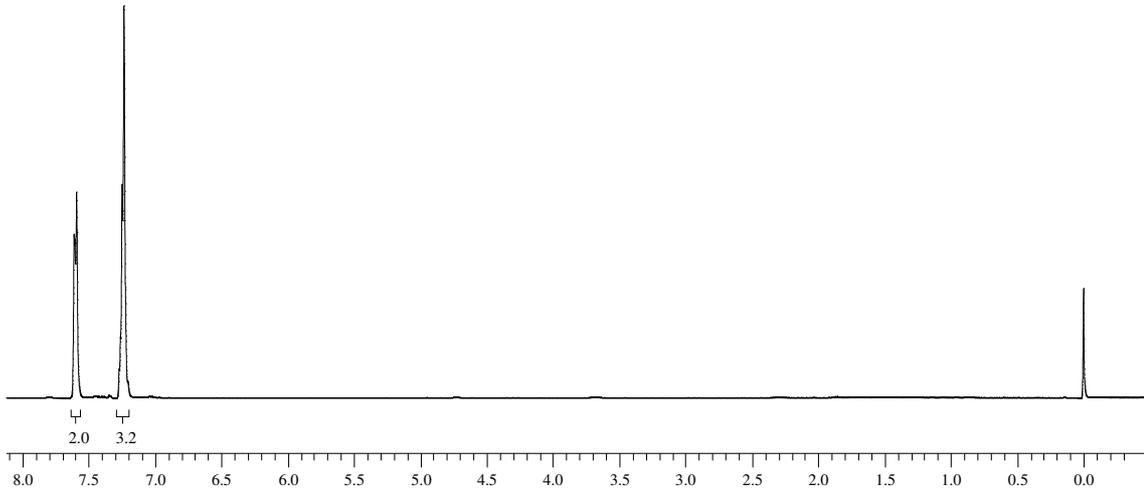


Figura 24 - Espectro de RMN ^1H do composto disseleneto de difenila em CDCl_3 a 400 MHz

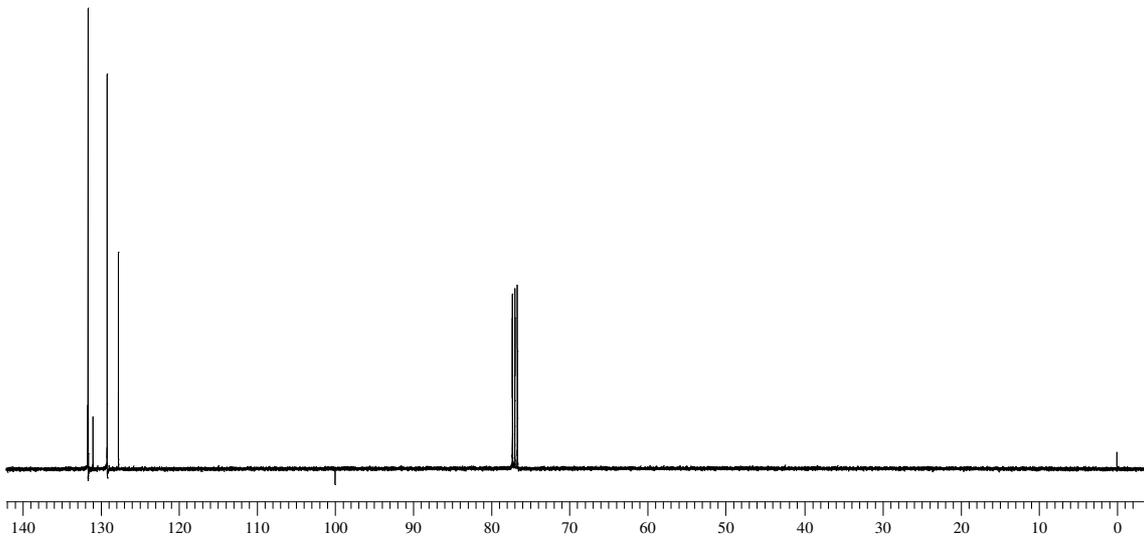


Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C do composto disseleneto de difenila em CDCl_3 a 400 MHz